

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEYLLA LENÇONE MISCHIATTI



**OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO RESVERATROL POR  
BIOTRANSFORMAÇÕES E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS**

CURITIBA  
2012

KEYLLA LENÇONE MISCHIATTI

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO RESVERATROL POR  
BIOTRANSFORMAÇÕES E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás H. de Oliveira

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Almeriane M. Weffort-Santos

CURITIBA  
2012

## TERMO DE APROVAÇÃO

## DEDICATÓRIA

As pessoas que me mostraram o melhor da vida:  
Pai, Mãe, Karina e Anderson

## AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras, ainda, porque nos desafiam a construí-los. Por esta razão, desejo expressar meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente a Deus, por sempre guiar os meus passos, pela sabedoria, coragem e força que me proporcionou para superar dificuldades e medos.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, orientador desta dissertação, pelo imprescindível e valioso apoio em todas as fases de execução deste trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort-Santos, minha querida co-orientadora, que contribuiu com inúmeras sugestões enriquecedoras para o fechamento completo deste trabalho e por todo apoio ao qual foi me dado sempre que precisei.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel e sua aluna, a doutoranda Mariana Porsani, por terem identificado e cedido às cepas dos fungos para realização deste trabalho.

Ao Prof.<sup>a</sup> Dr. Paulo César Leal, da UFSC-SC pelo auxílio na obtenção dos espectros de massa.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Produtos Naturais, com quem tive o prazer de conviver e aprender: Karina, que foi um grande presente que recebi durante essa caminhada. Quero te agradecer pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos e por estar sempre presente ao meu lado. Léó, por sempre ter sido um amigo prestativo e disposto a ajudar. Obrigada pela força no RMN e, também, durante o processo de purificação. E Kelly, pelas importantes dicas, ao longo do trabalho. Cada um de vocês deu uma contribuição importante durante essa caminhada. Muito obrigada!

Agradeço de coração àquelas que, por um tempo, contribuíram para com a realização desse trabalho: Juliana, Monique, Bianca e Thaís. Obrigada pela dedicação e carinho.

Em especial, meus sinceros agradecimentos e gratidão às pessoas que são à base da minha vida. Aos meus pais Jair e Regina, pelo amor incondicional e incentivo, e por terem me educado e me preparado para a vida, me fortalecendo e ensinando com suas palavras e gestos a cada dia.

Ao meu esposo, Anderson, meu eterno companheiro, pelo apoio e amor, pelos momentos mais felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis.

A minha irmã e amiga, Karina, parceria fundamental em minha vida, pelo carinho e compreensão sempre.

Aos demais professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a Capes e a Universidade Federal do Paraná, por tornarem possível a obtenção deste título

## EPÍGRAFE

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

Considerando-se que dificilmente uma substância orgânica resiste à ação catalítica dos diversos sistemas enzimáticos presentes em organismos vivos, alterações na estrutura química de moléculas orgânicas podem ser realizadas através de sistemas envolvendo microrganismos e as alterações promovidas podem resultar em mudanças consideráveis em sua ação farmacológica. O resveratrol é uma substância fenólica conhecido por várias atividades farmacológicas, das quais se destacam as antioxidantes e anticancerígenas. Em contraste, possui baixa biodisponibilidade *in vivo*. Visando maior atividade biológica, mudanças na estrutura química do *trans*-resveratrol envolvendo biotransformação com dezenove espécies de fungos foram realizadas. Desses, somente o *Bipolaris sorokiniana* e o *Penicillium* sp. (64) levaram a resultados positivos em sua biotransformação. Neste contexto, a biotransformação do *trans*-resveratrol pelo *B. sorokiniana* resultou na sua dimerização, levando ao *trans*-dehidrodímero do resveratrol, enquanto a reação com *Penicillium* sp. (64) levou a formação de *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo, substância pela primeira vez descrita. Ao se avaliar o efeito dessas substâncias sobre o comportamento de células das linhagens McCoy, B16F10 e Hela com o ensaio do MTT, observou-se que o *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo inibiu a proliferação com perfil semelhante, porém significativamente maior, que o seu precursor, em contraste com o *trans*-dehidrodímero do resveratrol, o qual promoveu significativo aumento do número de células. Interessante ressaltar que ambos os efeitos, tanto de inibição quanto de indução da proliferação, foram dependentes da dose. Estudos mais aprofundados são necessários para definição do real potencial biológico desses produtos.

**Palavras-chave:** produtos naturais, *trans*-resveratrol, biotransformação, citotoxicidade.

## ABSTRACT

Considering that an organic compound hardly ever resists the catalytic action of the several enzymatic systems present in living organisms, changes in chemical structure of organic molecules can be accomplished through systems involving microorganisms. The structural changes in the ending products may result in considerable enhancement of their pharmacological potential. Contrasting with its low bioavailability in vivo, resveratrol is a phenolic compound widely known by its different pharmacological activities, especially as an antioxidant and anticancer agent. With the aim of achieving higher biological activity, changes in the chemical structure of the *trans*-resveratrol involving biocatalysis with nineteen species of fungi have been performed. Of these, only *Bipolaris sorokiniana* and *Penicillium* sp. (64) led to positive results in which the biotransformation of *trans*-resveratrol by *B. sorokiniana* resulted in its dimerization, leading to the formation of *trans*-resveratrol dehydrodimer, while the reaction with *Penicillium* sp. (64) resulted in the formation of *trans*-resveratrol-4'-O-methyl-5-O-acetyl-3-O- $\beta$ -glucoside, a compound never reported. To evaluate whether these compounds were biologically active, their influence on the behavior of McCoy, B16F10, and Hela cell lines were studied using the MTT assay. The results showed that the *trans*-resveratrol-4'-O-methyl-5-O-acetyl-3-O- $\beta$ -glucoside derivative inhibited the proliferation of all cell lines tested with similar profile, but significantly higher, than its precursor. In contrast, the *trans*-dehydrodimer led to a significant increase in the number of cells. Worthy of note is the fact that, although having opposite effects, both were dose-dependent. Further studies are required for defining the real biological potential of these products.



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>EPÍGRAFE</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO.....	17
1.1.1 Aspectos gerais .....	17
1.1.2 Microrganismos no processo de biotransformação.....	21
1.2 A UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS .....	25
1.3 RESVERATROL.....	27
1.3.1 Potencial terapêutico do resveratrol.....	29
1.3.1.1 Resveratrol e o câncer .....	29
1.3.1.2 Resveratrol e doenças cardíacas .....	30
1.3.1.3 Resveratrol como antioxidante .....	31
1.3.1.4 Resveratrol na reposição hormonal.....	31
1.3.1.5 Resveratrol na inflamação e imunidade .....	32
1.3.1.6 Resveratrol no derrame e lesão cerebral .....	33
1.3.1.7 Resveratrol e outros efeitos biológicos.....	33
1.3.2 Absorção e biodisponibilidade do resveratrol .....	33
1.3.2.1 Papel dos transportadores na biodisponibilidade do resveratrol .....	34
1.3.3 Atividades biológicas e estabilidade dos metabólitos do resveratrol.....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>3 EXPERIMENTAL</b> .....	<b>44</b>
3.1 MATERIAIS .....	44
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	45
3.3 SUBSTRATO.....	46
3.4 MÉTODOS .....	46
3.4.1 Biotransformação em escala analítica ( <i>screening</i> ) .....	46
3.4.1.1 Manutenção das cepas .....	47
3.4.1.2 Fungos .....	47
3.4.1.3 Experimentos em escala analítica .....	48
3.4.2 Biotransformação em escala preparativa.....	49
3.4.2.1 Isolamento, purificação e identificação dos metabólitos.....	51
3.4.3 Atividades biológicas do <i>trans</i> -resveratrol e dos derivados obtidos.....	52
3.4.3.1 Soluções.....	52
3.4.3.2 Manutenção das linhagens B16F10, Hela e McCoy.....	53
3.4.3.3 Proliferação celular.....	53
3.4.3.4 Análises estatísticas .....	54
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>

4.1	TRIAGEM DE DEZENOVE FUNGOS .....	54
4.2	BIOTRANSFORMAÇÃO POR <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	55
4.3	BIOTRANSFORMAÇÃO POR <i>Penicillium</i> sp. (64).....	57
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO .....	60
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS .....	66
4.5.1	Caracterização dos metabólitos obtidos por biotransformação do <i>trans</i> -resveratrol com o fungo <i>B. sorokiniana</i> .....	66
4.5.2	Caracterização dos metabólitos obtidos por biotransformação do <i>trans</i> -resveratrol com o fungo <i>Penicillium</i> sp. (64).....	79
4.6	MECANISMO DE REAÇÃO POR VIA ENZIMÁTICA .....	92
4.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO RESVERATROL E DOS DERIVADOS .....	94
4.7.1	Avaliação da proliferação celular .....	95
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TEMPO DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS APÓS INOCULAÇÃO .....	48
TABELA 2- DADOS DO <i>trans</i> -resveratrol (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO; 200 MHZ .....	62
TABELA 3- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DO <i>trans</i> -resveratrol (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO, 50 MHZ) .....	64
TABELA 4- CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO <i>trans</i> -resveratrol .....	66
TABELA 5- DADOS DE RMN <sup>1</sup> H DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>B. sorokiniana</i> ..	70
TABELA 6- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DO DERIVADO DEHIDRODÍMERO OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>B. sorokiniana</i> ..	75
TABELA 7- CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO <i>trans</i> -dehidrodímero do <i>resveratrol</i> .....	75
TABELA 8- DADOS DE RMN <sup>1</sup> H DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64). .....	84
TABELA 9- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM <i>Penicillium</i> sp. (64). .....	87
TABELA 10- CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo.....	88
TABELA 11- EFEITO DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MCCOY, B16F10 E HELA AVALIADAS PELO ENSAIO DO MTT. ....	103

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- CURVA PADRÃO DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS, EM UM SISTEMA FECHADO .....	23
FIGURA 2- PROCESSO UTILIZADO PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans-resveratrol</i> POR MEIO DAS ESPÉCIES <i>Bipolaris sorokiniana</i> E <i>Penicillium</i> sp. (64).....	50
FIGURA 3- ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO, MOSTRANDO DETALHES DO CRESCIMENTO FÚNGICO ANTES DA EXPOSIÇÃO AO <i>trans-resveratrol</i> .....	50
FIGURA 4- MICÉLIO DE <i>B. sorokiniana</i> . APÓS FILTRAÇÃO.....	51
FIGURA 5- PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA CENTRÍFUGA.....	51
FIGURA 6- FUNGO <i>B. sorokiniana</i> : ASPECTOS DA CULTURA; (A) CRESCIMENTO EM TUBO DE ENSAIO; (B) CRESCIMENTO EM PLACAS DE PETRI.....	56
FIGURA 7- CCD ILUSTRANDO A DETECÇÃO DO DERIVADO 1 PRODUZIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans-resveratrol</i> PELO FUNGO <i>B. sorokiniana</i> . ...	57
FIGURA 8- CCD DO DERIVADO 1 PRODUZIDO PELO FUNGO <i>B. sorokiniana</i> , APÓS PURIFICAÇÃO .....	57
FIGURA 9- FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64): ASPECTOS DE CULTIVO; (A) CRESCIMENTO EM TUBO DE ENSAIO; (B) PLACAS DE PETRI .....	58
FIGURA 10- CCD DA FASE ANALÍTICA DEMONSTRANDO O DERIVADO 2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO PRODUZIDO PELO FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64).....	59
FIGURA 11- CCD DO DERIVADO 2 PRODUZIDO PELO FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64), APÓS PURIFICAÇÃO .....	60
FIGURA 12- ESPECTRO DE MASSAS DO <i>trans-resveratrol</i> , MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO .....	61
FIGURA 13- ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO <i>trans-resveratrol</i> .....	61
FIGURA 14- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans-resveratrol</i> ; EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 6,30 A 7,50 PPM .....	63
FIGURA 15- (A) ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO), DO <i>trans-resveratrol</i> ; (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 95,0 A 160,0 PPM .....	65
FIGURA 16- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans-resveratrol</i>	66

FIGURA 17- ESPECTRO DE MASSAS DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO .....	67
FIGURA 18- ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol.....	69
FIGURA 19- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO), DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>B. sorokiniana</i> .....	71
FIGURA 20- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol NA REGIÃO ENTRE 6,20 A 7,43 PPM .....	71
FIGURA 21- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol NA REGIÃO ENTRE 4,20 E 5,60 PPM .....	72
FIGURA 22- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO DERIVADO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol .....	73
FIGURA 23- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO DERIVADO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol, NA REGIÃO ENTRE 100,0 A 160,0 PPM.....	73
FIGURA 24- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO DERIVADO <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol, NA REGIÃO ENTRE 55,0 A 95,0 PPM .....	74
FIGURA 25- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO DERIVADO <i>trans</i> -DEHIDRODÍMERO do resveratrol .....	74
FIGURA 26- ACOPLAMENTOS POTENCIALMENTE POSSÍVEIS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE RMN- <sup>1</sup> H E RMN- <sup>13</sup> C.....	76
FIGURA 27- ESPECTRO HSQC DO DERIVADO <i>trans</i> - dehidrodímero do resveratrol EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO.....	77
FIGURA 28- ESPECTRO HMBC DO DERIVADO <i>trans</i> - dehidrodímero do resveratrol EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO.....	78
FIGURA 29- ESPECTRO DE MASSAS DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo, MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO .....	80
FIGURA 30- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo .....	81
FIGURA 31- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64) .....	82

FIGURA 32- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64) NA REGIÃO ENTRE 6,20 A 7,70 PPM .....	83
FIGURA 33- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ,(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol COM O FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64) NA REGIÃO ENTRE 3,20 A 5,20 PPM .....	83
FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo .....	85
FIGURA 35- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo NA REGIÃO ENTRE 100,00 A 175,00 PPM .....	86
FIGURA 36- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo NA REGIÃO ENTRE 49,53 A 100,92 PPM .....	86
FIGURA 37- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO) DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo .....	88
FIGURA 38- MAPA DE CONTORNO HSQC DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO; 400 MHZ.....	90
FIGURA 39- MAPA DE CONTORNO HMBC DO <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo - (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO; 400 MHZ.....	91
FIGURA 40- MORFOLOGIA CARACTERÍSTICA DE CÉLULAS MCCOY (A1), B16F10 (A2) E HELA (A3) E APÓS TRATAMENTO POR 24H COM DMSO (0,1% - B1, B2, B3) E <i>trans</i> -resveratrol (800 μM – C1, C2, C3) .....	96
FIGURA 41- EFEITO DO <i>trans</i> -resveratrol E DERIVADOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS MCCOY. CÉLULAS MCCOY FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE <i>trans</i> -resveratrol (A), <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo (B) E <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol (C) .....	99
FIGURA 42- EFEITO DO <i>trans</i> -resveratrol E DERIVADOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS B16F10. CÉLULAS B16F10 FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE <i>trans</i> -resveratrol (A),	

<i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo (B) E <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol (C).....	100
FIGURA 43- EFEITO DO <i>trans</i> -resveratrol SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS HELA. CÉLULAS HELA FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE <i>trans</i> -resveratrol (A), <i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-B-glucosídeo (B) E <i>trans</i> -dehidrodímero do resveratrol (C) .....	101

### LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DA 11-PROGESTERONA .....	18
ESQUEMA 2- BIOTRANSFORMAÇÃO DO RESVERATROL EM PICEID. ....	41
ESQUEMA 3- ETAPAS DE OBTENÇÃO DO DERIVADO 1 POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol PELO FUNGO <i>B. sorokiniana</i> ....	56
ESQUEMA 4- ETAPAS DE OBTENÇÃO DO DERIVADO 2 OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO <i>trans</i> -resveratrol PELO FUNGO <i>Penicillium</i> sp. (64) .....	59

### LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- ESTRUTURA QUÍMICA DO resveratrol, SEUS METABÓLITOS E DERIVADOS NAS FORMAS <i>trans</i> -(A) OU <i>cis</i> - (B) .....	38
QUADRO 2: FUNGOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS EM ESCALA ANALÍTICA .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UV-VIS	Ultravioleta-visível
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
EM	Espectometria de massa
COX 1	Ciclooxigenase 1
COX 2	Ciclooxigenase 2
LDL	Lipoproteína de alta densidade
ODC	Ornitina descarboxilase
STS	Estilbeno sintetase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
DC	Doenças cardiovasculares
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
ER	Receptor de estrogênio
BHT	Butilhidroxitolueno
OH/O <sub>2</sub>	Radicais livres
IV	Infravermelho
RPM	Rotação por minuto
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	Acetona deuterada
D <sub>2</sub> O	Óxido de deutério
CCDC	Cromatografia em camada delgada centrífuga
CCD	Cromatografia em camada delgada
DMSO <sub>d6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ppm	Partes por milhão
s	Singleto
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
m	Multipleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
BDA	Ágar batata dextrose
Cq	Carbono quaternário
MHz	Mega hertz
δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO

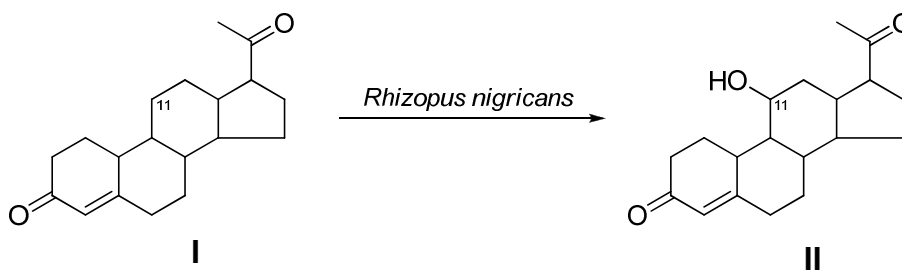
### 1.1.1 Aspectos gerais

Biotransformações e biocatálise são conversões químicas catalisadas por enzimas (SHAW; ROBINS; KIENER, 2003). No primeiro caso são utilizadas células inteiras e no segundo são utilizadas enzimas isoladas. Esses métodos são uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou por resolução de racematos. A biotransformação compreende a metabolização de xenobióticos entendidos como fármacos e/ou outras substâncias químicas estranhas ao organismo. Dificilmente uma substância orgânica resiste à ação catalítica dos diversos sistemas enzimáticos presentes em células de organismos vivos e as alterações promovidas em sua estrutura química podem resultar em mudanças consideráveis em sua ação farmacológica. Um aspecto essencial no estudo de substâncias visando seu emprego como fármaco ou a obtenção e posterior desenvolvimento de medicamentos refere-se à elucidação de sua metabolização, incluindo sua biotransformação *in vivo* (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Nos processos de biotransformação, o procedimento mais utilizado é realizado com células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados. As preparações incluem extratos enzimáticos de microrganismos, plantas, protozoários e insetos, entre outros. Pode-se ainda utilizar enzimas puras, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essas últimas são bastante onerosas, uma vez que além da enzima, é necessário o uso de um ou mais cofatores, para que a mesma seja ativa (FABER, 1997).

O uso de biocatalisadores naturais não é nada novo. Eles vêm sendo utilizados por mais de 100 anos, sendo o primeiro uso de biotransformação

descrito por Pasteur em 1858, quando ele obteve L-tartarato de amônio de DL-tartarato de amônio utilizando o fungo *Penicillium glaucum* (HANSON, 1992). Outra biotransformação extremamente importante que marcou o início dos processos de biocatálise foi realizada em 1952 por Peterson e Murray; Eles realizaram a hidroxilação na posição 11- $\alpha$  da progesterona (**I**) com o fungo *Rhizopus nigricans*, que levou a formação da 11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**II**), conforme esquema 1. Esta reação foi decisiva para a síntese de hormônios adrenocorticóides de forma economicamente viável (STOUDT, 1960).



ESQUEMA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DA 11 $\alpha$ -PROGESTERONA (**I**) NA 11 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA (**II**)  
FONTE: (STOUDT, 1960)

É interessante observar que, naquela época, era comum um mesmo cientista pesquisar temas inerentes à química e a bioquímica sem nenhuma distinção. Um exemplo dessa afirmação é a lista de processos catalíticos feita por Berzelius em 1838. Essas duas áreas da ciência percorreram junto um longo caminho e, em algum momento no início do século XX, elas se tornaram independentes (ROBERTS *et al.*, 1995). Hoje, após quase um século, os cientistas tomaram consciência de que existe, na interface destas ciências, um mundo a ser ainda descoberto. O progresso no uso de enzimas e células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando o uso de microrganismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios industriais e acadêmicos (SHAW; ROBINS; KIENER, 2003).

Com o desenvolvimento de novas técnicas, o uso da biotransformação foi crescendo até ser empregado, atualmente, como uma ferramenta de produção de substâncias com alto valor agregado. Acredita-se que o futuro da indústria de síntese química, essencialmente devido às crescentes exigências de qualidade e

preservação do meio ambiente, passará em muitos casos pela utilização de processos biocatalíticos (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

Os biocatalisadores têm se tornado mais acessíveis e de fácil obtenção e manuseio. Sua eficiência em realizar diversas reações químicas, até as mais difíceis de serem obtidas pelos métodos tradicionais, como a modificação de grupos pouco ativados e a introdução de funções orgânicas, principalmente hidroxilações, em carbonos  $sp^3$  remotos e funções pré-existentes, têm sido o grande atrativo para sua aplicação em sínteses químicas em múltiplas etapas. A seletividade apresentada pelos biocatalisadores naturais, o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas para as reações como substratos, o custo, as condições amenas e ecologicamente corretas, conferem aos mesmos algumas características fundamentais para sua utilização (FABER, 1997). Nos últimos anos a biocatálise têm explorado conhecimentos de áreas como a biologia molecular, com o intuito de desenvolver biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos, passíveis de serem utilizados pela indústria a um custo mais acessível (FABER, 1997).

Segundo Loughlin, 2000, as principais vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica são: (A) catálises eficientes, sendo o processo da reação mais rápido quando comparado com a catálise química e as enzimas podem ser efetivas mesmo em baixas concentrações molares; (B) Reações sob condições suaves, numa faixa de temperatura de (20-40 °C) e pH neutro ( em torno de 7,0) minimizando reações indesejadas, tais como rearranjos e reações laterais; (C) ação catalítica sobre um grande número de substratos em locais de difícil acesso por meio sintético; (D) na química verde, um importante aliado em favor das questões ambientais; (E) seletividades tais como:

- ❖ Quimiosseletividade: algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos reativos. Isto leva a produtos reacionais mais “limpos”, facilitando o processo de purificação;
- ❖ Regiosseletividade: devido à sua estrutura tridimensional complexa, podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato;
- ❖ Enantiosseletividade: quase todas as enzimas são formadas á partir de *L*-aminoácidos, portanto são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é

reconhecida na formação do complexo enzima-substrato. Sendo assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmicos pode reagir com velocidades diferentes.

As enzimas podem ser divididas em seis principais grupos, de acordo com a UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA. Estes grupos são:

- (1) Oxidoredutases, que realizam reações de oxidação e redução; oxidação das ligações C-H, C-C, e C=C e remoção de átomos de hidrogênio equivalentes;
- (2) Transferases, que realizam transferência de grupos tais como acila, fosforila, aldeído, cetônico e açúcares;
- (3) Hidrolases, que realizam hidrólise de glicosídeos, anidridos, ésteres, amidas, peptídeos e outras funções contendo C-N;
- (4) Liases, que realizam reações tais como a adição de HX em ligações duplas como em C=C, C=N e C=O e também o processo reverso;
- (5) Isomerases, que efetuam migração de ligação C=C, isomerização e racemização *cis-trans*;
- (6) Ligases, responsáveis pela formação de ligação C-O, C-S, C-N, C-C e formação de ligação éster de fosfato (ATP) (LOUGHLIN, 2000);

A principal desvantagem dos sistemas de transformações microbianas é a imprevisibilidade do processo. A fim de maximizar as chances de se obter um produto particular ou de obtenção de grande variação de produtos, é frequentemente necessário utilizar uma ampla variedade de microrganismos na triagem inicial (ARAKAWA, 2007).

Em geral nos processos industriais, a biotransformação ou biocatálise é obtida por caminhos tradicionais, que consistem desde a identificação de fontes dos microrganismos, seleção de eficientes biocatalisadores, desenvolvimento e otimização de processos da escala laboratorial à planta piloto. Uma pesquisa prévia em bibliotecas de substâncias orgânicas, enzimas e microrganismos, também têm sido empregada pela denominada, química combinatória quimioenzimática (chemoenzymatic combinatorial chemistry). Esta tecnologia tem como base a integração de processos enzimáticos interfaciais, transformações microbianas e reações químicas, desta forma interconectando a catálise química com a biocatálise (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Os procedimentos de avaliação e seleção de microrganismos, de plantas ou de células animais, representam o método tradicional de descoberta de novos biocatalizadores. Os microrganismos são de particular interesse devido ao curto período de geração, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas. Além disso, há uma infinidade de microrganismos na natureza que podem ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Estes modificam e degradam uma gama de moléculas orgânicas complexas e então, é de se esperar que pelo menos um deles, catalise uma dada reação de interesse (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; FARNET; ZAZOPOULOS, 2005).

As reações de biotransformações são realizadas empregando-se células íntegras de organismos vivos (como plantas) ou microrganismos (leveduras, bactérias e fungos) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BUTLER, 2004; LAM, 2007). Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies, mas apesar das inúmeras aplicações biológicas apresentadas na literatura, os fungos e as bactérias constituem os grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL; DAISY, 2003).

### 1.1.2 Microrganismos no processo de biotransformação

Os microrganismos são extremamente importantes para a humanidade por inúmeras razões, tais como participação em reflorestamentos (micorrizas), fermentação para a produção de alimentos, ciclosporinas, penicilina e outras substâncias biologicamente ativas. As principais características dos microrganismos que os tornam úteis para a produção de tais compostos, os quais poderiam ser obtidos de plantas ou ainda serem sintetizados *in vitro* por vias químicas são a alta razão superfície/volume, que facilita o rápido consumo de nutrientes para seu metabolismo e biossíntese; a ampla variedade de reações que os microrganismos são capazes de realizar; a grande facilidade de adaptação nos mais diferentes ambientes, permitindo o seu transporte da natureza para meios artificiais, no qual eles são capazes de crescer utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo e produzir compostos de interesse; a simplicidade de procedimentos de *screening*, permitindo examinar milhares de culturas em um tempo razoavelmente curto; e a ampla diversidade

de espécies, produzindo diferentes enzimas, que podem catalisar as mesmas reações, permitindo assim, um monitoramento diferenciado nas condições de cultivo (ADRIO; DEMAINE, 2005).

O Reino Fungi, é um dos mais numerosos. Estima-se que haja cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos que habitam o nosso planeta. Destas apenas 5% estão descritas e, entre as espécies descritas somente 16% têm sido cultivadas (PEARCE, 1997; DEMAINE, 1999). Estes dados ilustram o grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudo de metabólitos secundários produzidos por fungos, bem como seu sistema enzimático.

Os fungos têm sido uma fonte muito rica de fármacos ou pró-fármacos importantes, incluindo antibióticos antibacterianos ( $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e glicopeptídeos), antibióticos-antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácidos aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), entre outros (DEMAINE, 1999; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). O metabolismo secundário dos fungos é rico em diferentes classes de substâncias desde terpenóides, alcalóides e também policetídeos como zearalenonas, antraquinonas, alquiorescínóis e meroterpenos, dentre outras. Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos, foi obtido de fungos (KONGSAEREE *et al.*, 2003). Estes microrganismos crescem como células únicas (leveduras), como colônias filamentosas multicelulares (fungos filamentosos, bolores e cogumelos). O termo crescimento se refere ao aumento no número de células não ao aumento das dimensões celulares. O crescimento populacional é definido como o aumento do número, ou da massa microbiana. Quando uma cultura microbiana desenvolve-se em um sistema fechado, pode-se confeccionar uma curva de crescimento. Esta pode ser dividida em diferentes etapas (Figura 1): lag, log, estacionária e de declínio:

- ❖ Fase de latência ou lag é o período variável, onde não há um aumento significativo da população, nesta fase a célula procura se adaptar ao novo meio;
- ❖ Fase logarítmica ou fase log é a etapa onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando.

- ❖ Fase estacionária, nesta etapa os nutrientes estão em escassez e os produtos tóxicos estão se tornando mais abundantes. Nesta etapa não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Nesta fase que são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem as enzimas;
- ❖ Fase de declínio, nessa fase a maioria das células estão em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. A contagem total permanece relativamente constante, enquanto as variáveis caem lentamente (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

Em processos industriais que visam à obtenção de produtos microbiológicos, usa-se o método de crescimento em células contínuo. Nestes casos, tem-se o interesse em manter as células em fase log ou estacionária (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

Os fungos tem sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, pois são de fácil manejo, crescimento rápido e utilizam meios bem caracterizados quimicamente. Podem produzir enzimas como lípases, invertases, lacase, amilases, entre outras. Essas enzimas hidrolisam o substrato tornando-os assimiláveis através de mecanismos de transporte ativo e passivo.



FIGURA 1- CURVA PADRÃO DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS, EM UM SISTEMA FECHADO

FONTE: (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000)

Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Outros elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas, como a tiamina. Os fungos necessitam de água para o seu desenvolvimento, sendo alguns halofíticos, crescendo em ambientes com elevada concentração de sal (TRABULSI *et al.*, 1996; FARNET; ZAZOPOULOS, 2005).

Algumas espécies de fungos são patogênicas, mas a grande maioria participa de processos biotecnológicos importantes para os seres humanos.

O gênero *Penicillium* é reconhecido por ser amplamente dispersos no ambiente, com mais de 225 espécies. As espécies deste gênero, em geral, são consideradas principalmente fungos do solo, cuja função principal é a decomposição. Suas espécies são de grande importância para os ecossistemas, a agricultura e a biotecnologia. A descoberta dos antibióticos de uso clínico começou com a descoberta da eficácia da penicilina, um composto  $\beta$ -lactâmico. Muitos outros metabólitos biológicos como, antibióticos, antifúngicos e imunossupressores, têm sido descobertos a partir de metabólitos de cepas de *Penicillium*. Além disso, várias espécies de *Penicillium* são importantes agentes causadores de infecção por causa da produção de micotoxinas (NAKASHIMA *et al.*, 2008).

Outro gênero extremamente importante associado a doenças humanas e que são parasitas de plantas são os fungos do gênero *Bipolaris*: como *B. oryzae* (arroz) e *B. sacchari* (cana-de-açúcar). Algumas espécies como *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* e *B. spicifera*, são patogênicas ao homem o *B. sorokiana* é um patógeno de especial importância nas culturas de trigo e cevada, causando moléstia que recebem diversas denominações de acordo com o órgão da planta que é afetado (REIS, 1982). Também são relatados como cultivares suscetíveis a esse patógeno, tritcale, sorgo, festuca, azevém, centeio, aveia amarela, branca e preta (TINLNE; WILDERMUTH; SPURR, 1988). A feo-hifomicose é a doença causada por esses fungos, que se caracterizam por hifas e células fúngicas pigmentadas no tecido infectado. Fungos desse gênero vivem como



saprófitas no solo, vegetação e água e possuem uma grande importância na área de saúde, já que existe uma crescente incidência de infecções em humanos com uma gravidade relevante, podendo ocasionar o óbito, principalmente em pacientes imunodeprimidos (TRABULSI *et al.*, 1996).

A abordagem tradicional para inclusão de biotransformações em um processo sintético, normalmente inicia-se com a escolha do microrganismo utilizado. Essa pode ser a etapa mais crítica do procedimento global. Inicialmente, analisam-se os resultados semelhantes já disponíveis na literatura em relação à reação de interesse, na tentativa de se obter dados no que diz respeito às possíveis enzimas envolvidas no processo, obtém-se as cepas com outros grupos de pesquisa ou em coleções de culturas de instituições de pesquisa. Na ausência de dados na literatura que indiquem o sistema enzimático desejado à reação em estudo, pode-se isolar o microrganismo da natureza (solo, plantas, ambientes marinhos) e testá-los através de um processo empírico de seleção (*screening*). Nessa seleção realizam-se experimentos em pequena escala com os organismos disponíveis e analisam-se os extratos brutos obtidos do caldo de fermentação, comparando-se a um controle, o qual não foi adicionado substrato. Se houver a formação de novos metabólitos isso significa que aquele organismo realizou alguma transformação química no substrato (GLAZER; NIKALDO, 1995).

Fármacos biotransformados podem originar metabólitos ativos cujos efeitos farmacológicos sejam superiores aos de seu precursor ou até que podem desencadear reações tóxicas. Na maioria das vezes, a ação farmacológica que é atribuída aos metabólitos ativos é similar aquela apresentada pela substância precursora. Existem casos em que os metabólitos ativos podem ser alvos de modificações estruturais, com a finalidade de otimizar suas ações farmacológicas e convertê-los em novos medicamentos (FURA, 2006; BARREIRO; FRAGA, 2008).

## 1.2 A UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados desde tempos imemoriais para o alívio e cura de doenças. A ingestão de ervas e folhas com finalidades terapêuticas

talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais vegetais. Portanto, a fitoterapia é valorizada não somente por ser um processo histórico, mas atualmente ela é amplamente utilizada, pois as plantas com potencial medicinal encontram-se distribuídas no ambiente, representando facilidade de aquisição (BARTON; OLLIS, 1986).

As plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, podem ser modelo para síntese de inúmeros fármacos (NODARI; GUERRA, 2000).

A indústria farmacêutica percebeu nos produtos naturais uma oportunidade de desenvolvimento em vários segmentos da cadeia produtiva, seja na industrialização dos fitoterápicos, na distribuição de matérias primas ou na produção de plantas medicinais (FONTE, 2004). Exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos com base em produtos naturais incluem a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, vários medicamentos utilizados no tratamento do câncer, alguns imunossuppressores e antibióticos. Acredita-se que 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Esse percentual ainda é mais elevado se considerarmos os anticancerígenos e os antibióticos, no qual 70 % foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (YUNES; CALIXTO, 2001). Estudos recentes mostram que atualmente 50% do total de fármacos utilizados na clínica são derivados de produtos naturais (GURIB-FAKIM, 2006).

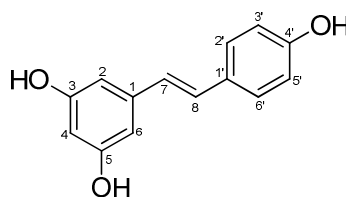
O Brasil, país com a maior diversidade genética vegetal do planeta, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350 e 550 mil espécies (NODARI; GUERRA, 2000), revela um tremendo potencial em relação à descoberta de novos princípios ativos e ao desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas. Embora a medicina popular empregue diversas plantas para o tratamento das mais variadas enfermidades, seu uso muitas vezes não tem critérios ou comprovação científica de eficácia e segurança (FERNANDES, 2004).

Nesse contexto, já que a disponibilidade dessa matéria prima é amplamente comum, é de suma importância estudos visando o desenvolvimento

de novos medicamentos que tenham componentes extraídos de plantas como princípios ativos. Entre estas substâncias encontram-se os polifenóis, destacando-se o resveratrol que está presente em diversas plantas, mas especialmente nas uvas e seus derivados.

### 1.3 RESVERATROL

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (**III**) é uma substância fenólica, uma fitoalexina produzida por algumas plantas como metabólito secundário em resposta ao estresse (desordem metabólica) induzido por elicitores, que podem ser denominados como bióticos e abióticos. Os bióticos podem ser de origem microbiana (elictor exógeno) ou da própria planta (elictor endógeno).



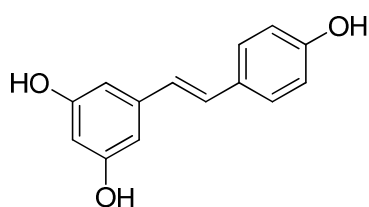
**III**

Quimicamente, os elicitores bióticos são moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídeos. Os elicitores de origem microbiana podem ser estruturas intactas ou parte de fungos e células bacterianas.

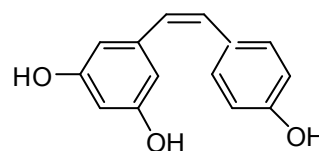
No caso dos elicitores endógenos, os mesmos são formados por fragmentos de material constituinte da parede celular da planta, liberados pela ação de enzimas que a degradam. Estas enzimas podem ser produzidas por fungos, bactérias ou pelas próprias células danificadas da planta. As fitoalexinas podem ser acumuladas nos tecidos como resposta a elicitores abióticos como luz ultravioleta (UV) ou metais pesados, como (HgCl<sub>2</sub>) e (AlCl<sub>3</sub>) (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O resveratrol foi pela primeira vez isolado das raízes de *Veratrum grandiflorum* O. Loes (TAKAOKA, 1940). Posteriormente, em 1963, sua presença foi detectada nas raízes da *Poligonum cuspidatum* Sieb, uma planta muito utilizada na medicina chinesa e japonesa (NONOMURA; KANAGAWA; MAKIMOTO, 1963). Em 1972, Tyukavki *et al.*, encontraram o resveratrol nas cascas de *Pinus sibirica*, quando pesquisavam a presença de pinostilbeno. Em 1976, foi detectada pela primeira vez a presença do *trans*-resveratrol em uva (*Vitis vinifera*) e em outros membros da família Vitaceae (LANGCAKE; PRYCE, 1977). Em 1977, os mesmos autores sintetizaram *in vitro* o  $\epsilon$ -viniferin. Dois anos depois, identificaram o *trans*-pteroestilbeno. Em 1995, um novo derivado estilbeno denominado resveratrol triacetato (3,4', 5-triaceto-hidroxi-estilbeno) foi encontrado em uma esponja vermelha, *Kirkpatrickia varilosa* na Antártida (JAYATILAKE; BAKER; MCCLINTOCK, 1995). O resveratrol também está presente em alguns alimentos naturais, como a uva, a amora e o amendoim. Em particular, quantidade considerável do composto pode ser detectada nos derivados da uva, como o vinho tinto e sucos de uva roxa (LANGCAKE; PRYCE, 1977; HUSKEN *et al.*, 2005).

O resveratrol pode ser encontrado na natureza sob a forma glicosídica e aglicosídica. Como aglicona, há duas formas isoméricas: o *trans*-resveratrol (III) e o *cis*-resveratrol (IV). Os isômeros possuem diferentes efeitos biológicos, e também diferem em relação à estabilidade química. O isômero *trans*-resveratrol é mais estável que o *cis*-resveratrol; esta característica é a responsável pela falta comercial do isômero *cis*. Entretanto, o *cis*-resveratrol pode ser obtido do *trans*-resveratrol a partir de radiação ultravioleta (UV) por um período de 5-8 horas (CAMONT *et al.*, 2009).



III



IV

Inicialmente caracterizado como uma fitoalexina, o resveratrol atraiu pouco interesse até 1992, quando se postulou que o vinho tinto exercia efeitos cardioprotetores (SIEMANN; CREASY, 1992). Desde então vários estudos vêm demonstrando que o resveratrol pode prevenir ou diminuir a progressão de uma ampla variedade de doenças, incluindo o câncer (JANG *et al.*, 1997), doenças cardiovasculares (BRADAMANTE; BARENGHI; VILLA, 2004) e lesões isquêmicas (WANG *et al.*, 2002a), assim como aumenta a resistência ao estresse e prolongar a expectativa de vida de diferentes organismos vivos, de leveduras (HOWITZ *et al.*, 2003) a vertebrados (VALENZANO *et al.*, 2006). A maioria desses estudos utiliza o *trans*-resveratrol devido à instabilidade do isômero *cis*, entretanto estudos indicam diferentes efeitos biológicos para os dois isômeros (CHEN *et al.*, 2007).

### 1.3.1 Potencial terapêutico do resveratrol

#### 1.3.1.1 Resveratrol e o câncer

Em 1997, relatou-se a habilidade do *trans*-resveratrol em inibir a carcinogênese em múltiplos estágios em animais, onde a aplicação tópica reduzia os tumores de pele e que sua utilização sistêmica inibia a iniciação e o desenvolvimento de vários tipos de tumores (JANG *et al.*, 1997). Os resultados sugeriram que, mesmo em baixas doses, como as obtidas através da dieta, semelhante ao consumo diário de vinho tinto, o *trans*-resveratrol era terapêutico em alguns casos (JANG *et al.*, 1997). Proposto para essa ação quimiopreventiva, com um papel na inibição da vascularização e crescimento do tumor (BRAKENHIELM; CAO; CAO, 2001), baseava-se na inibição da atividade de enzimas chaves no processo de carcinogênese, como a cicloxigenase (COX1 e COX2) e a ornitina descarboxilase (ODC) (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998; STEWART *et al.*, 1999), as quais agem como promotoras dos mecanismos de angiogênese.

Outro mecanismo pelo qual o *trans*-resveratrol parece combater a formação do tumor envolve a suspensão do ciclo celular, induzindo as células a apoptose. Este efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico em linhagens de células

tumorais tem sido extensivamente documentados sendo caracterizados pela diminuição das proteínas do ciclo celular *in vitro* (AGGARWAL *et al.*, 2004) e aumento das proteínas da apoptose em modelos de tumores *in vivo* (YU *et al.*, 2003)

Como mais adiante será descrito, o resveratrol tem mostrado capacidade antioxidante intrínseca, envolvendo a modulação de enzimas antioxidantes que pode ser descrita como um efeito quimiopreventivo. *In vivo*, o resveratrol aumenta a capacidade antioxidante no plasma e diminui a peroxidação lipídica (WENZEL *et al.*, 2005; SENGOTTUVELAN; VISWANATHAN; NALINI, 2006).

#### 1.3.1.2 Resveratrol e doenças cardíacas

O consumo regular de vinho e os estudos sobre a influência do vinho na saúde estão diretamente vinculados ao “Paradoxo Francês”, fenômeno relacionado à baixa incidência de distúrbios cardiovasculares (DC) entre os franceses que consomem alimentos ricos em gorduras saturadas e alta quantidade de vinhos (RENAUD; DELORGERIL, 1992; RENAUD; RUF, 1994). Estudo piloto entre as populações francesa e escocesa creditavam a baixa mortalidade relacionada à DC ao álcool presente no vinho (RENAUD; DELORGERIL, 1992). Estudos posteriores concluíram que o efeito do etanol do vinho é inversamente proporcional aos DC, mas não à longevidade da população (CRIQUI; RINGEL, 1994).

Embora o consumo regular de bebidas alcoólicas não seja visto como benéfico à saúde, estudos epidemiológicos indicam que o consumo regular de vinho tinto confere benefícios adicionais significantes à saúde cardiovascular (GRONBAEK *et al.*, 1995; BOHM; ROSENKRANZ; LAUFS, 2004).

Extratos de uva e vinho diminuem a agregação plaquetária. Esta quando em excesso, pode levar à formação de trombos, com subsequente bloqueio dos vasos sanguíneos, produzindo isquemia, infarto do miocárdio ou acidente vascular (SEIGNEUR *et al.*, 1990). Em estudos *in vitro*, enquanto o resveratrol preveniu a agregação plaquetária, sua administração sistêmica em ratos sob dieta hipercolesterolêmica bloqueou o aumento da agregação plaquetária e reduziu a área arterosclerótica e o tamanho dos trombos (WANG *et al.*, 2002b).

### 1.3.1.3 Resveratrol como antioxidante

A oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) é fortemente associada ao aumento de risco de doenças coronarianas e infarto do miocárdio. O resveratrol, além de capturar ROS, atua prevenindo a oxidação do LDL *in vitro* pelo mecanismo de quelação do cobre (HOLVOET, 2004). Ainda, resultados demonstram que o resveratrol pode suprimir o aumento da peroxidação de lipídeos e outras macromoléculas *in vivo* (FRANKEL; WATERHOUSE; KINSELLA, 1993).

O resveratrol atua sobre uma enzima denominada lipoxigenase. Esta enzima possui duas atividades independentes que são a dioxigenase, relacionada com a indução da oxidação, e a hidroperoxidase, envolvida na detoxificação de xenobióticos. O resveratrol atua como antioxidante e inibidor da atividade dioxigenase da lipoxigenase, mas não sobre a atividade hidroperoxidase (PINTO; GARCIA-BARRADO; MACIAS, 1999).

Testes relacionando a ação antioxidante na peroxidação de lipídeos induzidas por íons ferro pelo resveratrol indicaram um efeito mais efetivo do que o observado pelo butilhidroxitolueno (BHT), pela quercetina ou o  $\alpha$ -tocoferol (BLOND; DENIS; BEZARD, 1995), compostos clássicos desse tipo de atividade.

Efeito antioxidante sinérgico do resveratrol pode ser obtido através da associação com outros antioxidantes, como foi demonstrado em estudos sobre protetores contra o estresse oxidativo em culturas de células PC12, onde sua associação com a vitamina C e/ou a vitamina E levou a um efeito superior ao observado para essas substâncias quando testadas isoladamente (CHANVITAYAPONGS; DRACZYNSKALUSIAK; SUN, 1997).

### 1.3.1.4 Resveratrol na reposição hormonal

Devido à similaridade estrutural entre o resveratrol e o dietilestilbestrol (GEHM *et al.*, 1997)), testou-se a possibilidade desse composto atuar como um fitoestrógeno. De fato, resultados sugeriram que o resveratrol possui ação estrogênica.

O efeito do resveratrol no crescimento de células cancerosas de mama foi avaliado e os resultados mostraram que este estilbeno é agonista parcial do receptor de estrogênio (ER). Entretanto, na presença de estrogênio, atua como antagonista ER, levando à inibição do crescimento de células tumorais de mama (LU; SERRERO, 1999).

Segundo (RATNA; SIMONELLI, 2002)), o resveratrol é um potente antagonista do estrogênio nas concentrações de 10-1000  $\mu\text{mol/kg}$ , ele atua de forma similar ao estrogênio na expressão do fator estabilizante do RNAm regulador de estrogênio (E-RmRNASF). Deste modo, pode ser administrado concomitantemente para reduzir os níveis de estrogênio administrados após a menopausa. Além disso, (MIZUTANI; IKEDA; YAMORI, 2000) afirmam que o resveratrol poderia conferir efeito cardioprotetor no sistema cardiovascular e, por isto, ser clinicamente útil como um substituto para o estrogênio na prevenção de doenças cardiovasculares.

#### 1.3.1.5 Resveratrol na inflamação e imunidade

Muitas doenças possuem um componente inflamatório. A inflamação é o problema central em patologias como artrite, doença de Crohn's e psoríase, por exemplo, além de influir no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e no câncer. As enzimas cicloxigenases, COX1 e COX2 e também a 5-lipoxigenase, são cruciais na produção de moléculas pró-inflamatórias. Quando há exacerbação da resposta inflamatória, inibidores dessas enzimas são comumente usados e o resveratrol *in vitro* tem-se demonstrado como um eficiente inibidor da atividade da cicloxigenase (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; KHANDUJA; BHARDWAJ; KAUSHIK, 2004), apresentando-se como uma alternativa potencial no tratamento de inflamações crônicas. Uma opção interessante seria, então, usufruir deste potencial de inibidor seletivo da COX2 para evitar problemas gástricos que ocorre com a maioria dos anti-inflamatórios não seletivos, já que os inibidores seletivos da COX2, desenvolvidos para evitar esses problemas gástricos, têm sido vinculados à complicações cardiovasculares (DAVIES; JAMALI, 2004; KIMMEY, 2004).



Associado aos efeitos supressivos em processos inflamatórios, o resveratrol melhorou a resposta imune em ratos tratados com dinitrofluorobenzeno em reações de hipersensibilidade, preveniu a imunossupressão por etanol (FENG *et al.*, 2002) e protegeu camundongos de infecções por vírus herpes tipos HSV1 e HSV2 (DOCHERTY *et al.*, 2004; DOCHERTY *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.6 Resveratrol no derrame e lesão cerebral

Experimentos realizados em ratos demonstraram que tratamento com resveratrol levou a menor dano motor e significativa diminuição do volume infartado (SINHA; CHAUDHARY; GUPTA, 2002). Esses estudos sugerem, portanto, que o resveratrol, mesmo em baixas doses é capaz de penetrar a barreira hemato-encefálica, protegendo o cérebro contra danos causados por processos de isquemia cerebral.

#### 1.3.1.7 Resveratrol e outros efeitos biológicos

Estudos adicionais indicam que os efeitos benéficos do resveratrol não estão restritos ao coração e ao cérebro como acima revisto. Em adição a esses efeitos, há relatos de ação analgésica (GENTILLI *et al.*, 2001), proteção contra a perda de audição (SEIDMAN *et al.*, 2003) e melhoria da anorexia induzida por lipopolissacarídeos em ratos (LUGARINI *et al.*, 2002). Ainda, o resveratrol demonstrou redução de doenças renais (GIOVANNINI *et al.*, 2001), da medula espinhal (YANG; PIAO, 2003), fígado (FULGENZI *et al.*, 2001), pulmões (MCCLINTOCK; TILL; WARD, 2001), intestino (KOROLKIEWICZ *et al.*, 2003; KOROLKIEWICZ *et al.*, 2004) e cólon (MARTIN *et al.*, 2004).

#### 1.3.2 Absorção e biodisponibilidade do resveratrol

Não existe comprovação de que o resveratrol ingerido oralmente realmente alcance, além do trato gastrointestinal humano, os múltiplos sítios de ação propostos (GESCHER; STEWARD, 2003; GOLDBERG; YAN; SOLEAS, 2003).

Um estudo realizado por (WALLE *et al.*, 2004) em voluntários adultos, saudáveis, do sexo masculino, com a administração de doses orais e intravenosas de resveratrol, demonstrou que esse apresenta alta taxa de absorção, sendo metabolizado rápida e extensivamente, resultando em concentrações plasmáticas muito reduzidas. Foi observado grande acúmulo de resveratrol nas células epiteliais ao longo do aparelho digestório e, também, quantidades significativas de metabólitos potencialmente ativos foram detectadas no sistema circulatório, podendo assim produzir os efeitos cardiovasculares e no câncer como descrito.

Um fator importante a ser analisado é o sítio de ação do resveratrol. Estudos relativos à ação em câncer de cólon mostraram o acúmulo em células Caco-2, linhagem esta de células epiteliais do intestino, enfatizando que enterócitos e colonócitos são os sítios de ligação dessa substância. Isso também ocorre em outras células epiteliais distribuídas ao longo do aparelho digestório, como as orais e esofágicas (KALDAS; WALLE; WALLE, 2003). A rápida absorção realizada por essas células deve ocorrer durante o período de tempo em que a substância transita durante a ingestão oral (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011).

Estudos recentes (WALLE, 2011) demonstraram que a absorção do resveratrol administrado por via oral em humanos é de 75% e essa absorção ocorre principalmente por difusão transepitelial, com um extenso metabolismo ocorrendo no fígado e intestino resultando em uma biodisponibilidade do resveratrol de menos de 1%, a administração de doses maiores e repetidas da substância não altera significativamente esse valor de biodisponibilidade.

#### 1.3.2.1 Papel dos transportadores na biodisponibilidade do resveratrol

Numerosos eventos e múltiplos estágios podem ser responsáveis pela diminuição do acesso do resveratrol pelas células, principalmente a

complexação com moléculas extracelulares, como proteínas séricas, ácidos graxos, lipoproteínas ou integrinas (DELMAS *et al.*, 2011).

Devido à sua baixa solubilidade em água, grande quantidade de resveratrol encontra-se, principalmente, ligada a proteínas ou conjugados em altas concentrações no plasma. Entre as proteínas do plasma que desempenham o papel de carreadores plasmáticos para o resveratrol, a albumina é a mais importante, devido à sua afinidade por moléculas anfifílicas (KHAN; MUZAMMIL; MUSARRAT, 2002).

Além da albumina, outras proteínas como as lipoproteínas são também responsáveis pelo transporte do resveratrol. Dentre elas, destaca-se a LDL como já descrito anteriormente. As substâncias fenólicas formariam complexos com a LDL (resveratrol-LDL), o que acarretaria em maior acessibilidade aos radicais da peroxidação lipídica dentro das partículas de LDL, favorecendo uma atividade de “limpeza arterial”, onde o processo de oxidação de LDL comumente ocorre. Ou seja, esses microdomínios seriam retirados por antioxidantes plasmáticos e, dentre eles, estaria o resveratrol administrado (WITZTUM, 1994; BELGUENDOUZ; FREMONT; GOZZELINO, 1998).

O resveratrol também se liga a ácidos graxos, já que o ambiente lipofílico proporcionado por essas substâncias são favoráveis à ligação do resveratrol. Geralmente, os ácidos graxos são usados como vetores, por causa da alta afinidade pelo fígado e da absorção celular eficiente, resultado das interações específicas com transportadores transmembrana (JANNIN *et al.*, 2004).

Embora a absorção do resveratrol em células do fígado, hepatomas e hepatócitos, envolva principalmente um processo de difusão passiva, o transporte dessa substância pode ser mediado pela ligação a receptores, como as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , principalmente o monômero  $\beta_3$ . Este é essencial para a transdução do sinal do estilbeno na apoptose p53-dependente em células do câncer de mama, ou podem contribuir para a atividade angiossupressiva (LIN *et al.*, 2006; BELLERI *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008).

### 1.3.3 Atividades biológicas e estabilidade dos metabólitos do resveratrol

Estudos de farmacocinética e identificação de metabólitos do resveratrol administrado por via oral mostraram níveis detectáveis na urina e no plasma (COTTART *et al.*, 2010). Sulfatos e glucoronídeos são os metabólitos do resveratrol mais frequentemente relatados. Com rápido metabolismo, pelo menos cinco metabólitos foram identificados na urina: monossulfato de resveratrol, *cis*-resveratrol monoglucoronídeo, *trans*-resveratrol monoglucoronídeo, diidroresveratrol e diidroresveratrol monoglucoronídeo. A quantidade e a natureza dos metabólitos podem diferir devido à variabilidade interindividual (WALLE *et al.*, 2004; BOOCOOCK *et al.*, 2007; COTTART *et al.*, 2010).

Na corrente sanguínea os metabólitos podem sofrer um metabolismo de fase II, com mais conversões ocorrendo no fígado, onde o transporte entero-hepático na bile pode resultar em uma reciclagem de volta para o intestino delgado (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; WALLE, 2011). Nas células hepáticas o resveratrol é, após 4 horas, transformado nos derivados mono (3-sulfato-resveratrol) e dissulfato (3,4'-disulfato-resveratrol e 3,5-disulfato), mas conjugados glucoronídeos não são detectados. O resveratrol também é capaz de induzir seu próprio metabolismo pelo aumento da atividade de enzimas desintoxicantes da fase II (LANCON *et al.*, 2007).

O período de meia-vida do resveratrol é de 6,5 – 14,9 horas após doses orais, e de 7,5 – 18,8 horas após doses intravenosas (WALLE *et al.*, 2004). Os metabólitos apresentam meia-vida similar, mas seus níveis plasmáticos, quando comparados ao resveratrol, foram de três a oito vezes mais elevadas nas 4 horas anteriores à fase de eliminação urinária (BOOCOOCK *et al.*, 2007). Apesar da baixa biodisponibilidade, a excelente eficácia do resveratrol *in vivo*, pode ser explicada por: (1) conversão dos metabólitos sulfatos e glucoronídeos de volta para resveratrol em órgãos alvos semelhantes ao fígado (VITRAC *et al.*, 2003; WENZEL *et al.*, 2005; WALLE, 2011); (2) recirculação entero-hepática envolvendo secreção biliar de metabólitos do resveratrol seguida pela desconjugação pela microflora intestinal e, então, reabsorção (MARIER *et al.*, 2002; WALLE, 2011); ou finalmente (3) pela ação direta de seus metabólitos (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011).

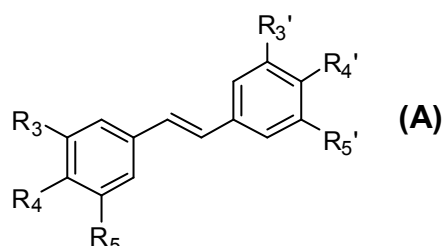
Existem na literatura relatos dos efeitos biológicos e estabilidade dos metabólitos do resveratrol. Essas informações são importantes para esclarecer e

avaliar as propriedades farmacocinéticas e terapêuticas do resveratrol (WALLE *et al.*, 2004).

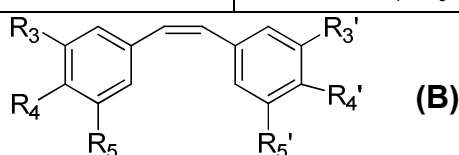
O piceatanol (3,5,3',4'-tetrahidroxiestilbeno) é um polifenol encontrado em uvas e outras plantas (Quadro 1). Em humanos, o piceatanol é produzido como um metabólito principal do resveratrol pela ação das oxigenases CYP1B1 e CYP1A2 e pode também ser encontrado como um produto de oxidação em solução aquosa gasosa quando submetido à radiação gama, gerando  $\text{OH}/\text{O}_2^-$ , os radicais livres envolvidos no estresse oxidativo (CAMONT *et al.*, 2010). Assim como o resveratrol, o piceatanol apresenta propriedades anticancerígenas por indução das vias intrínseca e extrínseca de morte celular e bloqueio da progressão do ciclo celular (WIEDER *et al.*, 2001; WOLTER *et al.*, 2002; LIU; CHANG, 2010).

Os mais abundantes metabólitos glucoronídeos do resveratrol são *trans*-resveratrol-3-O-D-glucoronídeo e *trans*-resveratrol-4'-O-D-glucoronídeo (COTTART *et al.*, 2010). Estudos comprovaram que ao contrário do resveratrol, o 3-O e 4'-O-D-glucoronídeo não são ativos contra células de câncer de cólon. Atividade antiviral em células infectadas com o vírus HIV-1 também não foi comprovada para estas substâncias. Entretanto, mesmo sem apresentar atividade biológica, esses metabólitos podem constituir um reservatório de resveratrol que pode ser liberado pela ação da enzima  $\beta$ -glucuronidase (WALLE *et al.*, 2004).

A atividade biológica dos sulfatos de resveratrol tem sido mais estudada que os glucoronídeos. Recentemente cinco metabólitos sulfatados (mono, di- e tri- sulfatos) foram sintetizados e as atividades biológicas deles testadas em um conjunto de ensaios com a finalidade de analisar a atividade quimiopreventiva no câncer (HOSHINO *et al.*, 2010). Entre os derivados sulfatos, dois demonstraram atividade: o 3 e 4'-monosulfato. O resveratrol-4'-O-sulfato se liga aos sítios da enzima cicloxigenase (COX), inibindo sua atividade com a mesma eficácia do resveratrol (CALAMINI *et al.*, 2010; HOSHINO *et al.*, 2010). O resveratrol-3-O-sulfato é inibidor da COX-1 e citotóxico. Em células de câncer do cólon o resveratrol-3-O-sulfato exerce um efeito antiproliferativo. Resultados demonstram que os metabólitos sulfatados são menos ativos que o resveratrol exceto o resveratrol-3-sulfato. Em geral, as atividades dos metabólitos diminuem com o aumento do número de grupos sulfato (HOSHINO *et al.*, 2010).



3,5,4'-trihidroxi <i>trans</i> -estilbeno ( <i>trans</i> -resveratrol) (E)	R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
3,3',4,5'-tetrahidroxi <i>trans</i> -estilbeno (piceatanol) (E)	R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =OH; R' <sub>4</sub> =R <sub>5</sub> =H
<i>trans</i> -resveratrol-3-O-β-D-glucosídeo ( <i>trans</i> -piceid)(E)	R <sub>5</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>3</sub> = O-B-D-glucosídeo; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
<i>trans</i> -resveratrol-3-O-D-sulfato (E)	R <sub>5</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>3</sub> =SO <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
<i>trans</i> -resveratrol-4'-O-D-sulfato (E)	R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =OH; R' <sub>4</sub> =SO <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
<i>trans</i> -resveratrol-3-O-D-glucoronídeo (E)	R <sub>5</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>3</sub> =glucoronídeo R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
<i>trans</i> -resveratrol-4-O-D-glucoronídeo (E)	R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =OH; R' <sub>4</sub> =glucoronídeo R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H



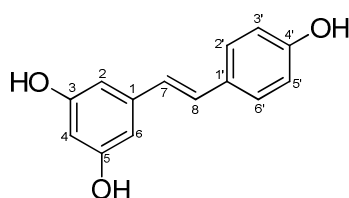
<i>cis</i> -3,5,4'-trihidroxi estilbeno ( <i>cis</i> -resveratrol) (Z)	R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H
<i>cis</i> -3,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno ( <i>cis</i> -piceatanol) (Z)	R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =OH; R' <sub>4</sub> =R <sub>5</sub> =H
<i>cis</i> -resveratrol-3-O-β-D-glucosídeo ( <i>cis</i> -piceid) (Z)	R <sub>5</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>4</sub> =OH; R <sub>3</sub> =O-B-D-glucosídeo; R <sub>4</sub> =R' <sub>3</sub> =R' <sub>5</sub> =H

QUADRO 1- ESTRUTURA QUÍMICA DO resveratrol, SEUS METABÓLITOS E DERIVADOS NAS FORMAS *trans*-(A) OU *cis*- (B)

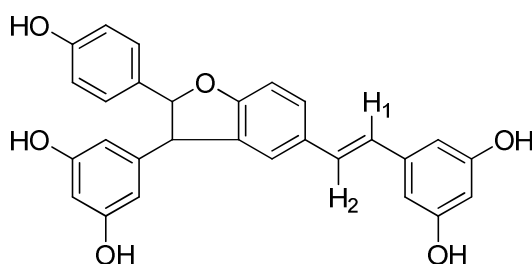
FONTE: (DELMAS *et al.*, 2011)

Em relação à estabilidade do resveratrol e de seus metabólitos, análises demonstram que a molécula original é degradada em aproximadamente 20% após o tempo de incubação *in vitro*; os derivados sulfatados são relativamente mais estáveis (HOSHINO *et al.*, 2010). Entretanto, o resveratrol-3-sulfato sofre rápida degradação após exposição à luz UV e certa instabilidade após 72 horas em temperatura ambiente no escuro, ou quando exposto à luz visível ou ar (WALLE *et al.*, 2004).

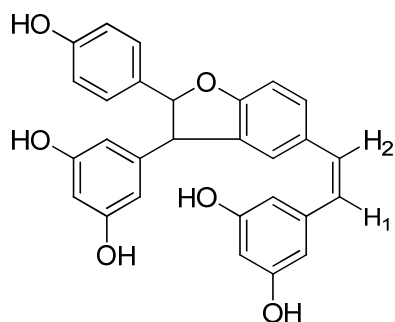
Alguns trabalhos de biotransformação do resveratrol são descritos na literatura. Em um deles o resveratrol (**III**) foi metabolizado por enzimas lacases, como a estilbeno oxidase, (PEZET; PONT; HOANGVAN, 1991) produzida pelo microrganismo *Botrytis cinerea*. Estudos realizados por (BREUIL *et al.*, 1998) utilizando o mesmo microrganismo resultaram no isolamento de dehidrodímeros dessa substância, o *trans*-dehidrodímero do resveratrol (**V**) e resveratrol *cis*-dehidrodímero (**VI**). A enzima lacase produzida pelo microrganismo *B. cinerea* é *p*- e *o*-difenol-oxidase (MAYER; HAREL, 1979; MAYER, 1987). Os resultados desse trabalho sugerem que o resveratrol sofre dimerização oxidativa durante a degradação induzida pelo microrganismo em videiras o que leva a formação do *trans*- $\epsilon$ -viniferin um composto encontrado em uvas (LANGCAKE; PRYCE, 1977), e que o acoplamento de duas unidades de resveratrol envolve os grupos fenólicos situados na posição 4 do anel estilbeno. Assim o mecanismo de oxidação provocado no resveratrol por lacases de *B. cinerea* resultam na dimerização de unidades de estilbeno substituídas na posição *p*-hidroxi (BREUIL *et al.*, 1998).



(III)



(V)

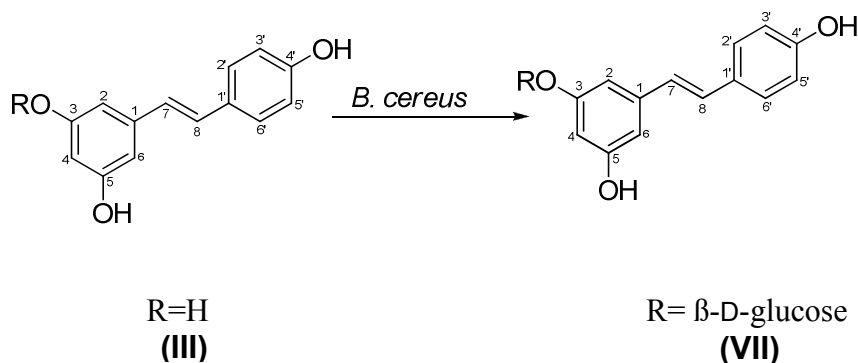


(VI)

Outro trabalho realizado por (CICHEWICZ; KOUZI, 1998) relata a introdução de uma molécula de  $\beta$ -D-glucose na estrutura original do *trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno (III) utilizando doze culturas de cepas diferentes da bactéria *Bacillus cereus*, porém das doze somente a *Bacillus cereus* UI 1477 foi capaz de modificar a molécula do *trans*-resveratrol formando o metabólito *trans*-piceid (VII) (Esquema 2), previamente isolado várias espécies de plantas (JAYATILAKE *et al.*, 1993) e também sintetizado (MANNILA; TALVITIE; KOLEHMAINEN, 1993). Esse composto tem ampla variedade de atividades biológicas (JAYATILAKE *et al.*, 1993; KIMURA; OKUDA; KUBO, 1995; MERILLON *et al.*, 1997; ORSINI *et al.*, 1997).

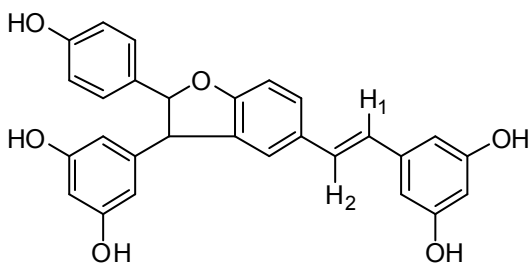
Estudos como este, possuem como objetivo a síntese de análogos potencialmente mais ativos no organismo humano que a substância original, nesse caso o resveratrol, utilizando para essa finalidade culturas microbianas *in vitro*, ou seja, o processo de biotransformação (CICHEWICZ; KOUZI, 1998). Esses análogos ou metabólitos do resveratrol podem possuir uma biodisponibilidade maior que o mesmo já que essa é a principal desvantagem do resveratrol, portanto análogos podem se tornar mais biodisponíveis devido a alterações estruturais e conseqüentemente exercer um efeito terapêutico maior (THAKKAR; GEAHLEN; CUSHMAN, 1993; ORSINI *et al.*, 1997).





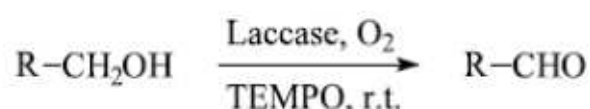
ESQUEMA 2- BIOTRANSFORMAÇÃO DO RESVERATROL EM PICEID.  
 FONTE: (CICHEWICZ; KOUZI, 1998)

Modificações na estrutura do resveratrol, visando um aumento na sua biodisponibilidade estão sendo feitas continuamente por síntese química (OHGUCHI *et al.*, 2003; ANDRUS; LIU, 2006; HORVATH *et al.*, 2007; FAIS *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2010) e também, com utilização de enzimas purificadas extraídas de microrganismos (NICOTRA *et al.*, 2004; WILKENS *et al.*, 2009; NAVARRA *et al.*, 2010). Uma dessas reações de biocatálise foi realizada utilizando enzimas lacases isoladas dos microrganismos *Mycelyophthora thermophyta* e *Trametes pubescens*, a reação de biocatálise do resveratrol na presença da enzima levou a obtenção do resveratrol-*trans*-dehidrodímero (**V**) demonstrado a seguir (NICOTRA *et al.*, 2004). O mesmo composto obtido no processo de biotransformação realizado por (BREUIL *et al.*, 1998) utilizando o microrganismo *Botrytis cinerea* em experimentos de biotransformação com o resveratrol.



**(V)**

Lacases são oxidorreduções (conhecidas como “oxidases azul”), um tipo de enzima encontrada em fungos, bactérias e algumas plantas superiores. Elas são capazes de catalisar a oxidação de várias substâncias fenólicas (MAYER; STAPLES, 2002). As lacases demonstram uma versatilidade excepcional de substratos que são capazes de utilizar tornando-se, portanto biocatalisadores potencialmente adequados para oxidação branda de compostos orgânicos. Até agora a principal limitação para o seu uso tem sido a escassa disponibilidade, no entanto, principalmente para satisfazer a demanda de processos “verdes” na indústria têxtil, de papel e celulose algumas dessas enzimas têm sido clonadas e produzidas e estão se tornando comercialmente disponíveis. Na literatura existem relatos em relação às aplicações sintéticas das lacases que podem ser divididas em dois grupos. No primeiro estas enzimas são usadas para oxidar uma substância química adequada 2,2',6,6' tetrametilpiperidina-*N*-oxil (Tempo) que volta como um “mediador” para a oxidação de alvos sintéticos, um exemplo é a lacase mediando a produção de aldeídos a partir do correspondente álcool (FABBRINI *et al.*, 2001).



A segunda aplicação descreve a oxidação direta de derivados fenólicos, como estradiol e penicilina produzindo dímeros e oligômeros de alto peso molecular, as principais desvantagens destes processos biocatalíticos são as extensas polimerizações que possam surgir no processo oxidativo gerando uma mistura complexa de oligômeros de polifénóis (AKTAS *et al.*, 2001).

Outro exemplo de trabalho de biocatálise utilizando enzimas isoladas foi realizado por (NAVARRA *et al.*, 2010), esses pesquisadores realizaram a oxidação dos compostos fenólicos: *p*-cresol; 3,4-dimetilfenol, tirosol e 2'-*O*-acetil-tirosol, mediada por enzimas lacases isoladas obtidas comercialmente.

A obtenção do *trans*-dehidrodímero do resveratrol, realizada por Nicotra e colaboradores, foi reproduzido em 2009 através do processo de

biotransformação do resveratrol, utilizando enzimas peroxidases adquiridas comercialmente (WILKENS *et al.*, 2009).

Devido às diversas atividades biológicas do resveratrol e sua baixa biodisponibilidade *in vivo*, mudanças na sua estrutura química visando uma maior atividade terapêutica se torna necessária. Considerando o pequeno número de estudos com biotransformação do resveratrol descritos na literatura, resolvemos usar esta técnica para a modificação na estrutura do *trans*-resveratrol visando uma melhora na sua biodisponibilidade e/ou alterar suas atividades biológicas. Para isso foi utilizado o processo de biotransformação com células de diferentes gêneros de fungos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter derivados bioativos do resveratrol por biotransformação com fungos selecionados e avaliar a atividade citotóxica desses derivados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Selecionar fungos que possam ser utilizados em processo de biotransformação.
- ❖ Selecionar aqueles que apresentem desenvolvimento adequado às condições necessárias ao processo de biotransformação.
- ❖ Em escala analítica, submeter o *trans*-resveratrol ao processo de biotransformação com os fungos selecionados.
- ❖ Analisar por CCD a produção de metabólitos originados do *trans*-resveratrol pelo processo de biotransformação.
- ❖ Selecionar os fungos produtores de metabólitos obtidos em escala analítica e submetê-los ao mesmo processo, mas em escala preparativa.
- ❖ Isolar, purificar e caracterizar os metabólitos produzidos por métodos cromatográficos e técnicas espectroscópicas.

- ❖ Avaliar o potencial biológico dos derivados obtidos em ensaios preliminares de proliferação celular em sistema de cultura *in vitro* usando células McCoy, Hela e B16F10 e comparar o potencial biológico dos derivados obtidos com o do *trans*- resveratrol.

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

##### a) Suportes para cromatografia:

O tipo de fase estacionária utilizada variou de acordo com o tipo de separação:

- ❖ Nas separações realizadas por cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC) utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, lote. 7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica com 1 mm de espessura.
- ❖ Para cromatografia líquida a vácuo realizada em coluna, utilizou-se sílica Si-60 (Merck), partículas 5-40 µm. Para cromatografia líquida por gravidade realizada em colunas finas, foi utilizado sílica Si-60 (Merck) partículas 0,040-0,063 mm.
- ❖ Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se Si-60 PF254 (Merck) como adsorvente, com espessura de 0,2 mm.

##### b) Solventes:

Para as extrações e sistemas cromatográficos foram utilizados solventes de grau comercial, os quais foram destilados antes do uso. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando solventes deuterados da Acros e Sigma (98.0-99,9%), nos espectros de massa foram utilizados solventes UV/HPLC (Vetec®, Brasil).

##### c) Reveladores de CCD:

As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução de vanilina sulfúrica (vanilina, etanol e ácido sulfúrico) e aquecimento.

d) Meios de cultivo dos fungos:

Para a manutenção dos microrganismos, foram utilizados os meios de cultura BDA (Biobrás). Para o processo de biotransformação, usou-se glucose anidra (20 g/L - Biotec), extrato de malte (8 g/L) e extrato de levedura (4 g/L).

e) Os fungos utilizados nos experimentos foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Ida Chapaval Pimentel, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

### 3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

a) Chromatotron:

A cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC) foi realizada em aparelho Chromatotron.

b) Espectrômetros de RMN:

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DRX 200 e Bruker Avance DPX 400, operando a 4,7 e a 9,4 Tesla, respectivamente.

c) Equipamento de InfraVermelho (IV)

Os espectros no IV foram obtidos em aparelho Bruker, modelo Vertex 70, operando no modo de transmitância. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de (KBr) e os resultados expressos em número de onda (cm<sup>-1</sup>).

d) Espectrômetro de massa

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento Bruker Compass (quadropolo, modo negativo, electrospray-ESI) do laboratório de espectrometria de massas (Centro de Biologia Molecular Estrutural) da UFSC.

e) Autoclaves verticais:

Para esterilização dos materiais e dos meios de cultura, foi utilizada autoclave vertical Phoenix.

f) Câmara de fluxo laminar:

As manipulações dos microrganismos foram realizadas em cabine de segurança biológica (Trox technic M536-AD4).

g) Agitador incubador orbital:

Os experimentos foram realizados em agitador-incubador orbital Tecnal TE-421 a 28° C e 150 rpm.

h) Rotaevaporador:

A eliminação dos solventes nos extratos e frações foi realizada em evaporador rotativo Tecnal TE-210.

i) Ultrassom:

Ultra-sônica Cleaner Unique USC700 foi usado para dissolução da amostras.

j) Fotômetro de microplaca

Para leitura espectrofotométrica dos ensaios de avaliação da proliferação celular utilizou-se o leitor de microplacas Multiskan Fc, Thermo Scientific.

### 3.3 SUBSTRATO

O *trans*-resveratrol utilizado como substrato para a biotransformação foi adquirido da empresa Pharmanostra, e obtido das raízes de *Polygonum cuspidatum* Sieb., originária da China e foi caracterizado por EM, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT 135 e IV.

### 3.4 MÉTODOS

#### 3.4.1 Biotransformação em escala analítica (*screening*)

### 3.4.1.1 Manutenção das cepas

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em meio de cultura sólido BDA. Para a ativação metabólica dos fungos, a cada 15 dias, novo meio de cultura foi preparado e nova inoculação foi realizada.

### 3.4.1.2 Fungos

Nos experimentos em escala analítica, dezenove cepas de diferentes fungos, descritos no Quadro 2, foram usadas:

QUADRO 2: FUNGOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS EM ESCALA ANALÍTICA

1	<i>Acremonium</i> 321
2	<i>Acremonium</i> 193
3	<i>Aspergillus</i> S 195
4	<i>Chartomium</i> 56
5	<i>Dematium</i> sp. 328
6	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
7	<i>Geotrichum</i> sp. 168
8	<i>Fusarium</i> 162
9	<i>Penicillium</i> sp. 64
10	<i>Gibberella</i> LB3
11	LB3-2b
12	LB3A- <i>Penicillium</i> sp.
13	LB3B- <i>Penicillium</i> sp.
14	LB3-12 a
15	LB3C- <i>Penicillium</i> sp.
16	LB3- <i>Fusarium</i> sp.
17	LB3- <i>Mycelia sterilia</i>
18	LB3-19 a
19	LB3-20 a

### 3.4.1.3 Experimentos em escala analítica

Inicialmente foram preparados 2 L de meio de cultura, constituído de glucose anidra, extrato de malte e extrato de levedura, o qual foi esterilizado em autoclave por 15 minutos, a 121° C e 1 kg.F/cm<sup>2</sup> de pressão. Sob esterilidade, cada fungo foi inoculado em dois frascos contendo 50 mL de meio, um como teste e um controle; os frascos foram mantidos sob rotação constante de 150 rpm, a 28° C, por um período que variou de 24 a 72 horas (Tabela 1).

TABELA 1: TEMPO DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS APÓS INOCULAÇÃO

Nº	Fungos selecionados	Tempo de crescimento
1	<i>Acremonium</i> sp. (321)	72 horas
2	<i>Acremonium</i> sp. (193)	48 horas
3	<i>Aspergillus</i> sp. (S 195)	24 horas
4	<i>Chartomium</i> sp. (56)	48 horas
5	<i>Dematium</i> sp. (S 328)	48 horas
6	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	72 horas
7	<i>Geotrichum</i> sp. (S 168)	48 horas
8	<i>Fusarium</i> sp. (162)	24 horas
9	<i>Penicillium</i> sp. (64)	72 horas
10	<i>Gibberella</i> sp. (LB3)	48 horas
11	LB3-2b	48 horas
12	<i>Penicillium</i> sp.(LB3A)	24 horas
13	<i>Penicillium</i> sp.(LB3B)	72 horas
14	LB3-12 a	Não houve crescimento
15	<i>Penicillium</i> sp.(LB3C)	48 horas
16	<i>Fusarium</i> sp.	72 horas
17	<i>Mycelia sterilia</i>	48 horas
18	LB3-19 a	48 horas
19	LB3-20 a	48 horas

Após o período de crescimento peculiar de cada fungo, foram adicionados nos frascos testes 0,5 mL de uma solução de *trans-resveratrol* em acetona (20 mg/mL). Nos frascos controle foi adicionado somente o solvente acetona.



Os fungos foram mantidos em agitador orbital a 150 rpm e 28 °C por mais 7 dias. O caldo foi então filtrado em funil de Büchner e o micélio lavado com água destilada (20 mL), com clorofórmio (3 X 20 mL) e acetato de etila (3 X 20ml). O filtrado foi transferido para um funil de separação e foi extraído com clorofórmio (2 X 20 mL) e com acetato de etila (3 X 20 mL).

As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas à secura. O extrato foi então analisado por CCD, onde se fez a comparação entre as amostras testes e controle. A fase aquosa foi descartada no final.

### 3.4.2 Biotransformação em escala preparativa

Dos fungos testados, somente as cepas de *Bipolaris sorokiniana* e de *Penicillium* sp. (64) apresentaram a formação de compostos visualizados por CCD. Dessa forma, esses fungos foram selecionados e pré-inoculados individualmente em frascos contendo 50 ml de meio de cultura, que foram mantidos em agitação contínua por 48 horas, a 28° C, a 150 rpm. Esta metodologia está ilustrada na Figura 2.

Após esse período, foram transferidos para frascos com cerca de 200 mL de meio de cultura e incubados por 48 horas; em seguida, 4 ml da solução de *trans*-resveratrol previamente dissolvidos em acetona (20 mg/mL) foram adicionados em cada frasco, totalizando ao final dezesseis frascos para cada fungo, sendo que um frasco foi mantido como controle negativo (Figura 3).

Após sete dias os caldos foram filtrados em funil de Büchner e o micélio foi lavado com 50 mL de água destilada, 100 mL de clorofórmio e 100 ml de acetato de etila e depois sonicado com 50 mL de acetato de etila (Figura 4). O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído com clorofórmio (3 X 100 mL) e com acetato de etila (3 X 100 mL). As frações orgânicas foram agrupadas e o solvente evaporado.

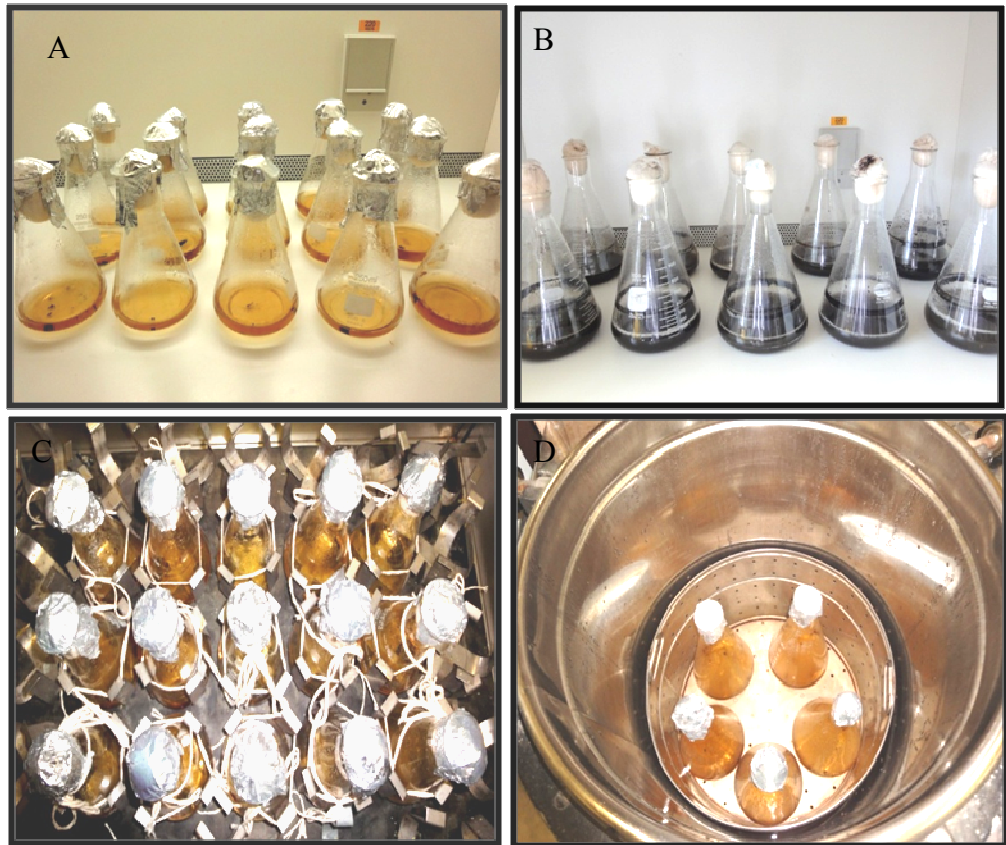


FIGURA 2- PROCESSO UTILIZADO PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans-resveratrol* POR MEIO DAS ESPÉCIES *Bipolaris sorokiniana* e *Penicillium* sp. (64); (A) INOCULAÇÃO DOS FUNGOS; (B) BIOMASSA DO FUNGO *Bipolaris sorokiniana* AO TÉRMINO DA BIOTRANSFORMAÇÃO; (C) FRASCOS MANTIDOS EM AGITADOR; (D) FRASCOS SENDO AUTOCLAVADOS



FIGURA 3- ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO, MOSTRANDO DETALHES DO CRESCIMENTO FÚNGICO ANTES DA EXPOSIÇÃO AO *trans-resveratrol*

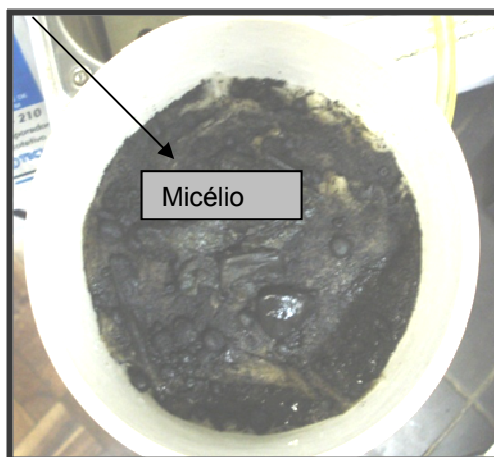


FIGURA 4- MICÉLIO DE *B. sorokiniana*. APÓS FILTRAÇÃO

#### 3.4.2.1 Isolamento, purificação e identificação dos metabólitos

Os isolamentos dos metabólitos gerados por biotransformação foram realizados por CCD, CCDC (Figura 5), cromatografia líquida a vácuo e cromatografia em coluna. Sua caracterização foi feita por RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HSQC, HMQC, IV e espectrometria de massa (EM).

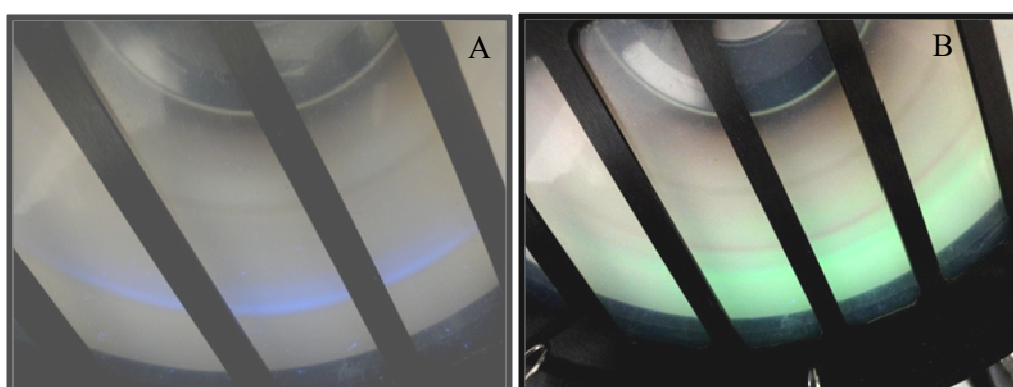


FIGURA 5- PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS POR CROMATOGRÁFIA CENTRÍFUGA; (A) VISUALIZAÇÃO EM 254 NM; (B) VISUALIZAÇÃO EM 380 NM

### 3.4.3 Atividades biológicas do *trans*-resveratrol e dos derivados obtidos

Para determinação do efeito de proliferação celular do *trans*-resveratrol, do *trans*-dehídrodímero do resveratrol e do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo obtidos no processo de biotransformação foram utilizadas (1) células de melanoma murino B16F10, gentilmente cedidas pela Professora Dra. Gláucia R. Martinez, Dep. de Bioquímica, UFPR, (2) células Hela, originadas de carcinoma epidermóide do colo de útero, e (3) células McCoy, uma linhagem de fibroblastos de camundongo, ambas adquiridas do Instituto Adolfo Lutz. O controle dos cultivos foi monitorado em microscópio óptico invertido BIOVAL, modelo XDS-1B.

#### 3.4.3.1 Soluções

##### Meio RPMI 1640

Meio de cultivo RPMI 1640 (Himedia, Japão) foi dissolvido em água ultra pura obtida em Sistema MilliQ, conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com 2 mM de bicarbonato de sódio, 0,3g de penicilina G e 100 mg/ml mg de sulfato de estreptomicina. O pH foi ajustado com solução de NaOH 1N para 7,2. O meio foi esterilizado por filtração a vácuo em fluxo laminar e armazenado a  $-10^{\circ}$  C. Quando em uso, foi armazenado de  $4-8^{\circ}$  C por, no máximo, 14 dias. Para a manutenção dos cultivos, RPMI 1640 foi suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP).

##### Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco A

A solução tampão (PBS) foi preparada dissolvendo-se cloreto de potássio (KCl) 2g/L, fosfato diácido de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2g/L, cloreto de sódio (NaCl) 80 g/L e fosfato dibásico de sódio ( $\text{Na}_2\cdot\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22g/L em água ultra pura. A esterilização da solução foi realizada em autoclave e a mesma foi armazenada a  $4-8^{\circ}$  C.

##### Solução de tripsina-EDTA a 0,05%

Tripsina 195 U/mg (Worthington Biochemical Corporation) 195 U/mg, foi dissolvida na proporção 1:400 em PBS. A solução foi diluída na proporção 1:5 com PBS contendo 0,02 g de EDTA dissódico, obtendo-se uma solução de tripsina a 0,05% que, em seguida, foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro e mantida a  $-30^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### Soluções-Estoque de Resveratrol e derivados

As substâncias *trans*-resveratrol, *trans*-dehidrodímero e *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo foram inicialmente preparadas na concentração de 0,05M em DMSO; posteriormente, foram diluídas em meio RPMI 1640 contendo 0,1% de DMSO e mantidas a  $-30^{\circ}\text{C}$  e ao abrigo de luz até uso.

#### Solução de MTT

A solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio foi preparada em PBS a 5 mg/mL e armazenada a  $-25^{\circ}\text{C}$  até uso.

#### 3.4.3.2 Manutenção das linhagens B16F10, Hela e McCoy

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 300 mg/L de penicilina G, 300 mg/L de sulfato de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, a  $37^{\circ}\text{C}$  em garrafas de 25  $\text{cm}^2$  (TPP, Suíça) em um volume de 10 mL/frasco. A cada 3-4 dias, as culturas foram repicadas a  $3 \times 10^4$  células/mL após tripsinização com solução de tripsina-EDTA 0,05%.

#### 3.4.3.3 Proliferação celular

Para os ensaios de proliferação celular,  $10^5$  células/ml células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Quando apresentando confluência de cerca de 80%, as células foram tratadas com concentrações crescentes (12,5 a 800  $\mu\text{M}$ ) de cada substância por 24 horas. A proliferação celular foi determinada pelo ensaio

colorimétrico do MTT, baseado na metodologia de Mosmann (1983) com algumas modificações

As células foram tratadas por 3 horas com solução de MTT (15 µL/poço). Em seguida, o sobrenadante foi removido e 150 µL/poço de DMSO foram adicionados; a placa ficou sob agitação por 15 minutos e, em seguida, submetida à leitura espectrofotométrica a 570nm. Neste ensaio quando a cultura celular transforma o MTT em formazan (de coloração púrpura), e a absorvância é lida em 570 nm, esta é diretamente proporcional à atividade de desidrogenases mitocondriais presentes em células viáveis (MOSMANN, 1983), portanto proporcional ao número de células viáveis. O resultado é comparado com a absorvância de uma cultura de células controle, tratada da mesma maneira. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em % de células vivas em relação ao controle (células sem tratamento), para o qual foi atribuído 100 %. A concentração de 2,5% de DMSO foi utilizada em todos os experimentos como controle positivo de morte celular.

#### 3.4.3.4 Análises estatísticas

Os resultados de atividades biológicas estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) das várias repetições dos experimentos. Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste “t” de Student e a Análise de Variância (ANOVA), com execução do teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando os programas *GraphPad-Prism 5*, versão 2007, e *Microsoft Office Excel 2010*. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TRIAGEM DE DEZENOVE FUNGOS

Na etapa inicial do processo de biotransformação, os dezenove fungos selecionados foram expostos ao *trans*-resveratrol. Após filtração e extração, o

extrato resultante de cada processo foi analisado por CCD e comparado com o controle, constituído somente de meio de cultura e o solvente utilizado para solubilizar o resveratrol.

De todos os fungos testados, somente dois apresentaram metabólitos novos frente ao substrato *trans*-resveratrol: o *Penicillium* sp.(64) e o *Bipolaris sorokiniana*. Com esses resultados, esses dois fungos foram selecionados para serem utilizados para biotransformação em escala preparativa.

#### 4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO POR *Bipolaris sorokiniana*

O experimento em escala preparativa com o *trans*-resveratrol e o fungo *B. sorokiniana* (Figura 6) confirmou o resultado da etapa de triagem levando à obtenção de um derivado, denominado derivado (1) até sua identificação, com polaridade maior que o composto de origem.

No experimento em escala preparativa, atenção especial foi dada ao micélio, pois muito do substrato inicial ou do metabólito produzido permaneceu dentro ou aderido ao micélio sendo necessário provocar a ruptura celular através da maceração do mesmo e imersão em acetato de etila por um dia ou em banho ultrassônico (BELTER; CUSSLER; HU, 1991).

Como ilustrado de forma mais detalhada no esquema 3, após a fermentação, o caldo foi filtrado e extraído, obtendo-se 1,31 g de extrato bruto. Este foi submetido à cromatografia líquida a vácuo (seção 3.1 A). Após eluição com vários gradientes de diclorometano e metanol, as frações coletadas foram analisadas por CCD. As frações de interesse foram, então, selecionadas e submetidas à nova purificação por meio de cromatografia centrífuga, como descrito na seção (3.1 A). Após reunião das frações semelhantes e evaporação do solvente foi obtido um sólido branco (45 mg). O metabólito de interesse foi observado em placa de CCD (Figuras 7 e 8).

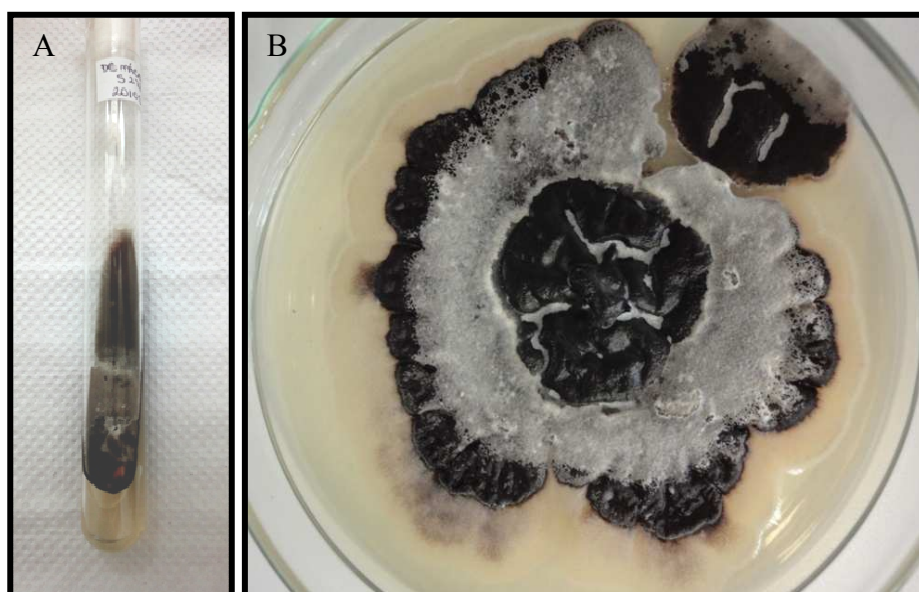
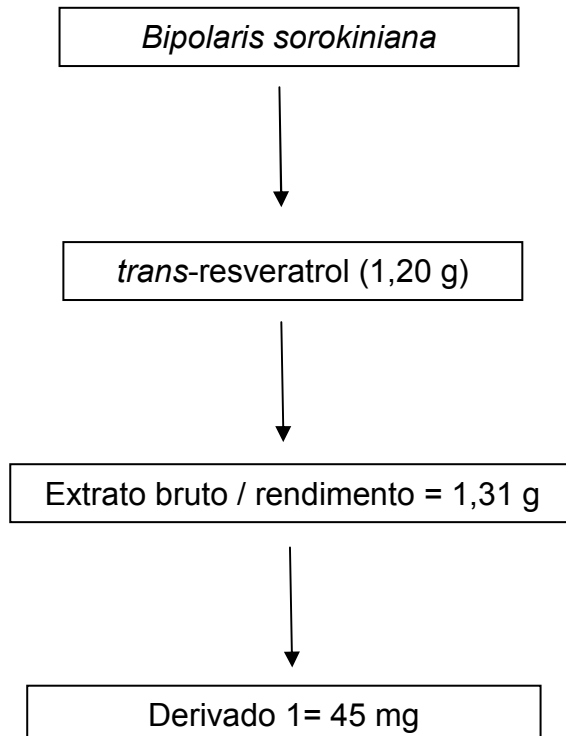


FIGURA 6- FUNGO *Bipolaris sorokiniana*: ASPECTOS DA CULTURA; (A) CRESCIMENTO EM TUBO DE ENSAIO; (B) CRESCIMENTO EM PLACAS DE PETRI



ESQUEMA 3- ETAPAS DE OBTENÇÃO DO DERIVADO 1 POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans-resveratrol* PELO FUNGO *B. sorokiniana*



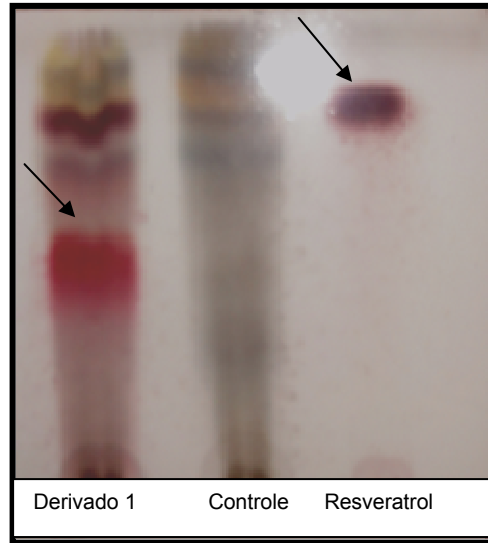


FIGURA 7- CCD ILUSTRANDO A DETECÇÃO DO DERIVADO 1 PRODUZIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol PELO FUNGO *B. sorokiniana*. FM-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_2\text{OH}$  (80:20); REVELADOR: VANILINA SULFÚRICA



FIGURA 8- CCD DO DERIVADO 1 PRODUZIDO PELO FUNGO *B. sorokiniana*, APÓS PURIFICAÇÃO. FM:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_2\text{OH}$  (90:10); REVELADOR: VANILINA SULFÚRICA

#### 4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO POR *Penicillium* sp. (64)

O experimento em escala preparativa com o *trans*-resveratrol e o fungo *Penicillium* sp. (64), cujos aspectos de cultivo estão ilustrados na Figura 9,

também confirmou o resultado obtido na etapa de triagem, produziu um metabólito que será doravante denominado derivado 2 até sua identificação.

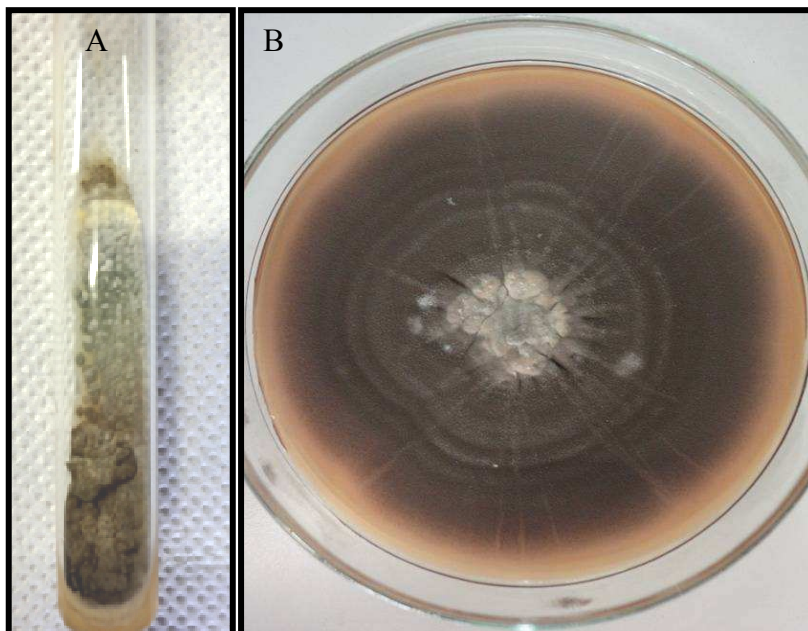
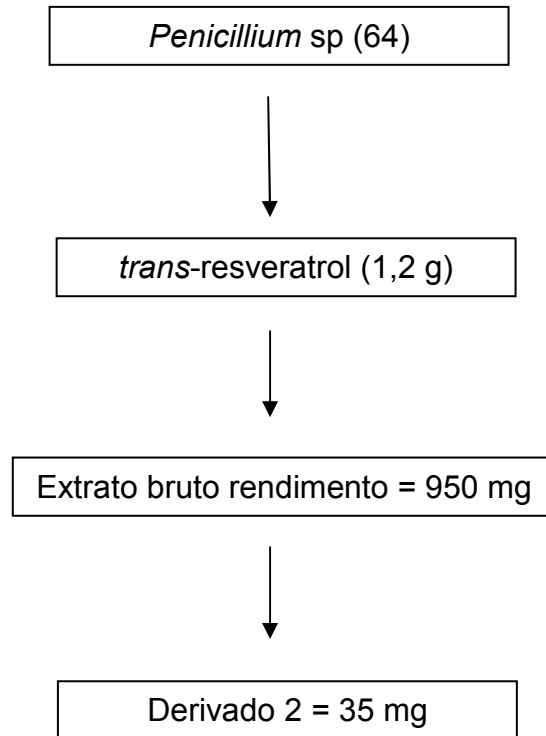


FIGURA 9- FUNGO *Penicillium* sp. (64): ASPECTOS DE CULTIVO; (A) CRESCIMENTO EM TUBO DE ENSAIO; (B) PLACAS DE PETRI

O esquema 4 resume os rendimentos obtidos em cada uma das etapas usadas para a biotransformação do *trans*-resveratrol pelo *Penicillium* sp. (64).

Da mesma forma como para o processo anterior, após fermentação, o caldo da cultura foi submetido à filtração e extraído com solventes orgânicos, obtendo-se 950 mg de extrato bruto. Este foi submetido à cromatografia líquida a vácuo.

A eluição foi realizada com gradientes de acetato de etila e metanol (seção 3.1 A) e as frações resultantes analisadas por CCD. As frações de interesse foram selecionadas e submetidas à nova purificação utilizando cromatografia centrífuga (seção 3.1 A). As Figuras 10 e 11 ilustram as CCD desses procedimentos.



ESQUEMA 4- ETAPAS DE OBTENÇÃO DO DERIVADO 2 OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans-resveratrol* PELO FUNGO *Penicillium* sp. (64)

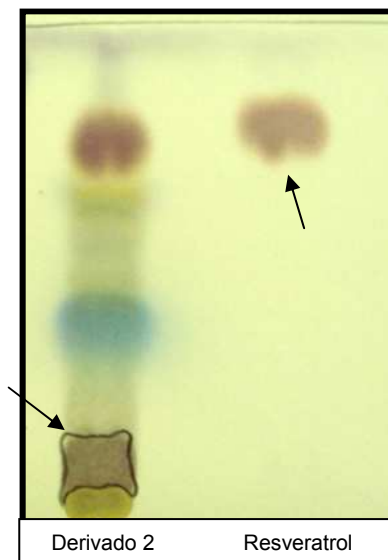


FIGURA 10- CCD DA FASE ANALÍTICA DEMONSTRANDO O DERIVADO 2 OBTIDO DO EXTRATO BRUTO PRODUZIDO PELO FUNGO *Penicillium* sp. (64). FM: AcOEt:CH<sub>2</sub>OH (90:10); REVELADOR: VANILINA SULFÚRICA

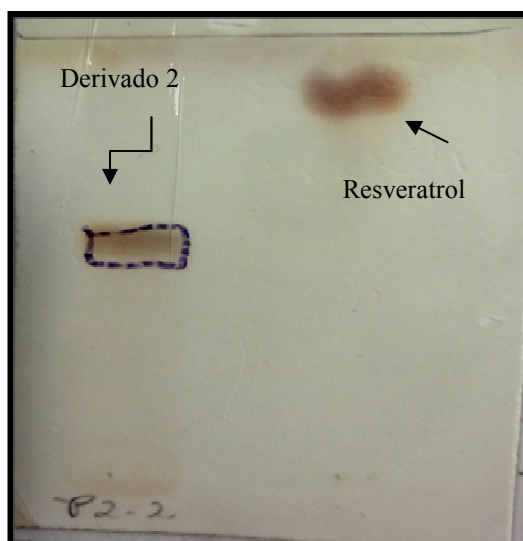


FIGURA 11- CCD DO DERIVADO 2 PRODUZIDO PELO FUNGO *Penicillium* sp. (64), APÓS PURIFICAÇÃO. FM: AcOEt:CH<sub>2</sub>OH (80:20); REVELADOR: VANILINA SULFÚRICA

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

O *trans*-resveratrol possui fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> e massa molar de 228,24 g/mol; apresenta-se como pó fino com coloração creme, bastante solúvel em acetona e etanol, pouco solúvel em água e insolúvel nos demais solventes, dados que conferem com a literatura (COTTART *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010). Como este composto foi adquirido comercialmente, sua natureza química foi confirmada por espectrometria de massa (EM) (Figura 12), de IV (Figura 13), RMN <sup>1</sup>H (Figura 14 e Tabela 2) e de <sup>13</sup>C (Figura 15 e Tabela 3), e DEPT (Figura 16 e Tabela 4).

O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 226,9 [M-H]<sup>-</sup>, correspondendo à massa de *m/z* 228 g/mol (M<sup>-</sup>), para um composto com fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, o *trans*- resveratrol.

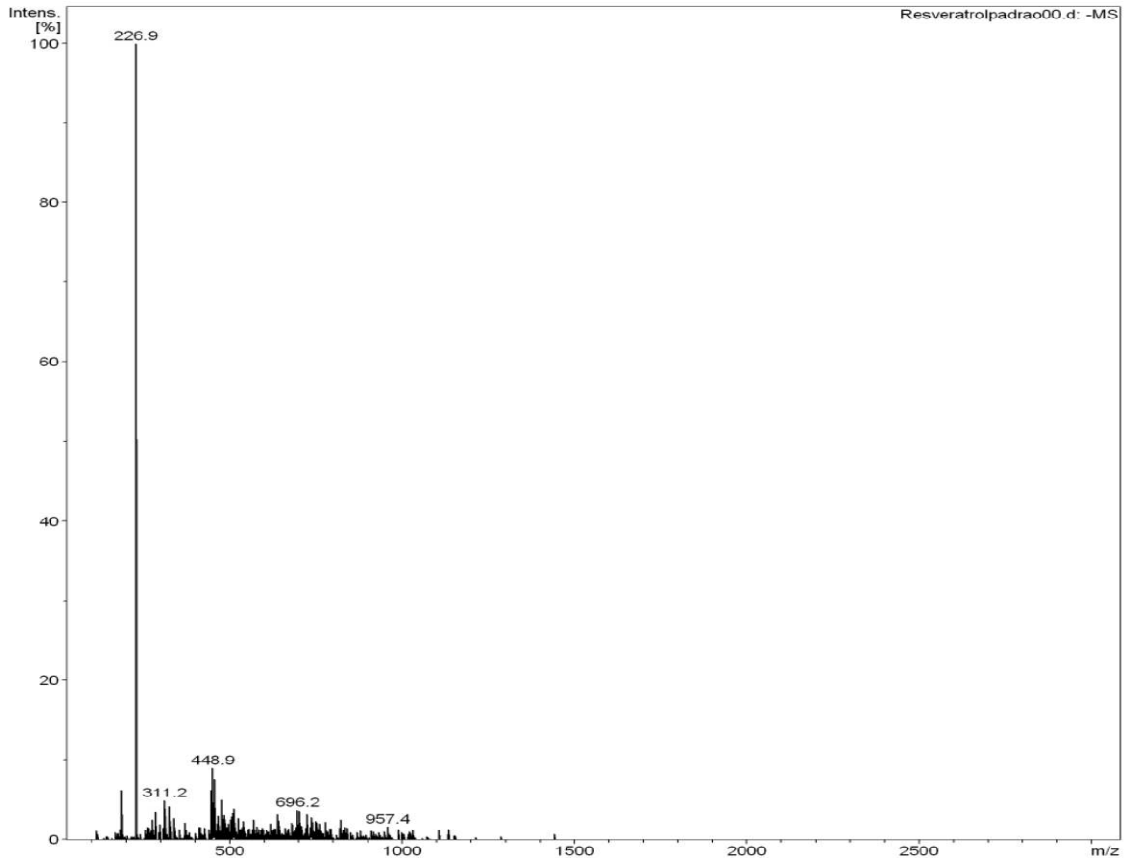


FIGURA 12- ESPECTRO DE MASSAS DO *trans*- resveratrol, MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO

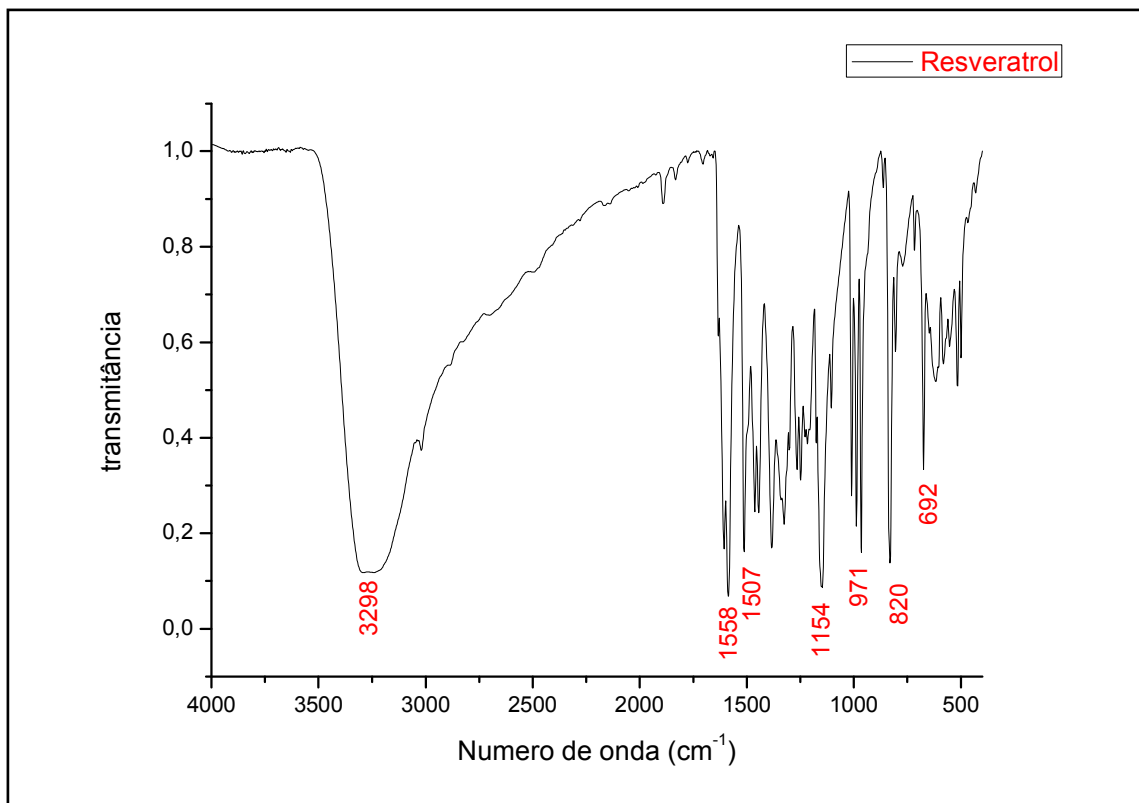


FIGURA 13- ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO *TRANS*-RESVERATROL

O espectro no IV obtido para o *trans*-resveratrol comercial (Figura 13) mostrou uma banda larga referente ao estiramento O-H em 3298 cm<sup>-1</sup>; em 1558 cm<sup>-1</sup>, o estiramento C=C do anel aromático e, em 1507 cm<sup>-1</sup>, uma banda referente à ligação C=C da olefina, confirmando a identidade química do *trans*-resveratrol. Ainda, a comprovação que o resveratrol utilizado nos experimentos era o composto com isomeria *trans* veio com a absorção em 971 cm<sup>-1</sup>, a qual é característica desse padrão de substituição (PAVIA *et al.*, 2010); a banda referente ao estiramento C-O foi detectada em 1154 cm<sup>-1</sup>. O padrão de substituição do anel aromático também foi analisado, onde o padrão de substituição *meta* e *para* foi confirmado devido aos sinais em 692 e 820 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, característicos desse tipo de substituição. Todos esses dados corroboram com aqueles fornecidos pela literatura (SHI *et al.*, 2008; MUKHERJEE *et al.*, 2011).

A análise do *trans*-resveratrol (III) por RMN de <sup>1</sup>H (Figura 14, tabela 2) também forneceu dados compatíveis com os da literatura (LEE *et al.*, 2010).

TABELA 2- DADOS DO *trans*-resveratrol (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; 200 MHz

<i>trans</i> -resveratrol <sup>1</sup> RMN δ <sup>1</sup> H (ppm)	<i>trans</i> -resveratrol <sup>2</sup> RMN δ <sup>1</sup> H (ppm)
7,43 ( 2H, d, J= 8.6Hz, C2', C6'-H)	7,31 (2H, d, J=8.4 Hz, C2', C6'-H)
7,05 ( 1H, d, J= 16.3 Hz,H olefina)	6,92 (1H, d, J= 16.2 Hz,H olefina )
6,96 (1H, d, J=16.4Hz,H olefina)	6,74 ( 1H, d, J=16.2Hz,H olefina)
6,83 (2H, d, J=8.6Hz, C3', C5'-H)	6,80 ( 2H, d, J=8.1Hz, C3', C5'-H)
6,57 (2H, s, C2, C6-H)	6,46 (2H, s, C2, C6-H)
6,30 (1H, t, J=2.1Hz, C4-H)	6,25 (1H, s, C4-H)
8,43 (3H, sl, OH)	9,05 (2H, sl, OH)
-----	9,30 ( 1H, sl, OH)

NOTA: <sup>1</sup>RMN <sup>1</sup>H dados experimentais; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 200MHz, ppm)

<sup>2</sup>Dados da literatura, <sup>2</sup>Lee *et al*, 2010; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300MHz, ppm)

-----dado não identificado no experimento

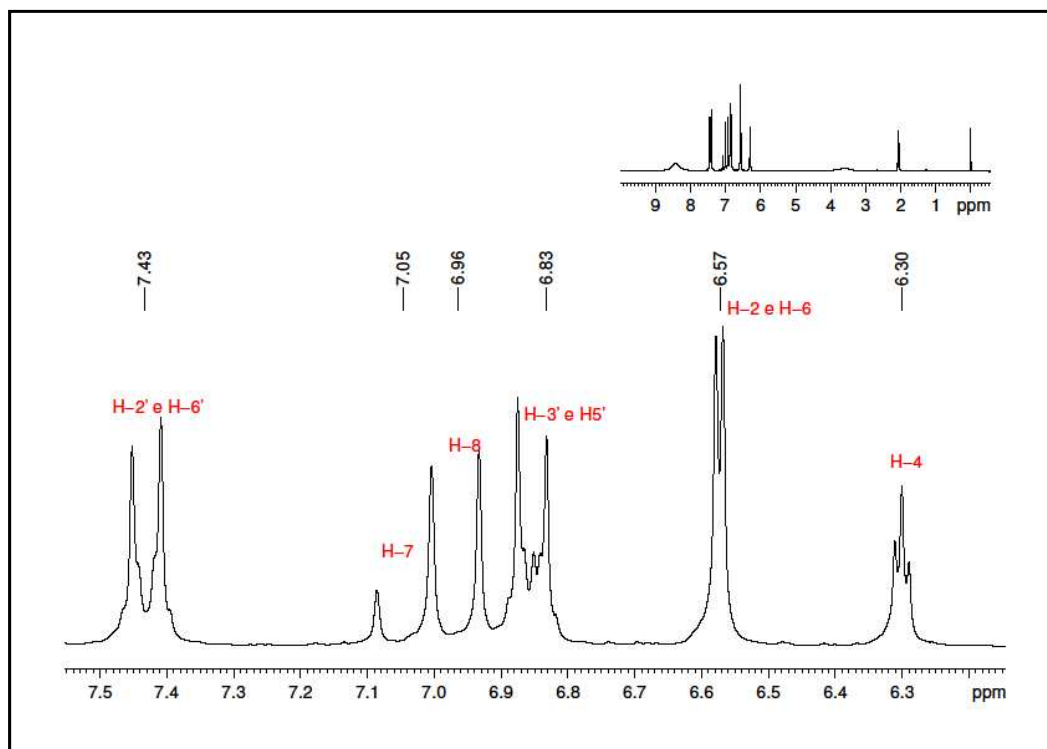


FIGURA 14- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol; EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE  $\delta$  6,30 A 7,50 ppm ( $\delta$  ppm)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *trans*-resveratrol indicou a presença de sete hidrogênios ligados a carbonos aromáticos: três dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,57,  $\delta_{\text{H}}$  6,83, e  $\delta_{\text{H}}$  7,43 e um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,30, sendo que alguns hidrogênios apresentam o mesmo valor de deslocamento devido a simetria encontrada na molécula. Sinais característicos dos hidrogênios ligados ao grupamento olefina  $\text{C}=\text{C}$  foram detectados como dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,96 e  $\delta_{\text{H}}$  7,05; devido ao valor da constante de acoplamento  $J^3$  (16.4 e 16.3 Hz respectivamente) dos átomos de hidrogênio se comprova a presença do estereoisômero *trans* do resveratrol. Em alcenos, as constantes de acoplamento  $J^3$  em átomos de hidrogênio que são *cis* entre si têm valores próximos de 10 Hz, enquanto que as constantes de acoplamento  $J^3$  em átomos de hidrogênio que são *trans* entre si são maiores que 16 Hz (PAVIA *et al.*, 2010). A presença do hidrogênio do grupamento O-H também foi detectado como um singleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  8,43. Pela integração foi possível comprovar a presença de três grupamentos OH na molécula do resveratrol. Estes dados (Tabela 2) estão de acordo com os da literatura (LEE *et al.*, 2010).

TABELA 3- DADOS DE RMN<sup>13</sup>C DO *trans*-resveratrol (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz)

resveratrol <sup>1</sup> RMN δ <sup>13</sup> C(ppm)	resveratrol <sup>2</sup> RMN δ <sup>13</sup> C(ppm)	DEPT <sup>3</sup>
101,82 (C4)	103,22 (C4)	128,22 (CH)
104,81 (C2, C6)	105,86 (C2, C6)	127,92 (CH)
115,57 (C3', C5')	116,80 (C3', C5')	125,91 (CH)
129,07 (C1')	126,82 (C1')	
127,85 (C2', C6')	128,75(C2', C6')	104,82 (CH)
125,92 (C7 olefina)	129,18 (C olefina )	101,80 (CH)
128,25( C 8 olefina)	129,54 (C olefina )	101,80 (CH)
140,00 (C1)	140,53 (C1)	
157,25 (C4')	158,07 (C4')	
158,65 (C3,C5)	159,35 (C3, C5)	

NOTA: <sup>1</sup>RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz, ppm) (Dep. Química UFPR)

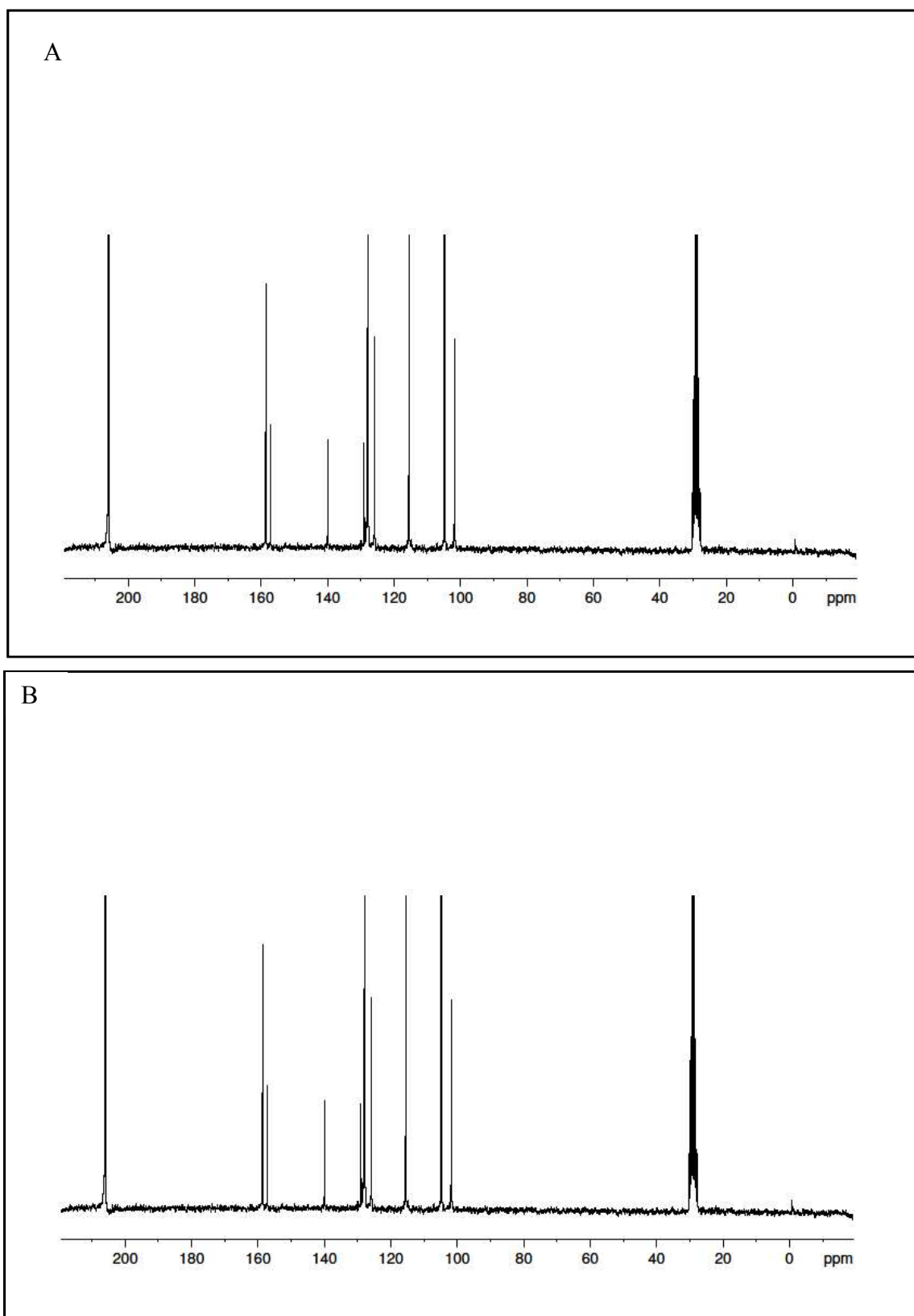
<sup>2</sup>Dados da literatura, <sup>2</sup>Lee *et al*, 2010; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75 MHz, ppm)

<sup>3</sup>DEPT (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz, ppm) (Dep. Química UFPR)

Na análise espectrométrica por RMN <sup>13</sup>C, como mostrado na Figura 15 e Tabela 3, sinais correspondentes aos doze carbonos aromáticos do *trans*-resveratrol [C-4 (δ 101,82), C-2 e C-6 (δ 104,81), C-3' e C-5' (δ 115,57), C-1' (δ 129,07), C-2' e C-6' (δ 127,85), C-1 (δ 140,00), C-4' (δ 157,25), C-3 e C-5 (δ 158,65)] foram encontrados em região mais desblindada do espectro (δ 100 a 160). Ainda, foram observados sinais na região das olefinas correspondentes aos carbonos não saturados sp<sup>2</sup>: C-8 (δ 125,92) e C-7 (δ 128,25).

A caracterização de cada carbono foi auxiliada pela análise do espectro de DEPT 135 (Figura 16). Analisando o espectro de DEPT e comparando com o espectro de RMN <sup>13</sup>C foram caracterizados os 14 átomos de carbono do *trans*-resveratrol (Tabela 4).





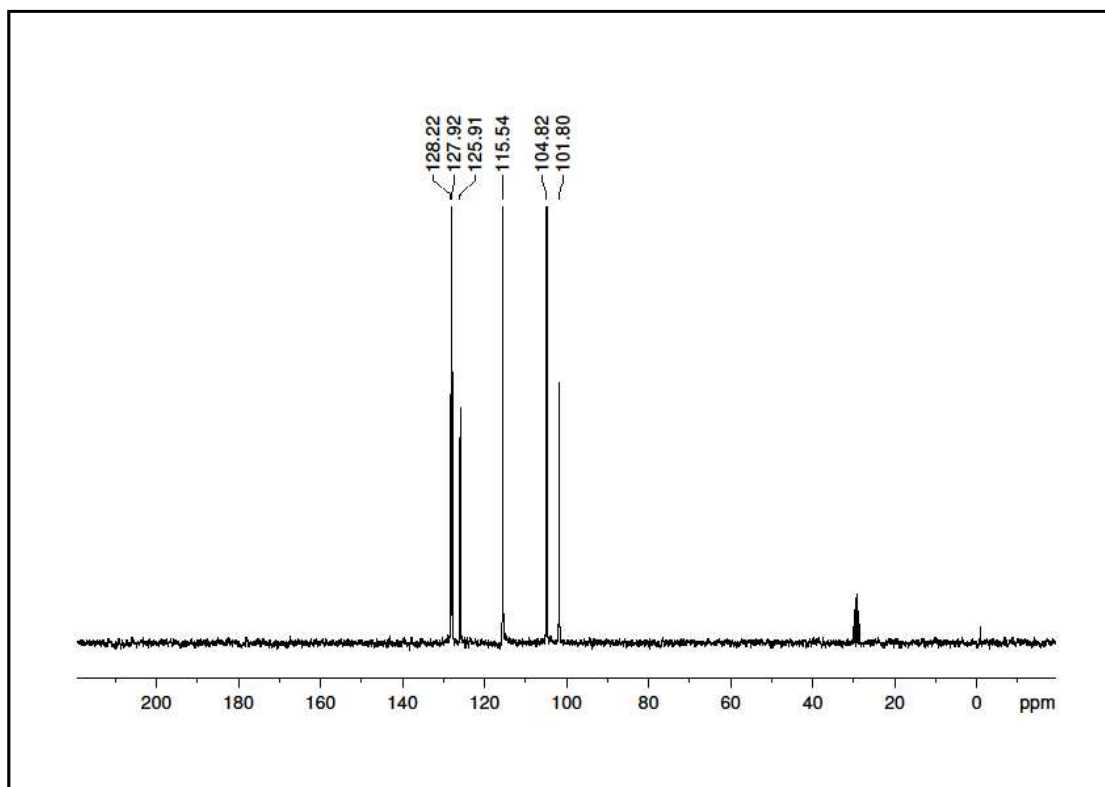


FIGURA 16- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ) DO *trans*-resveratrol ( $\delta$  ppm)

Carbono	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	Cq
Total=14	0	0	9	5

TABELA 4- CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO *trans*-resveratrol

Tendo em vista as características gerais da estrutura do *trans*-resveratrol no espectro de RMN  $^{13}C$ , os sinais observados se mostraram de conformidade com os dados descritos na literatura (LEE *et al.*, 2010).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS

##### 4.5.1 Caracterização dos metabólitos obtidos por biotransformação do *trans*-resveratrol com o fungo *B. sorokiniana*

O processo de biotransformação do *trans*-resveratrol pelo fungo *B. sorokiniana* levou à formação do derivado 1, cuja estrutura química, de fórmula molecular  $C_{28}H_{22}O_6$ , foi identificada, com o auxílio das técnicas de espectrometria de massa EM (Figura 17), IV (Figura 18), RMN  $^1H$  (Figura 19 e Tabela 5) e de  $^{13}C$  (Figura 22 e Tabela 6), e DEPT (Figura 25 e Tabela 7), como sendo o *trans*-dehidrodímero do resveratrol (**V**).

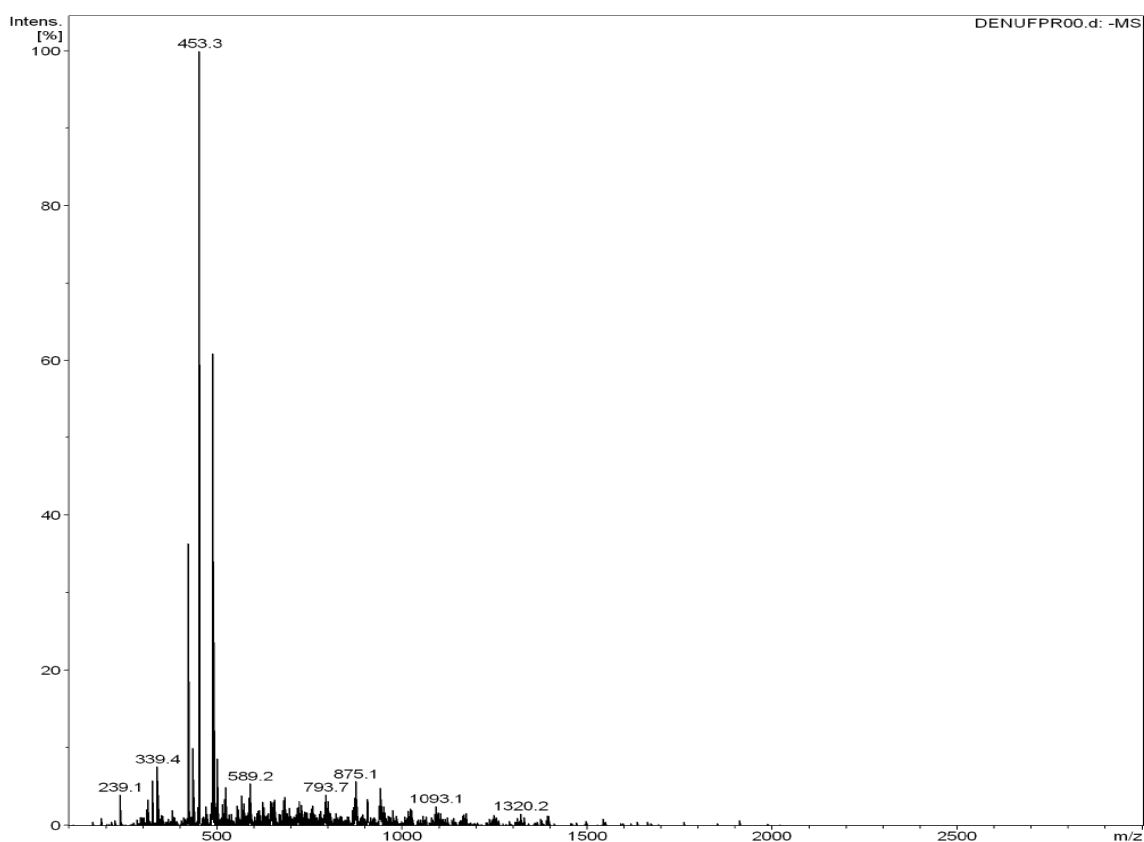
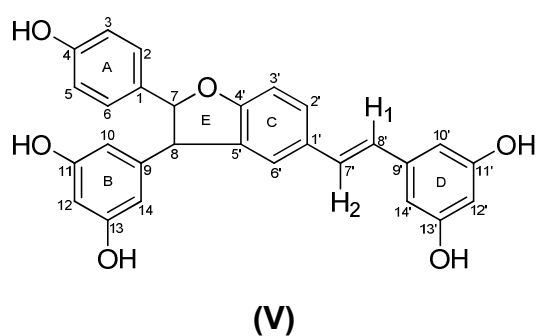


FIGURA 17- ESPECTRO DE MASSAS DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO

O espectro de massas (Figura 17) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  453,3  $[M-H]^-$ , correspondendo à massa de  $m/z$  454,3 g/mol ( $M^-$ ), para um composto com fórmula molecular  $C_{28}H_{22}O_6$ , o *trans*-dehidrodímero do resveratrol obtido neste trabalho.

O espectro no IV do *trans*-dehidrodímero do resveratrol (Figura 18) apresentou semelhanças com o espectro do seu substrato, sendo coerente com os dados encontrados na literatura (CICHEWICZ; KOUZI; HAMANN, 2000). Neste contexto, uma banda larga referente ao estiramento O-H foi detectada em  $3340\text{ cm}^{-1}$  o estiramento C=C do anel aromático foi encontrado em  $1602\text{ cm}^{-1}$ ; em  $1490\text{ cm}^{-1}$  visualizou-se uma banda referente à ligação C=C da olefina, como no caso do *trans*-resveratrol. Também se observou uma banda em  $963\text{ cm}^{-1}$ , característica da estereoquímica em torno da ligação dupla na olefina do tipo *trans*; o estiramento C-O do anel aromático foi encontrado em  $1347\text{ cm}^{-1}$ . Um padrão de substituição *meta* e *para* como o observado para o *trans*-resveratrol e descrito anteriormente também estava presente neste derivado, com sinais em  $691$  e  $820\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, característicos desse tipo de substituição.

A adição do substituinte dihidrobenzofurano, comprovada com bandas em  $1150$  e  $1236\text{ cm}^{-1}$ , demonstra o estiramento C-O do anel cíclico, comprovando a modificação da estrutura química do *trans*-resveratrol. As absorções encontradas na região de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , características do estiramento C-H  $sp^3$  do mesmo anel cíclico, constituem outro conjunto importante de alteração ocorrida durante a biotransformação.

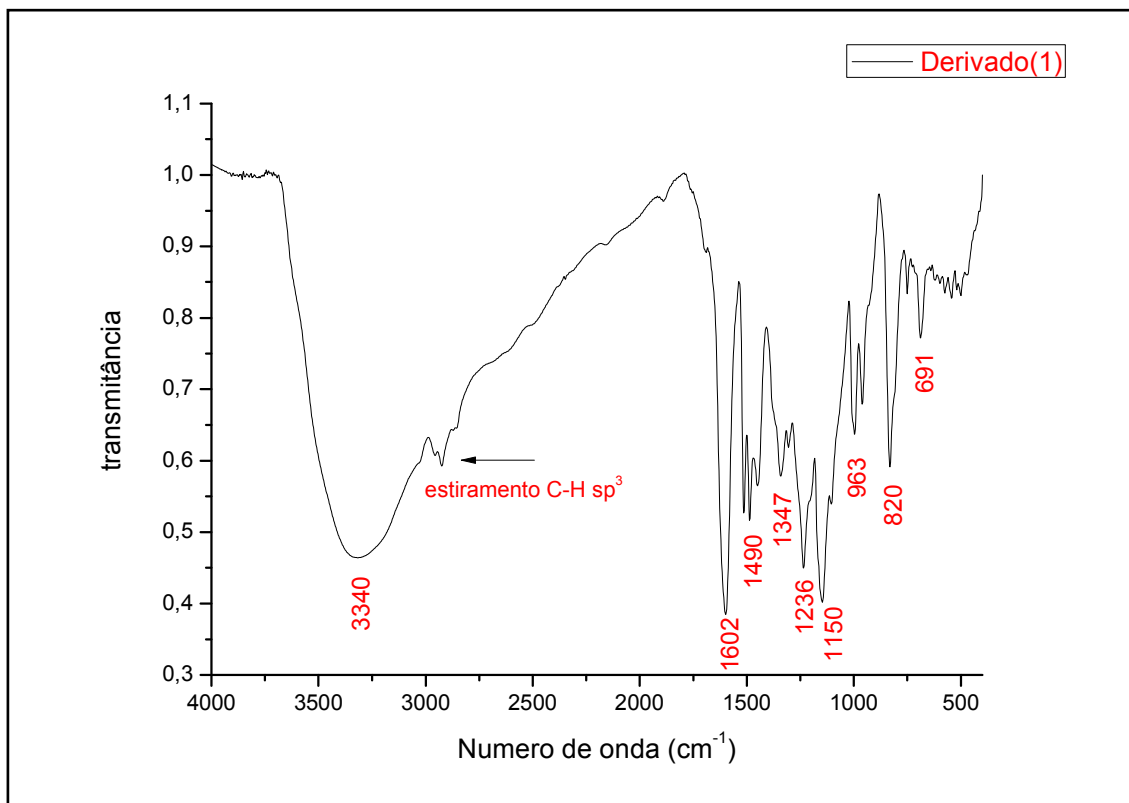


FIGURA 18- ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  deste derivado (Figuras 19, 20 e 21, Tabela 5) mostrou semelhança com os dados já descritos na literatura para o *trans*-dehidrodímero do resveratrol quando obtido por biotransformação com o *B. cinerea* (BREUIL *et al.*, 1998; CICHEWICZ; KOUZI; HAMANN, 2000) e com enzimas lacases isoladas de *Myceliophthora thermophyla* e *Trametes pubescens* (NICOTRA *et al.*, 2004).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou sinais de OH aromáticas em  $\delta_{\text{H}}$  8,30 e  $\delta_{\text{H}}$  8,60 (integral: 3H e 2H respectivamente), sugerindo uma estrutura penta-fenólica. Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram observados na região de 6,0-8,0 ppm: para o anel (b) foram encontrados os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (2H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,24 (2H); para o anel (b,d) foi identificado dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 correspondente a 2H e  $\delta_{\text{H}}$  6,53, 2H, um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,26, 1H e outro tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,29, 1H; os hidrogênios ligados no anel aromático (c) apresentaram sinais no espectro como dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,42,  $\delta_{\text{H}}$  6,89, e  $\delta_{\text{H}}$  7,22 cada sinal correspondendo a 1H; os dois prótons da olefina foram detectados como dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 e  $\delta_{\text{H}}$  7,04, sendo que a estereoisomeria para o composto pode ser definida com *trans* já

que a  $J^3$  (H-7',H-8') foi de 16,26Hz confirmando uma isomeria *trans*, para os dois prótons alifáticos os sinais foram dubletos em  $\delta_H$  4,47 e  $\delta_H$  5,47. Os sinais foram compatíveis aos encontrados na literatura (BREUIL *et al.*, 1998; NICOTRA *et al.*, 2004)

TABELA 5- DADOS DE RMN<sup>1</sup> H DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *B. sorokiniana*.

H	Dehidrodímero <sup>1</sup>	Dehidrodímero <sup>2</sup>	Dehidrodímero <sup>3</sup>
H-2,6	7,24 (d, J=8.41 Hz)	7,24 (d, J=8.0 Hz)	7,24 (Multiplete)
H-3,5	6,85 (d, J=8.45 Hz)	6,84 (d, J=8.0 Hz)	6,85 (Multiplete)
H-7	5,47 (d, J=8.03 Hz)	5.48 (d, J=8.0 Hz)	5,45 (d, J=7.96 Hz)
H-8	4,47 (d, J=8.03 Hz)	4,62 (d, J=8.0 Hz)	4,47 (d, J=7.96 Hz)
H-10,14	6,21 (d, J=2.17 Hz)	6,19 (d, J=2.0 Hz)	6,20 (d, J=2.16 Hz)
H-12	6,29 (t, J=2.17 Hz)	6,25 (d, J=2.0 Hz)	6,29 (t, J=2.16 Hz)
H-2'	7,42 (dd, J=8.33 e 1,62 Hz)	7,25 (d, J=8.0 Hz)	7,43 (dd, J=8.26 e 1.63Hz)
H-3'	6,89 (d, J=8.45 Hz)	6,88 (d, J= 8.0 Hz)	6,87 (d, J=8.26 Hz)
H-6'	7,22 (d, J=8.41 Hz)	7,45 (d, J=2.0 Hz)	7,26 (singleto largo)
H-7'	7,04 (d, J=16.26 Hz)	7,08 (d, J=16.0 Hz)	7,06 (d, J=16.33 Hz)
H-8'	6,90 (d, J=16.26 Hz)	6,92 (d, J= 16.0 Hz)	6,90 (d, J=16.33 Hz)
H-10',14'	6,53 (d, J=2.15 Hz)	6,53, (d, J=2.0 Hz)	6,54 (d, J=2.10 Hz)
H-12'	6,26 (t, J=2.15 Hz)	6,25 (d, J=2.0 Hz)	6,26 (t, J=2.10 Hz)
OH	8,30 (3H)	8,20	9,14 (2H)
OH	8,60 (2H)	n d	9,17 (2H)
OH	n d	n d	9,48 (1H)

NOTA:<sup>1</sup>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 200MHz, ppm, (Dep. Química, UFPR); <sup>2</sup>Breuil *et al*, 1998; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 200MHz, ppm); <sup>3</sup>Nicotra *et al*, 2003; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400MHz, ppm); ); n.d: não descrito

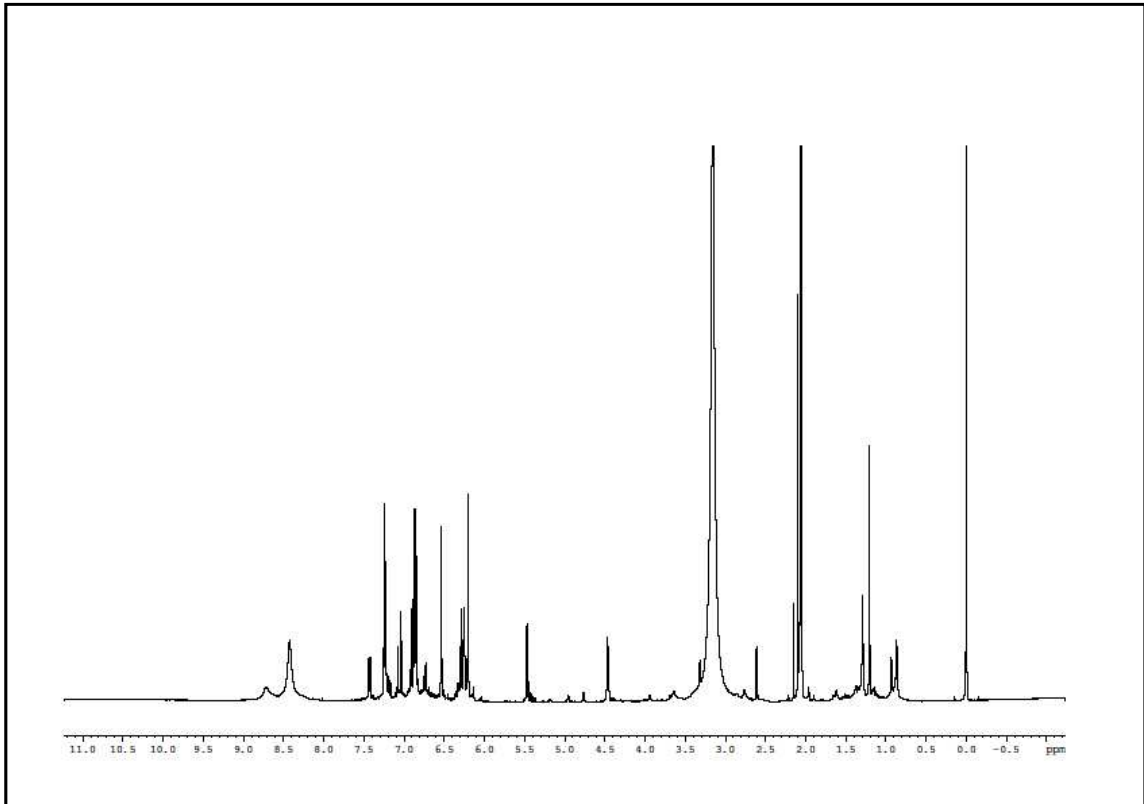


FIGURA 19- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ), DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *B. sorokiniana* ( $\delta$  ppm)

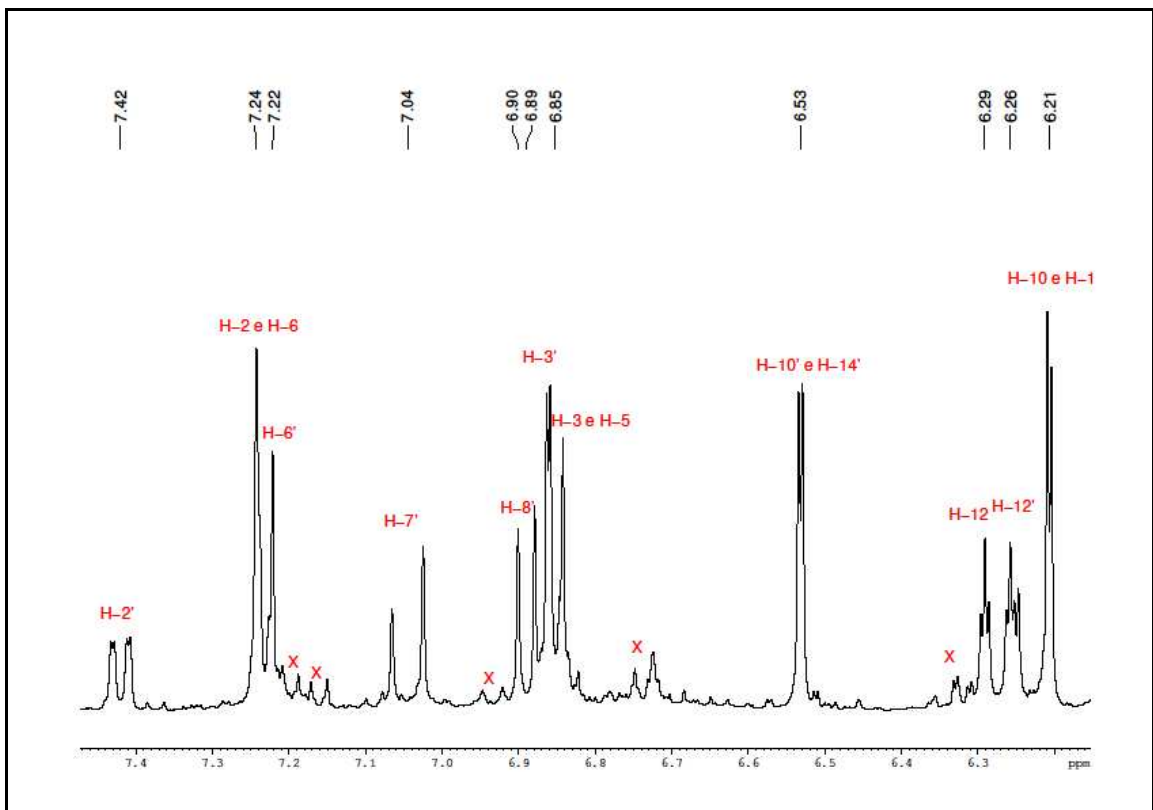


FIGURA 20- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  6,20 A 7,43 ppm ( $\delta$  ppm)

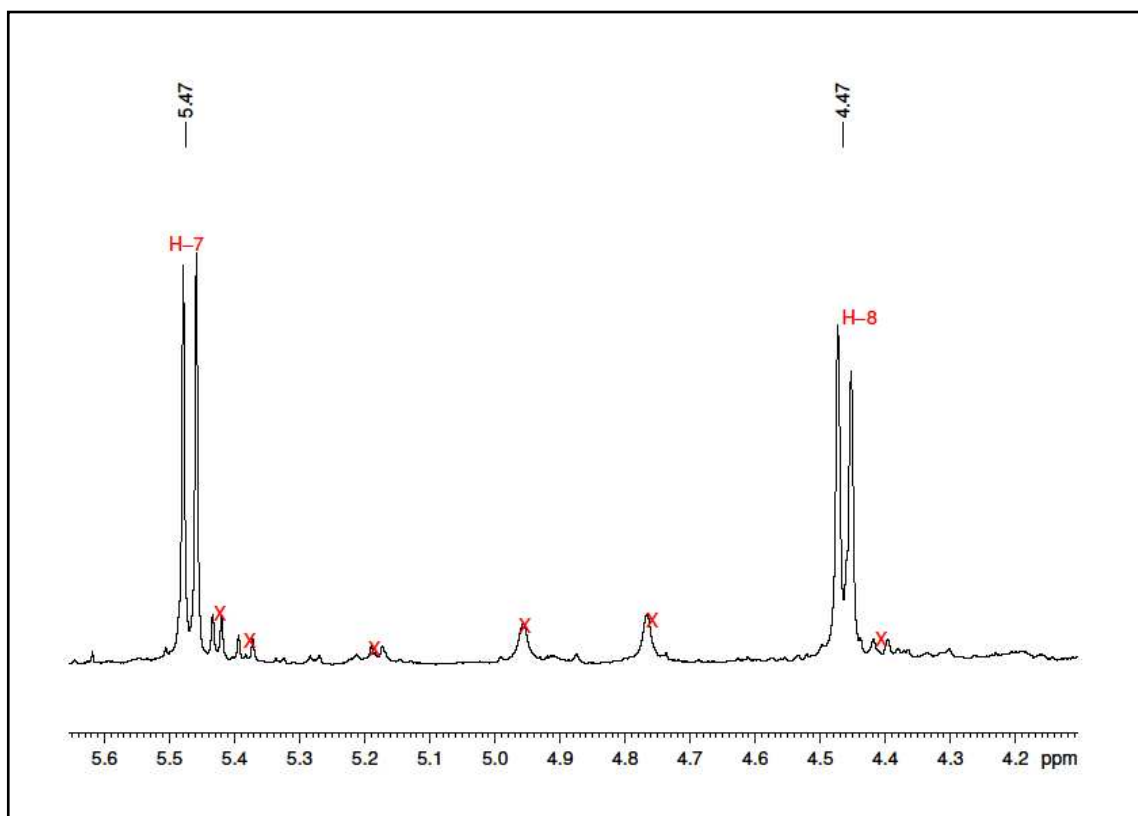


FIGURA 21- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  4,20 E 5,60 ppm ( $\delta$  ppm)

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 22 a 24, Tabela 6) e DEPT 135 (Figura 25, Tabela 6) demonstrou que carbonos aromáticos foram detectados como sinais em região mais desblindada do espectro ( $\delta$  100 a 160), correspondentes aos 24 carbonos aromáticos do derivado dehidrodímero do resveratrol: C-1 ( $\delta$  130,89), C-2 e C-6 ( $\delta$  127,64), C-3 e C-5 ( $\delta$  115,32), C-4 ( $\delta$  157,61), C-9 ( $\delta$  144,25), C-10 e C-14 ( $\delta$  106,57), C-11 e C-13 ( $\delta$  158,90), C-12 ( $\delta$  101,54), C-1' ( $\delta$  131,57), C-2' ( $\delta$  123,00), C-3' ( $\delta$  109,29), C-4' ( $\delta$  159,66), C-5' ( $\delta$  131,37), C-6' ( $\delta$  127,64), C-9' ( $\delta$  139,78), C-10' e C-14' ( $\delta$  104,83), C-11' e C-13' ( $\delta$  158,72) e C-12' em ( $\delta$  101,91). Também foram observados sinais na região das olefinas correspondentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  não saturados: C-7' ( $\delta$  126,36) e C-8' ( $\delta$  128,15). Os carbonos do substituinte dihidrofurano foram encontrados em região mais blindada do espectro, sinais em C-7 ( $\delta$  92,17) e em C-8 ( $\delta$  56,97).



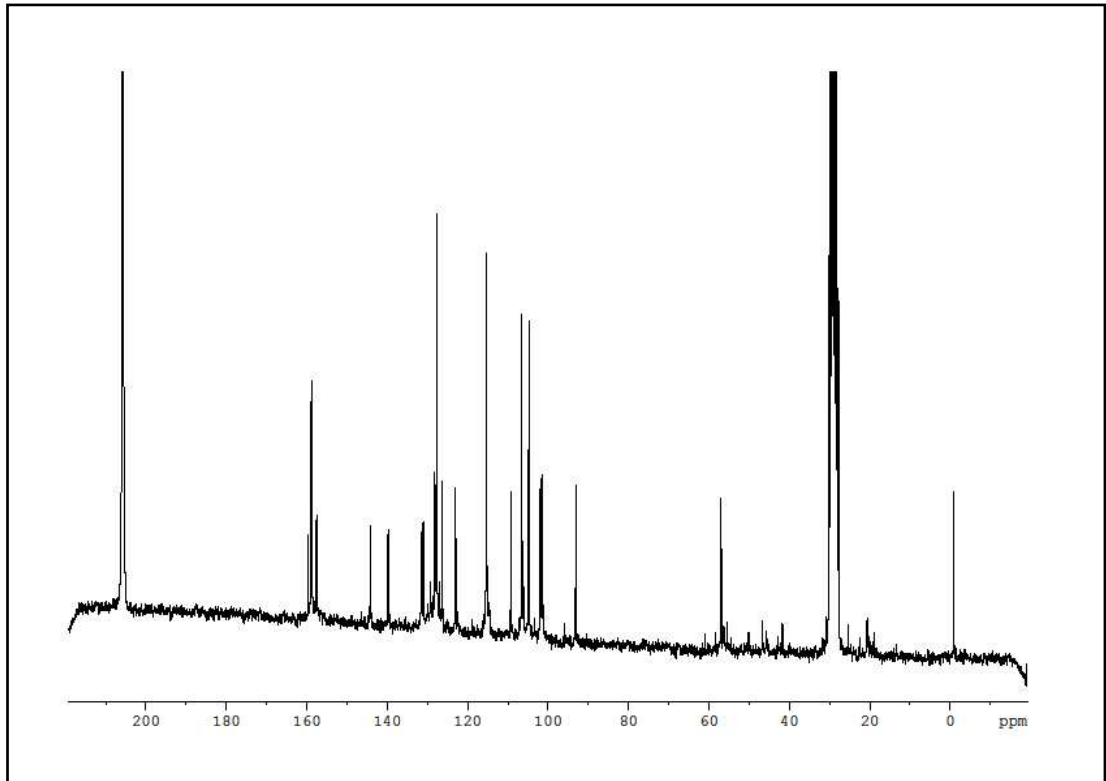


FIGURA 22- ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) DO DERIVADO *trans*-dehidrodímero do resveratrol (δ PPM)

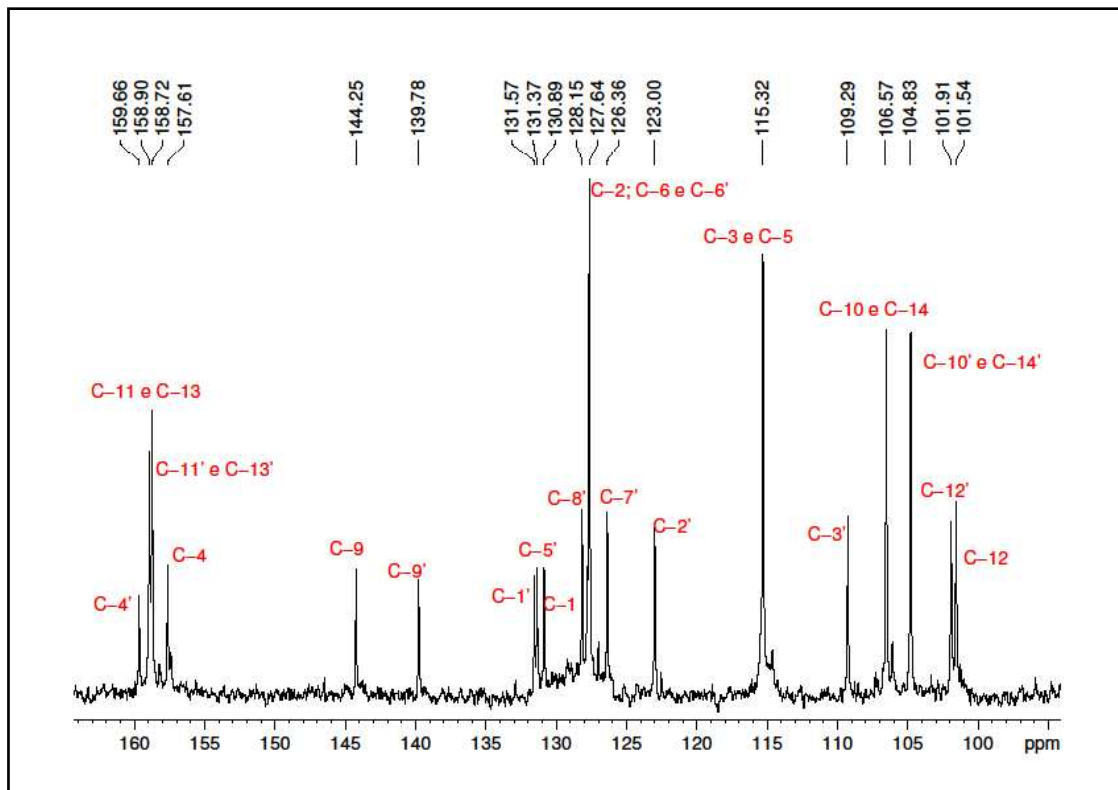


FIGURA 23- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) DO DERIVADO *trans*-dehidrodímero do resveratrol, NA REGIÃO ENTRE δ 100,0 A 160,0 PPM (δ ppm)

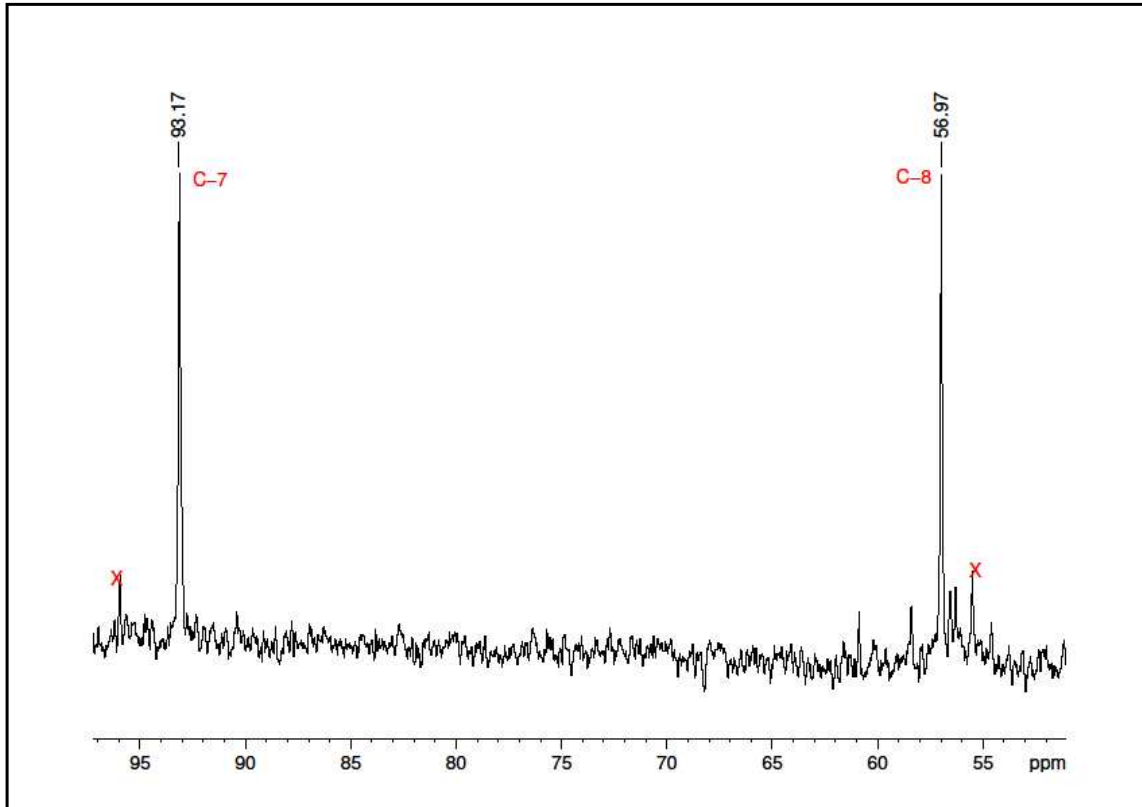


FIGURA 24- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) DO DERIVADO *trans*-dehidrodímero do resveratrol, NA REGIÃO ENTRE δ 55,0 A 95,0 PPM (δ ppm)

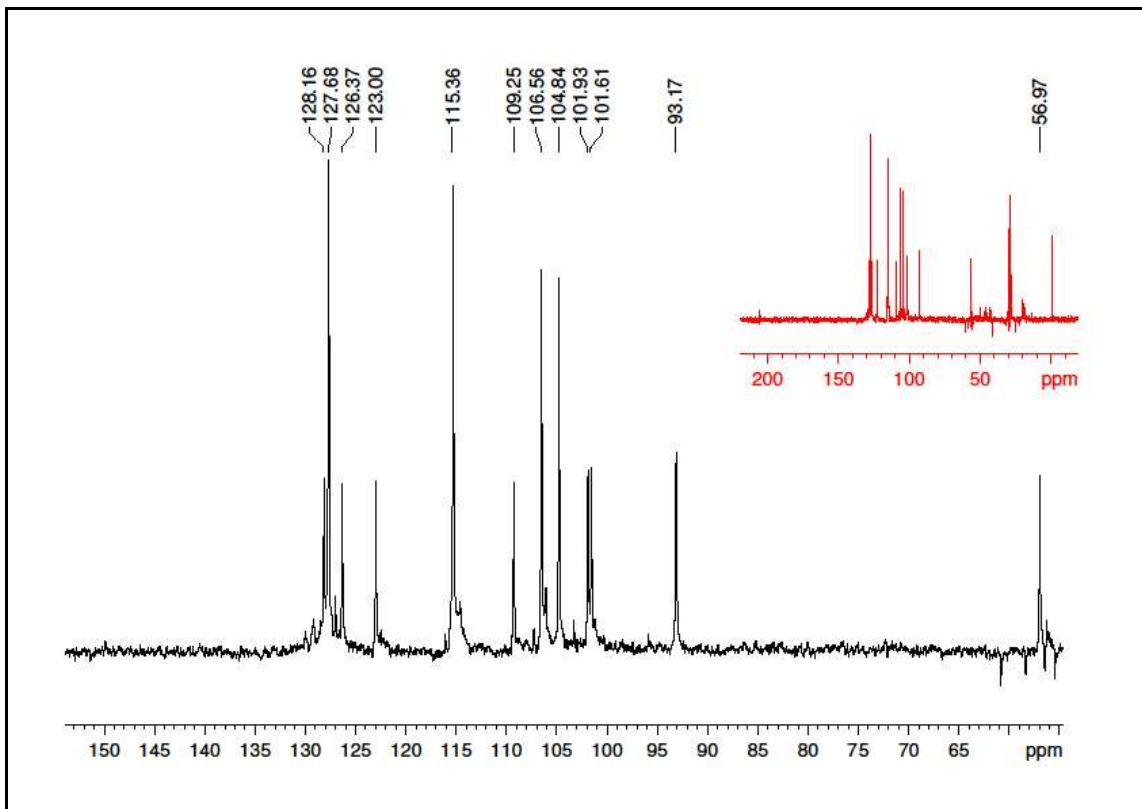


FIGURA 25- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) DO DERIVADO *trans*-dehidrodímero do resveratrol (δ ppm)

TABELA 6- DADOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO DERIVADO dehidrodímero OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *B. sorokiniana*.

C	Dehidrodímero <sup>1</sup>	Dehidrodímero <sup>2</sup>	Dehidrodímero <sup>3</sup>	DEPT135 <sup>1</sup>
C-1	130,89	131,70	133,28	Cq
C-2,6	127,64	128,50	129,23	CH
C-3,5	115,32	116,10	116,85	CH
C-4	157,61	158,40	159,10	Cq
C-7	93,17	94,20	94,72	CH
C-8	56,97	57,70	58,52	CH
C-9	144,25	145,10	145,91	Cq
C-10,14	106,57	107,40	108,11	CH
C-11,13	158,90	159,70	160,44	Cq
C-12	101,54	102,40	103,80	CH
C-1'	131,57	132,50	132,43	Cq
C-2'	123,00	123,90	129,29	CH
C-3'	109,29	110,10	110,81	CH
C-4'	159,66	160,50	161,30	Cq
C-5'	131,37	132,10	132,81	Cq
C-6'	127,64	128,50	124,62	CH
C-7'	126,36	127,20	129,80	CH
C-8'	128,15	129,10	127,92	CH
C-9'	139,78	140,70	141,46	Cq
C-10',14'	104,83	105,70	106,42	CH
C-11',13'	158,72	159,50	160,22	Cq
C-12'	101,91	102,70	103,43	CH

NOTA: <sup>1</sup>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50MHz, ppm, (Dep. Química, UFPR); <sup>1</sup>Dados da literatura <sup>2</sup>Breuil *et al.*, 1998; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75MHz, ppm); <sup>3</sup>Nicotra *et al.*, 2003; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75MHz, ppm); Cq-Carbono quaternário

Com a análise do espectro de DEPT 135 (Figura 25 e Tabela 7) juntamente com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , foi possível caracterizar os 28 átomos de carbono do *trans*-dehidrodímero do resveratrol como a seguir:

Carbono	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	Cq
Total=28	0	0	17	11

TABELA 7- CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol

O conjunto de dados foi correspondente aos da literatura (BREUIL *et al.*, 1998; NICOTRA *et al.*, 2004), reafirmando a identidade do *trans*-dehidrodímero do resveratrol.

Através dos espectros de correlação, foram observadas as conectividades entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC) e entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância (HMBC), conforme a Figura 26.

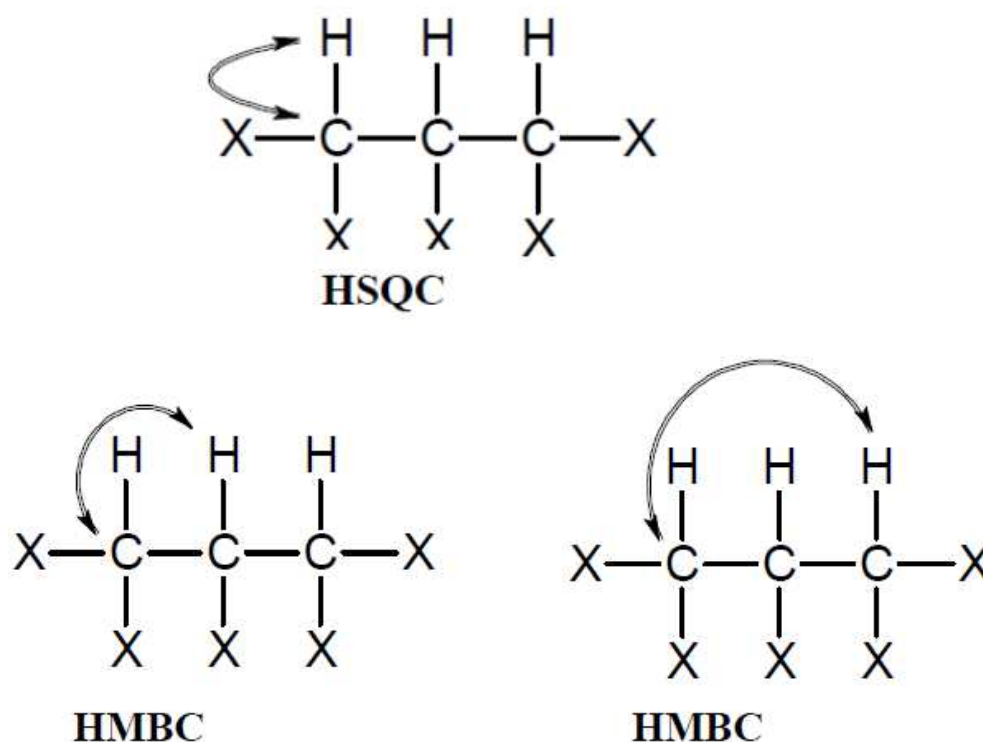


FIGURA 26- ACOPLAMENTOS POTENCIALMENTE POSSÍVEIS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C DE CORRELAÇÃO HSQC E HMBC

A partir dos espectros HSQC (Figura 27) e HMBC (Figura 28) foi possível detectar a correlação entre o H-2,6 em  $\delta_H$  7,24 e o C-7 em  $\delta$  93,17 e entre H-10,14 em  $\delta_H$  6,21 e o C-8 em  $\delta$  56,97, tornando suficiente para estabelecer a ligação do anel aromático (a) no C-7, e do anel aromático (b) no C-8. Outra correlação observada foi entre o H-7 em  $\delta_H$  5,47, e o C-4' em  $\delta$  159,66 o que confirma a presença da fusão do anel de cinco membros oxigenado com o anel aromático (c) em uma ligação H-7-C-7-O-C-4'.

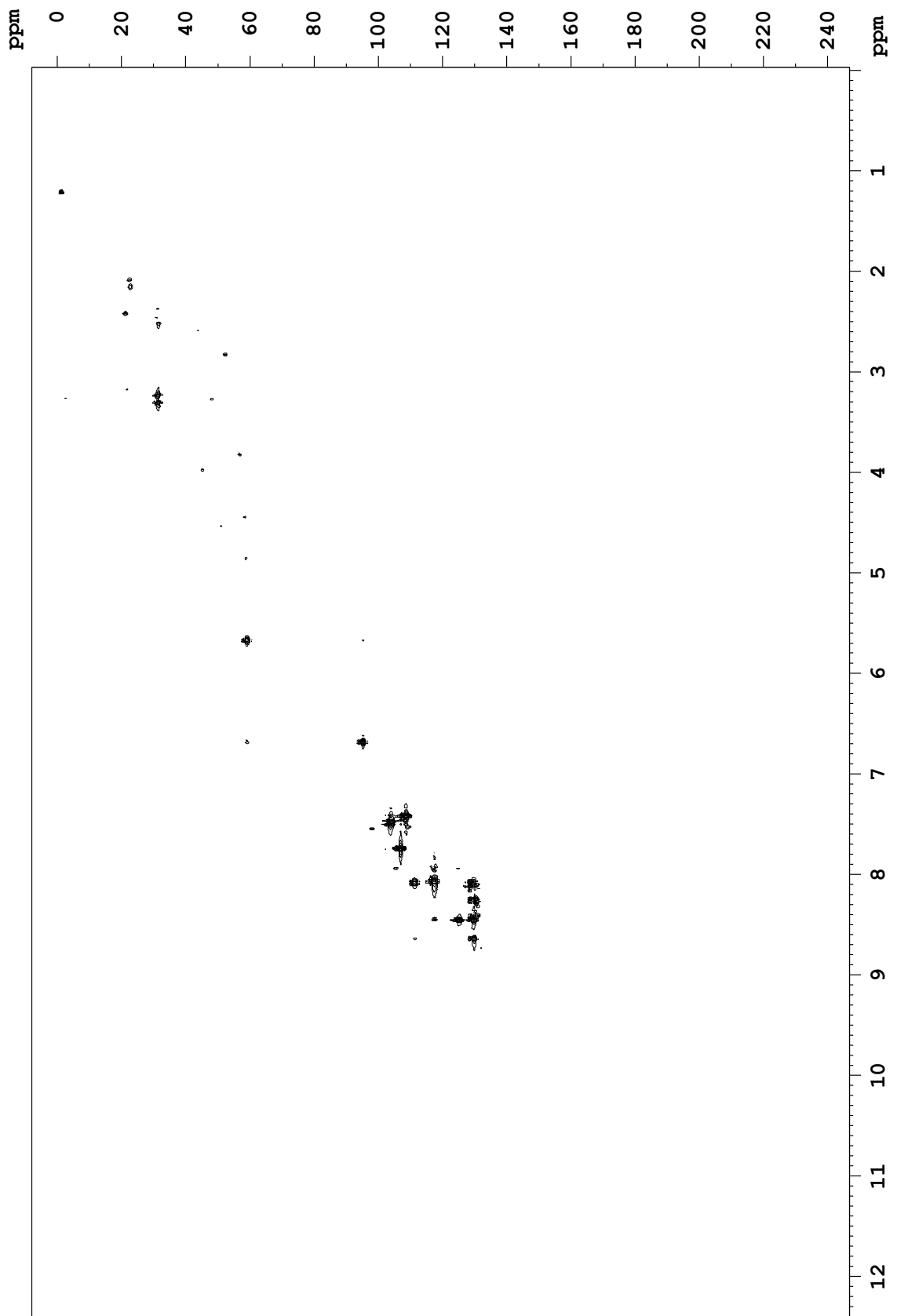


FIGURA 27- ESPECTRO HSQC DO DERIVADO *trans*- dehidrodímero do resveratrol EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

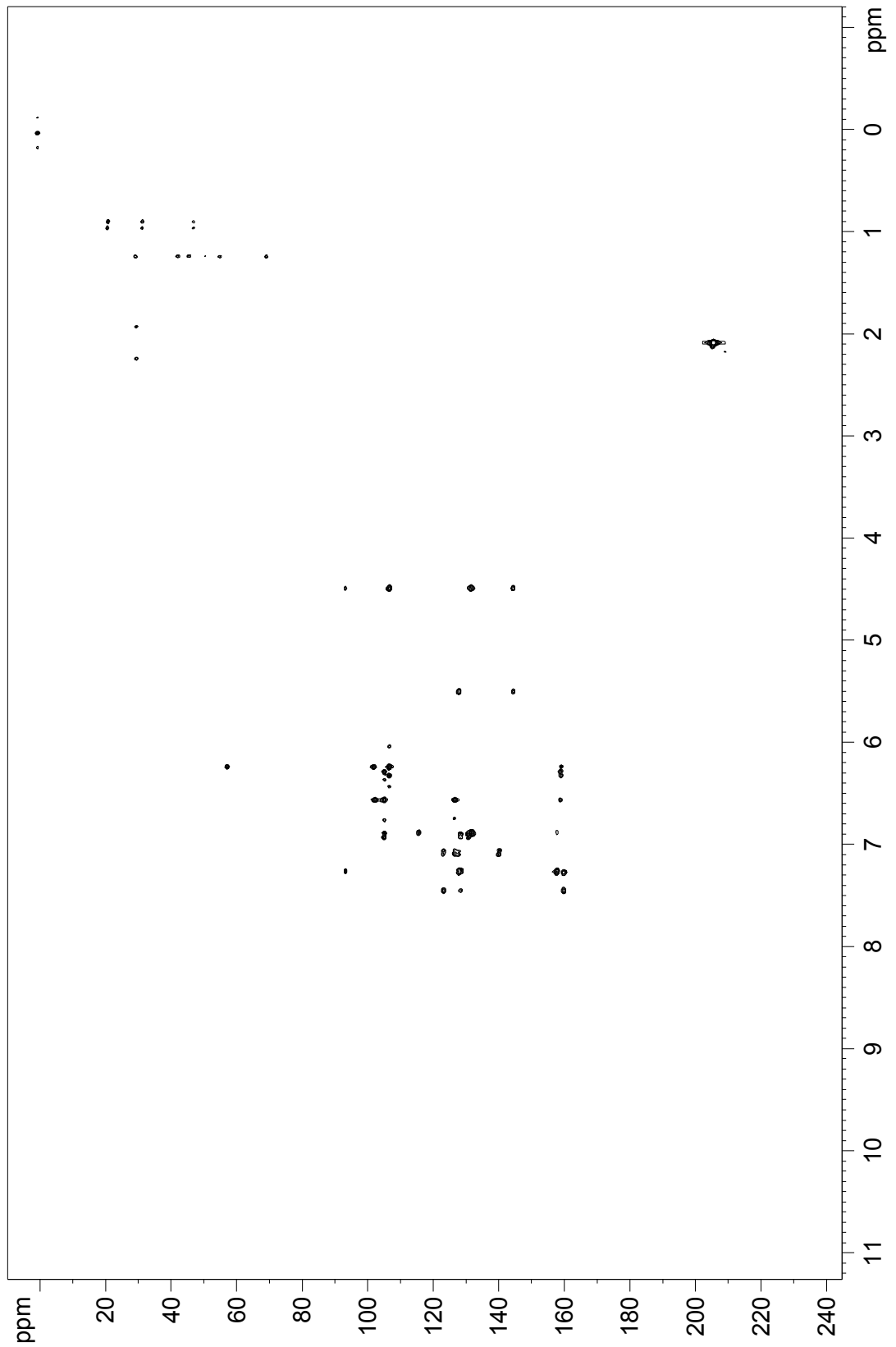


FIGURA 28- ESPECTRO HMBC DO DERIVADO *trans*- dehidrodímero do resveratrol EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

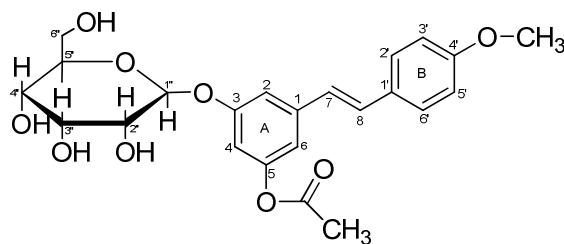
As correlações a curta distância (HSQC) e a longa distância (HMQC) também demonstraram que o sinal do H-7' em  $\delta_H$  7,04 se correlaciona com o sinal do C-6' em  $\delta$ 127,64 que está diretamente ligado ao H-6'; também mostra que o sinal do H-8' em  $\delta_H$  6,90 está correlacionado com o sinal em  $\delta$ 104,83 C-10', C-14' que está diretamente ligado com o H-10', H-14'.

A estrutura do *trans*-dehidrodímero do resveratrol indica que a reação de dimerização ocorre através do radical fenol na posição 4'-OH do resveratrol. Na literatura encontram-se relatos da presença do radical 4'-O-metil-resveratrol, o qual impede que o resveratrol sofra dimerização pela ação de enzimas lacases isoladas (NICOTRA *et al.*, 2004).

#### 4.5.2 Caracterização dos metabólitos obtidos por biotransformação do *trans*-resveratrol com o fungo *Penicillium* sp. (64)

No processo de bioconversão realizado com o fungo *Penicillium* sp. (64) obteve-se o composto *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo (**VIII**) que possui a fórmula molecular  $C_{23}H_{26}O_9$ . Não encontramos relatos na literatura da existência dessa substância, portanto trata-se de um composto inédito. O que foi relatado é o derivado *trans*-resveratrol-3-O- $\beta$ -glucosídeo conhecido como Piceid (**VII**) que foi obtido por biotransformação partindo-se do resveratrol com a bactéria *Bacillus cereus* (CICHEWICZ; KOUZI, 1998). A mesma substância já foi extraída de culturas da planta *Vitis vinifera* (KORHAMMER; RENIERO; MATTIVI, 1995; TEGUO *et al.*, 1996) e esse composto possui uma estrutura química parecida com o composto obtido no nosso trabalho.

A determinação da estrutura química desta substância foi estabelecida com o auxílio das técnicas espectroscópicas usuais: EM, IV, RMN  $^1H$  e de  $^{13}C$ , além de DEPT.



(VIII)

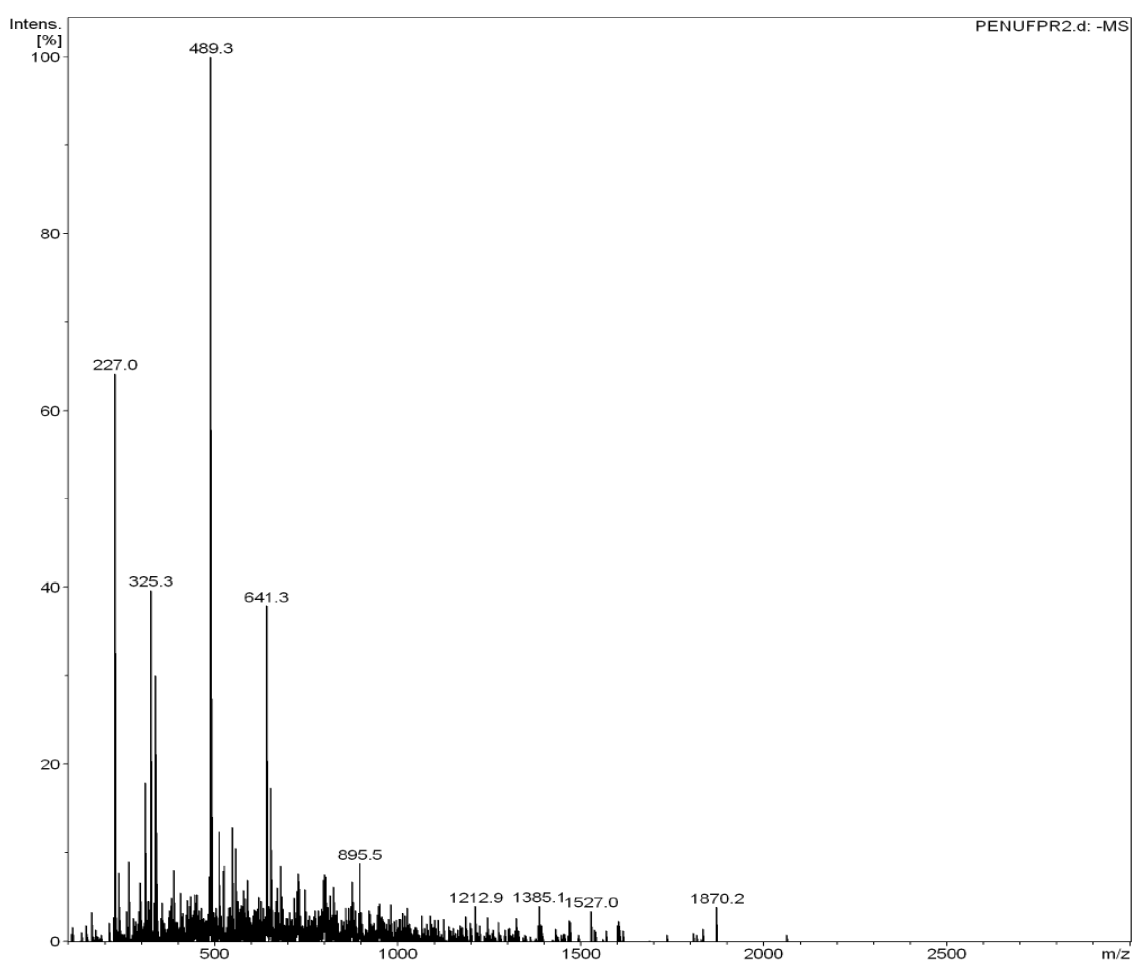


FIGURA 29- ESPECTRO DE MASSAS DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosido, MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO

O espectro de massas (Figura 29) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  489.3 [M-H]<sup>-</sup>, que corresponde à massa molar do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosido (446,45 g/mol), que formou aduto com o solvente utilizado na análise, acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN).



O espectro no IV do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo (Figura 30) apresentou semelhanças com o espectro do *trans*-resveratrol. Uma banda larga referente ao estiramento O-H foi detectada em  $3383\text{ cm}^{-1}$ ; o estiramento C=C do anel aromático foi encontrado em  $1602\text{ cm}^{-1}$ ; em  $1500\text{ cm}^{-1}$  também se visualizou uma banda referente à ligação C=C da olefina; a absorção de dobramento característica de grupos metila ( $\text{CH}_3$ ) foi identificada em  $1380\text{ cm}^{-1}$  e o estiramento da ligação C-H  $\text{sp}^3$  em  $2960\text{ cm}^{-1}$ , portanto em uma frequência mais baixa que  $3000\text{ cm}^{-1}$ , dando evidências de grupamentos metila com hibridização  $\text{sp}^3$ . Já a banda referente ao grupamento C-O apareceu como dois sinais em  $1068$  e  $1229\text{ cm}^{-1}$ , e o estiramento da ligação C=O foi encontrada em  $1728\text{ cm}^{-1}$ .

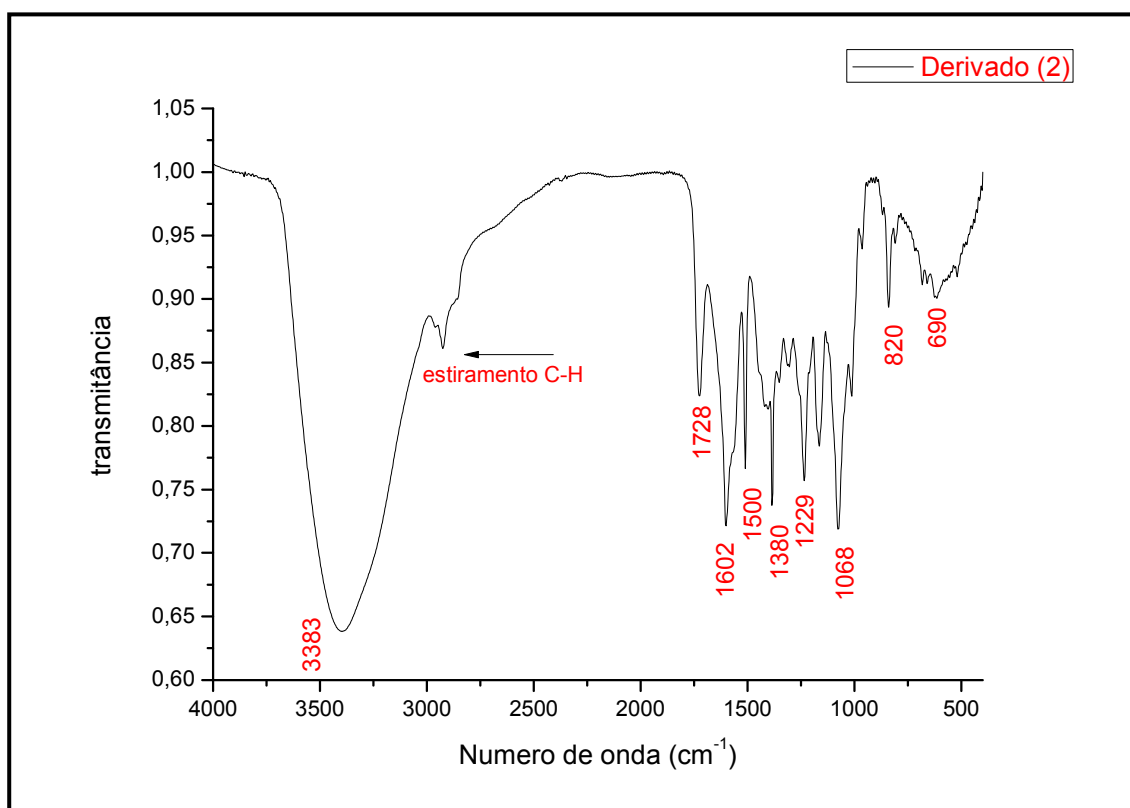


FIGURA 30- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo

O padrão de substituição do anel aromático também pode ser analisado, onde um padrão de substituição *meta* e *para* estão presentes devido aos sinais em  $690$  e  $820\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, característicos desse tipo de substituição.

A análise do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo por RMN  $^1\text{H}$  foi comparada com dados já descritos na literatura para o Piceid (VII) (KORHAMMER; RENIERO; MATTIVI, 1995; TEGUO *et al.*, 1996), que possui estrutura química parecida ao derivado obtido neste trabalho.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo (Figuras 31 a 33, Tabela 8) demonstrou a presença dos hidrogênios ligados diretamente nos dois anéis aromáticos na estrutura da molécula; esses hidrogênios foram caracterizados na região de 6,0-8,0 ppm, onde foram encontrados dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,57 correspondentes a 2H, e  $\delta_{\text{H}}$  7,53 correspondente a 2H; um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,98 foi identificado como um singlete correspondente a 2H, e um tripleto correspondente a 1H foi detectado em  $\delta_{\text{H}}$  6,28.

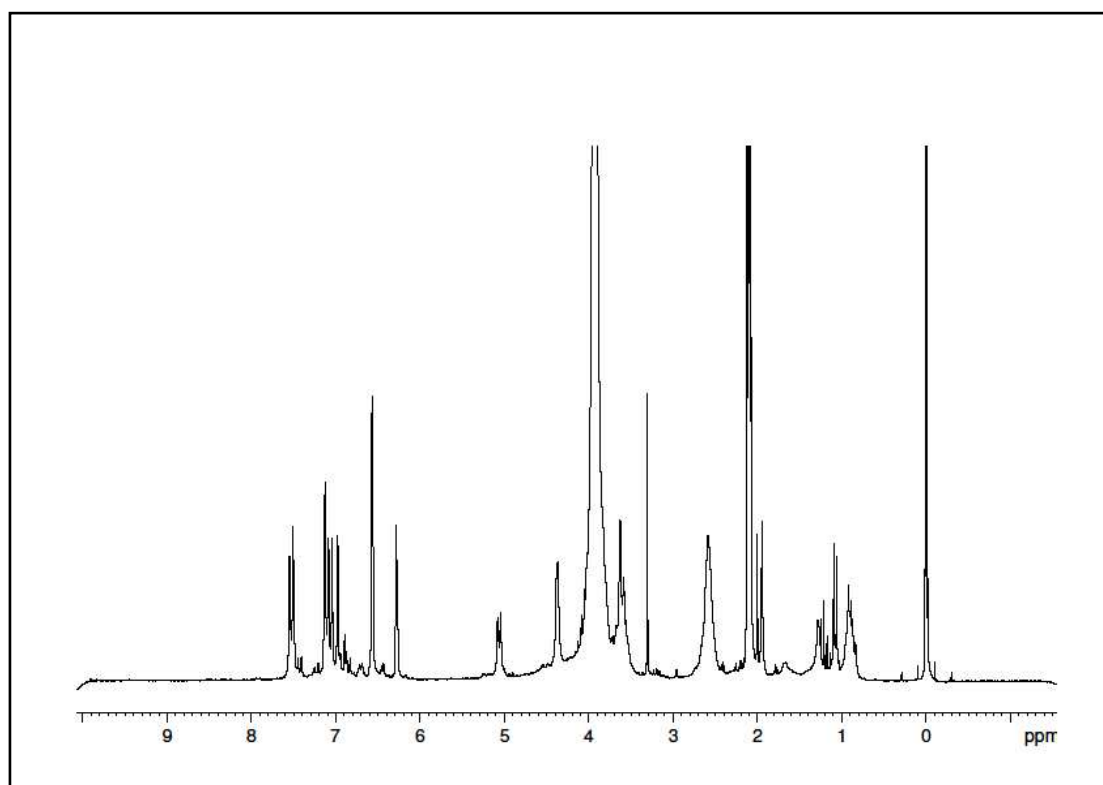


FIGURA 31- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *Penicillium* sp. (64) ( $\delta$  ppm)

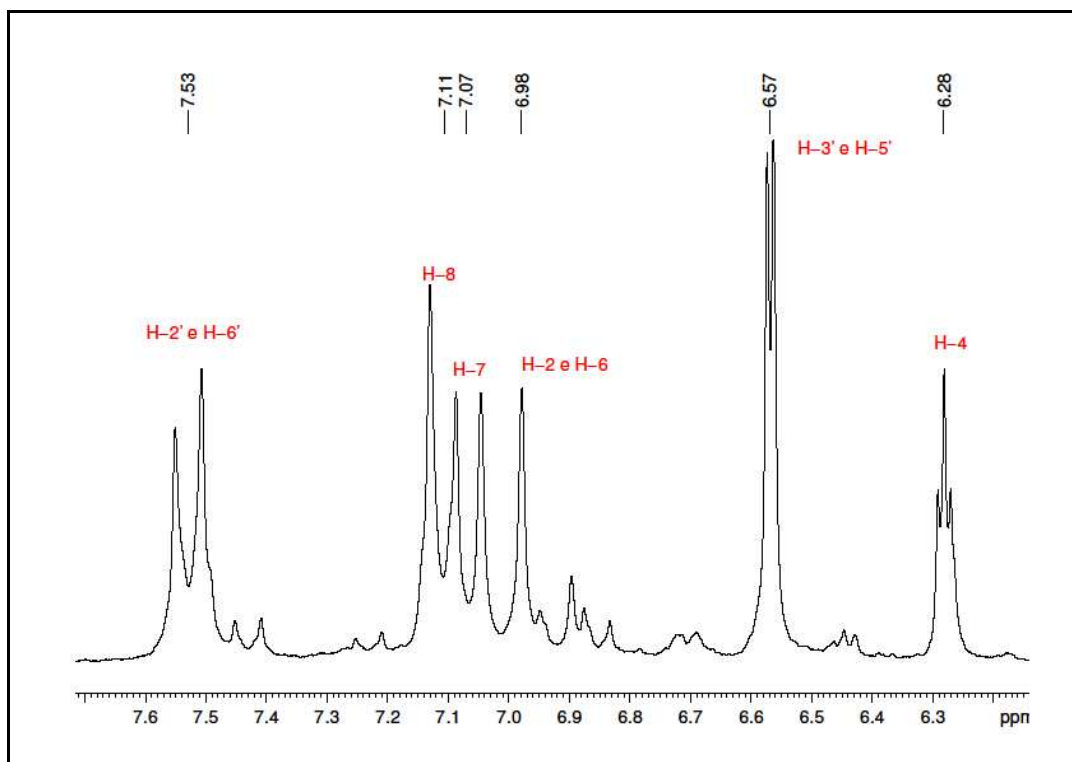


FIGURA 32- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *Penicillium* sp. (64) NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  6,20 A 7,70 ppm ( $\delta$  ppm)

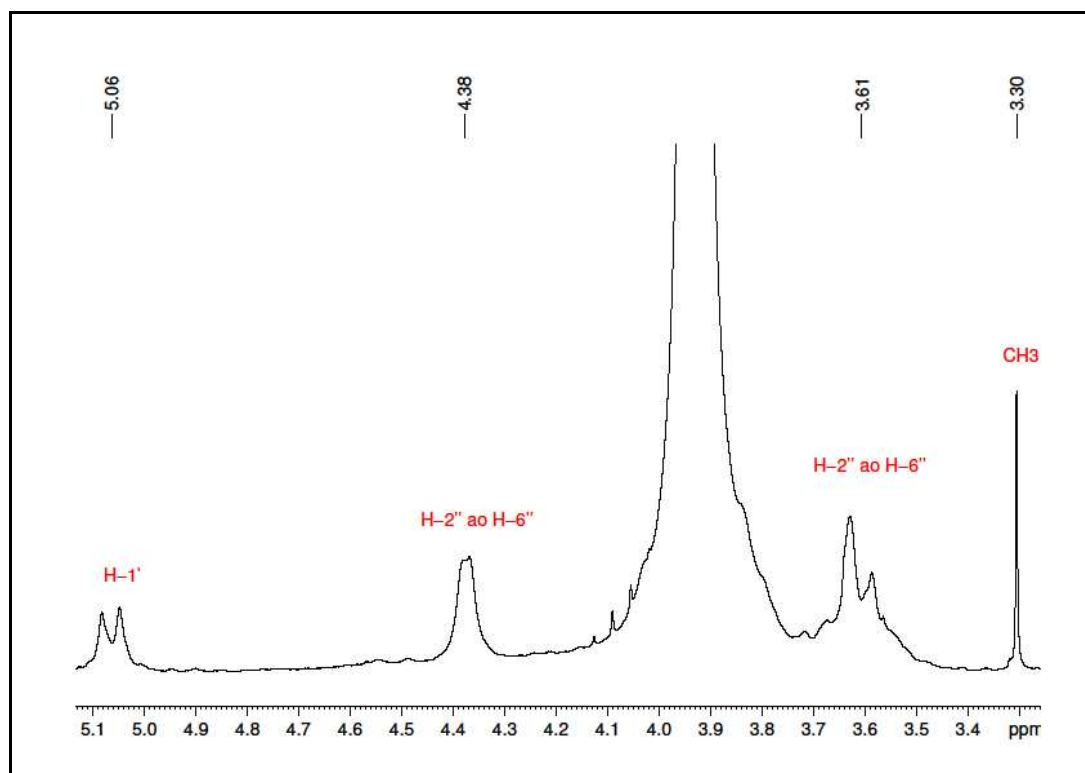


FIGURA 33- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *Penicillium* sp. (64) NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  3,20 A 5,20 ppm ( $\delta$  ppm)

A estereoisomeria para o composto pode ser definida com *trans* já que a  $J^{\beta}$  (H-7 e H-8) foi de 16,60Hz confirmando uma isomeria *trans*, para os dois prótons alifáticos os sinais foram dubletos em  $\delta_H$  7,07 e  $\delta_H$  7,11. Os sinais dos prótons do substituinte glicosídeo foram encontrados na região de 3,20-5,20 ppm, foi possível visualizar a presença de multipletos nessa região característico de prótons de glicosídeos. O sinal correspondente aos prótons da metila  $sp^3$  - CH<sub>3</sub> do grupamento éster foi encontrado como um singlete integrando 3H em  $\delta_H$  3,30.

TABELA 8- DADOS DE RMN<sup>1</sup> H DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM O FUNGO *Penicillium* sp. (64).

H	<i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo <sup>1</sup>	<i>trans</i> -resveratrol-3-O- $\beta$ -glucosídeo(Piceid) <sup>2</sup>
H-2	6,98 (s, 1H)	6,78(s, 1H)
H-4	6,28 (t, J=2.01 Hz, 1H)	6,44 (s, 1H)
H-6	6,98 (s, 1H)	6,61 (s. 1H)
H-7	7,07 (d, J= 16.6Hz, 1H)	6,84 (d, J= 16.3 Hz, 1H)
H-8	7.11 (d, J=16.6Hz, 1H)	7,00 (d, J= 16.3 Hz, 1H)
H-2',6'	7,53 (d, J= 8.54 Hz, 2H)	7,35 (d, J=8.5Hz, 2H)
H-3', 5'	6,57 (d, J= 2.19 Hz, 2H)	6,76 (d, 2H)
H-1''	5,06 (d, J= 7.35 Hz, 1H)	4,77 (d, J= 7.1 Hz, 1H)
H-2''	3,05-4,50 (1H)	3,30-4,38 (m, 1H)
H-3''	3,05-4,50 (1H)	3,38-3,48 (1H)
H-4''	3,05-4,50 (1H)	3,38-3,48 (1H)
H-5''	3,05-4,50 (1H)	3,38-3,48 (1H)
H-6''	3,05-4,50 (1H)	3,92 (dd, 1H)
CH <sub>3</sub>	3,80 (3H)	-----
CH <sub>3</sub>	3,30 (s, 3H)	

NOTA: <sup>1</sup>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz, ppm, (Dep. Química, UFPR);

<sup>2</sup>Dados da literatura, Teguó, et al, 1996<sup>1,2</sup>; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz, ppm

Análises de RMN <sup>13</sup>C (Tabela 9 e Figuras 34 a 36) e DEPT 135 (Figura 37) também foram realizadas e os resultados comparados com dados da literatura para a substância Piceid (**VII**) (KORHAMMER; RENIERO; MATTIVI, 1995; TEGUO *et al.*, 1996), que possui estrutura química parecida com este derivado.

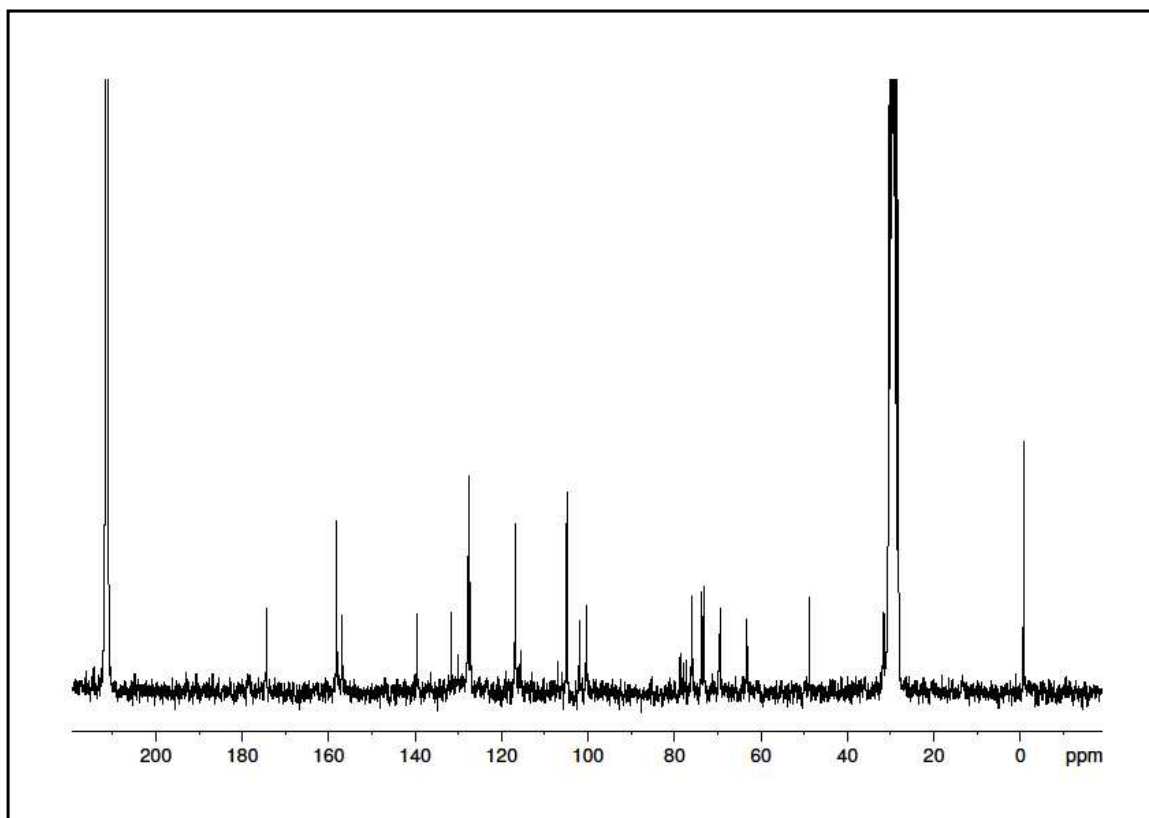


FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo ( $\delta$  PPM)

Os carbonos aromáticos foram detectados como sinais em região mais desblindada do espectro ( $\delta$  100 a 160) e correspondem aos doze carbonos aromáticos do derivado *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo: C-1 ( $\delta$  140,33), C-2 ( $\delta$  105,67), C-3 ( $\delta$  157,74), C-4 ( $\delta$  100,94), C-5 ( $\delta$  158,94), C-6 ( $\delta$  102,80), C-1' ( $\delta$  132,42), C-2' ( $\delta$  128,41), C-3' ( $\delta$  117,56), C-4' ( $\delta$  158,94), C-5' ( $\delta$  117,56), C-6' ( $\delta$  128,41). A presença de sinais na região das olefinas correspondente aos carbonos não saturados  $\text{sp}^2$  C-7 ( $\delta$  127,97) e C-8 ( $\delta$  128,58) foi identificada.

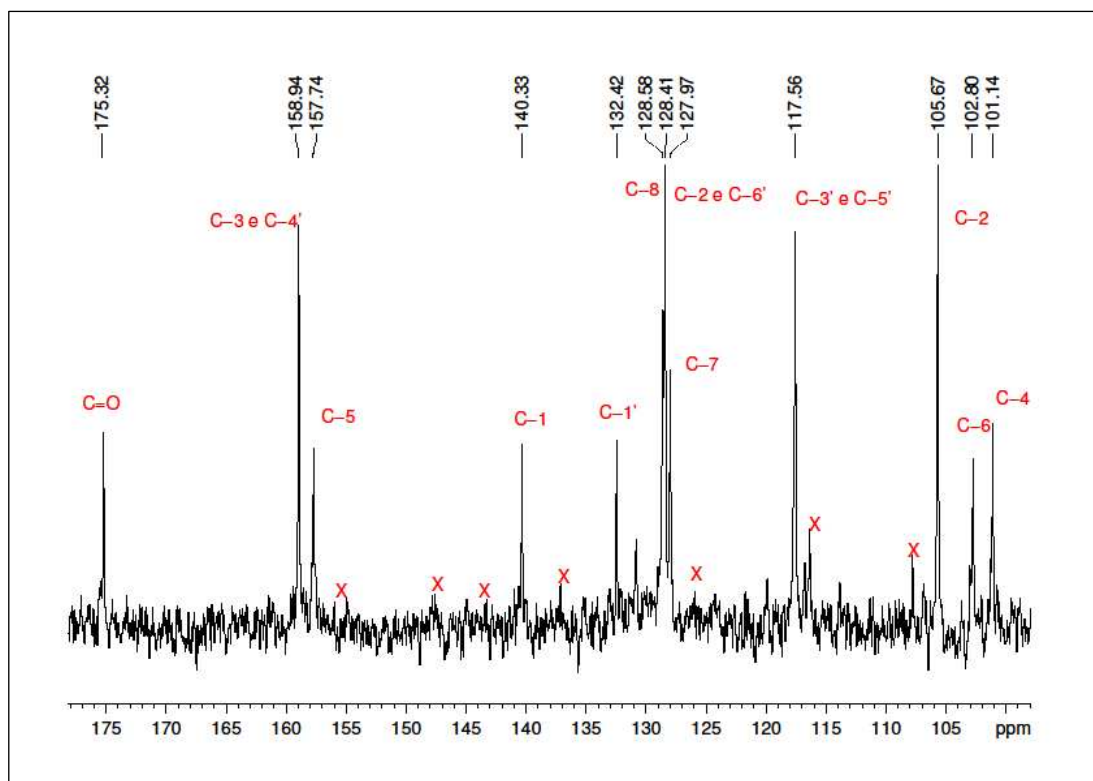


FIGURA 35- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo ( $\delta$  PPM) NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  100,00 A 175,00 ppm

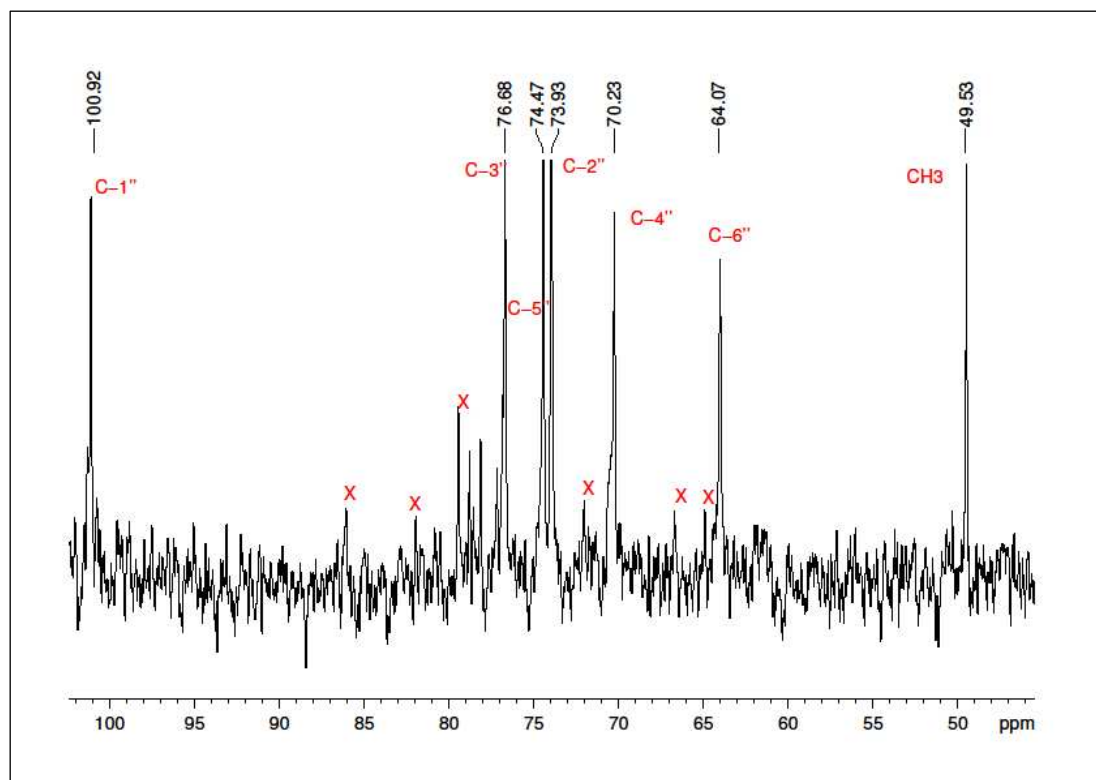


FIGURA 36- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo ( $\delta$  PPM) NA REGIÃO ENTRE  $\delta$  49,53 A 100,92 ppm

Os carbonos do substituinte glucosídeo foram encontrados em região mais blindada do espectro 60,00- 101,00 ppm, sendo que o carbono da metila do grupamento O-CH<sub>3</sub> foi encontrado em  $\delta$  49,53. A metila CH<sub>3</sub> do grupamento éster que deveria aparecer na região de ( $\delta$  20-30) não foi visualizada, devido à sobreposição com o sinal do solvente (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO), já o grupo carbonila do éster (C=O) pode ser identificado em  $\delta$  175,32.

TABELA 9- DADOS DE RMN<sup>13</sup> C DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo OBTIDO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO *trans*-resveratrol COM *Penicillium* sp. (64).

C	<i>trans</i> -resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo <sup>1</sup>	<i>trans</i> -resveratrol-3-O- $\beta$ -glucosídeo(Piceid) <sup>2</sup>	DEPT <sup>1</sup>
C-1	140,33	141,40	Cq
C-2	105,67	107,00	CH
C-3	158,94	160,5	Cq
C-4	101,14	104,1	CH
C-5	157,74	159,6	Cq
C-6	102,80	108,40	CH
C-7	127,97	126,70	CH
C-8	128,58	130,0	CH
C-1'	132,42	130,30	Cq
C-2'	128,41	128,90	CH
C-3'	117,56	116,5	CH
C-4'	158,94	158,50	Cq
C-5'	117,56	116,50	CH
C-6'	128,41	128,90	CH
C-1''	100,92	102,40	CH
C-2''	73,93	75,00	CH
C-3''	76,68	78,10	CH
C-4''	70,23	71,50	CH
C-5''	74,47	78,30	CH
C-6''	64,07	62,60	CH <sub>2</sub>
CH <sub>3</sub>	49,53	-----	CH <sub>3</sub>
C=O	175,32	-----	Cq

NOTA: <sup>1</sup>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz, ppm, (Dep. Química, UFPR); <sup>2</sup>Dados da literatura, Teguog, et al, 1996 <sup>2</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>), 75 MHz, ppm); Cq-Carbono quaternário

Analisando o espectro de DEPT 135 (Figura 37 e Tabela 10) desta substância e comparando com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , foi possível caracterizar os 23 átomos de carbono do derivado *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo como:

Carbono	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	Cq
Total=23	2	1	14	6

TABELA 10- - CARACTERIZAÇÃO DOS CARBONOS DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo

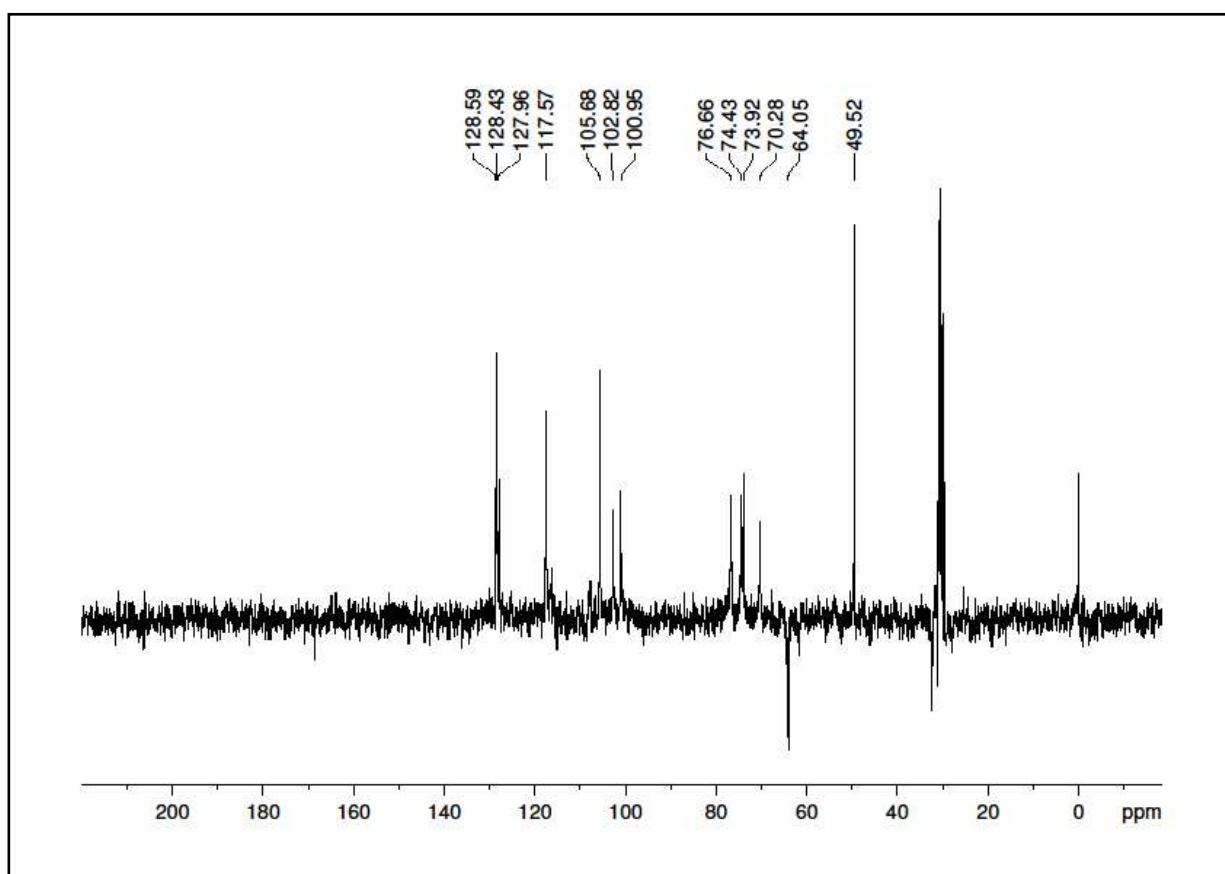


FIGURA 37- ESPECTRO DE DEPT 135 (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo ( $\delta$  PPM)

A partir do espectro de HMBC (Figura 38) foi possível detectar a correlação entre o H-1'' em  $\delta_{\text{H}}$  5,06 e o C-3 em  $\delta$  158,94 e o H-2 em  $\delta_{\text{H}}$  6,98 e o C-3; outra correlação foi observada entre H-3'' em  $\delta_{\text{H}}$  3,48 e o C-1'' em  $\delta$  100,92. Esses dados foram suficientes para estabelecer a ligação do anel aromático (a)



através do radical fenol na posição 3-OH do resveratrol no C-1'' do glucosídeo e, também, verificar uma correlação dentro do substituinte.

Outra correlação importante foi a que comprovou a ligação de um grupamento acetila no radical fenol na posição 5-OH do resveratrol, comprovado pela correlação entre o H do grupamento metila em  $\delta_H$  3,30 e o C-5 em  $\delta$ 157,74. Assim, foi possível confirmar a modificação no anel aromático (a). Em relação ao grupamento olefina, verificou-se que o mesmo permaneceu como na substância original (III); correlação entre o H-7 em  $\delta_H$  7,07 e o C-1 no anel (a) em  $\delta$ 140,33 e entre o mesmo H-7 e o C-6' no anel (b) em  $\delta$ 128,41 e, também, entre o H-8 em  $\delta_H$  7,11 e o C-2' no anel (b) em  $\delta$ 128,41, confirmaram esta hipótese.

Correlações a curta distância (HSQC) também foram analisadas (Figura 39) como no caso do H-6 em  $\delta_H$  6,57 e o C-6 no anel (a) em  $\delta$ 102,80 e também entre o H-2' em  $\delta_H$  7,53 e o C-2' no anel (b) em  $\delta$ 128,41.

As modificações ocorridas no *trans*-resveratrol foram três: uma reação de glicosilação na posição 3-OH do anel aromático (a); uma acetilação na posição 5-OH do anel aromático (a), ocasionando uma substituição da função química fenol para éster nessa posição e uma metilação na posição 4'-OH do anel aromático (b).

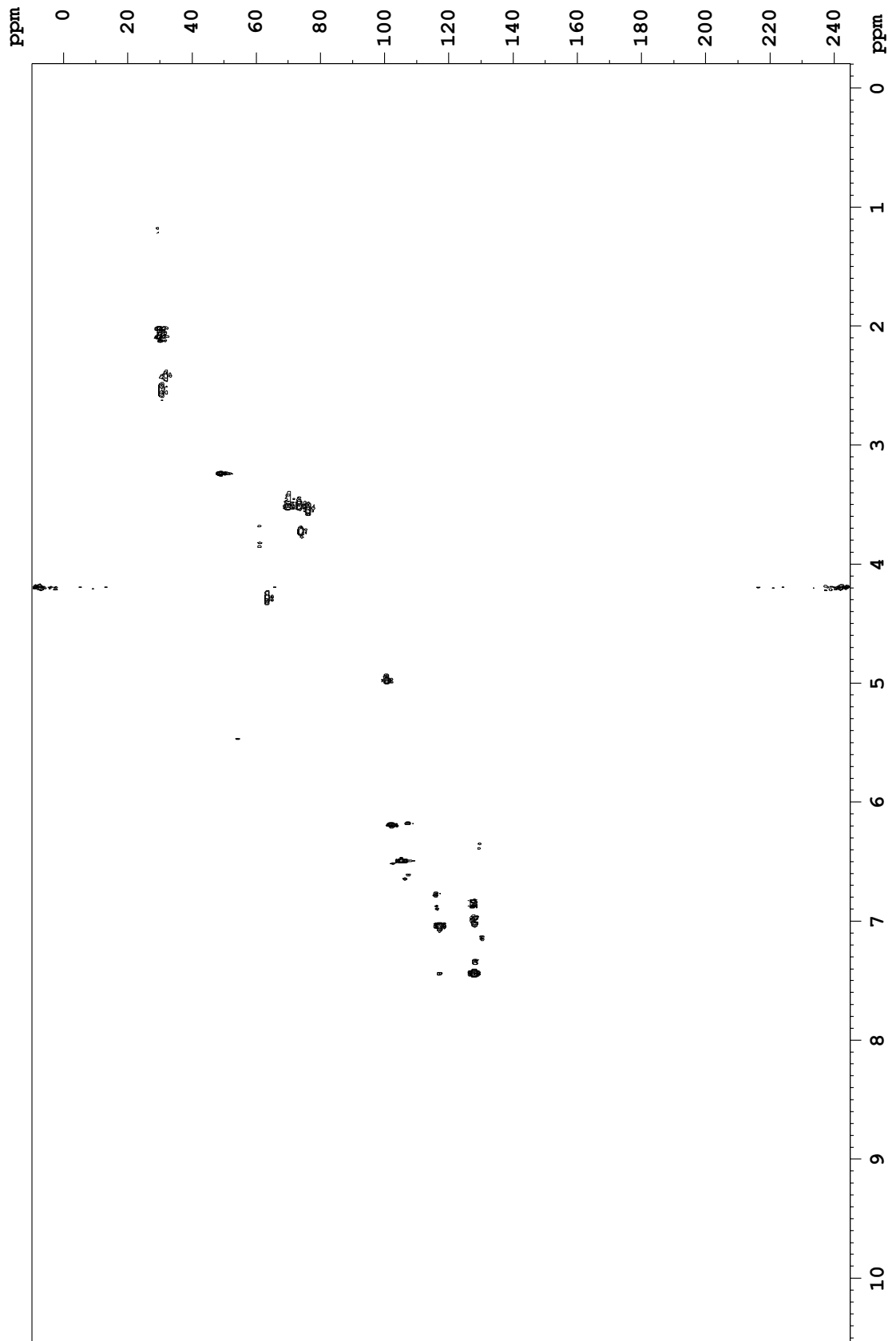


FIGURA 38- MAPA DE CONTORNO HSQC DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; 400 MHz

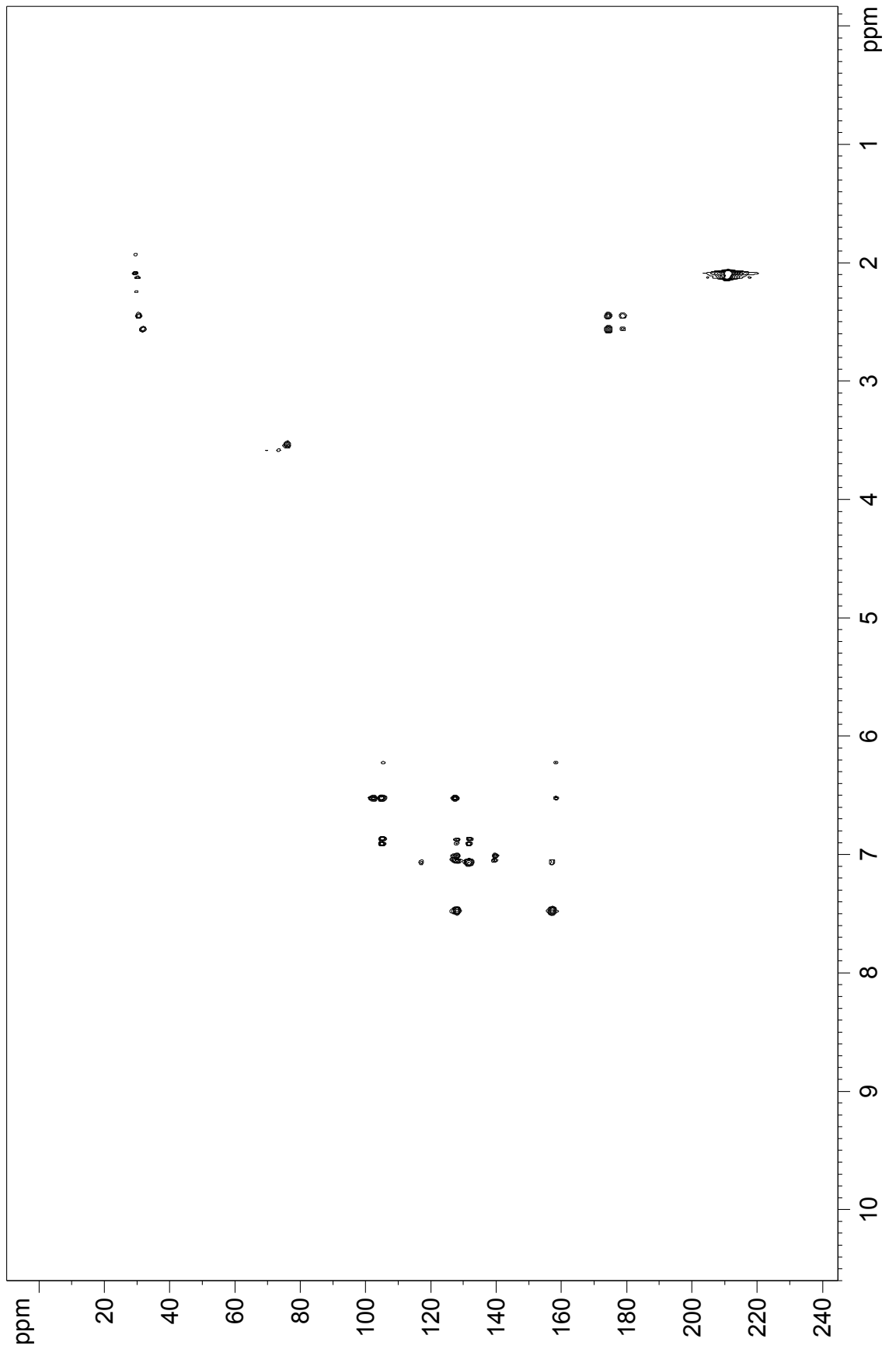


FIGURA 39- MAPA DE CONTORNO HMBC DO *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo - (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; 400 MHz

Nenhum relato dessa substância pode ser encontrado, portanto trata-se de uma substância inédita. O que há relatado é o derivado *trans*-resveratrol-3-O- $\beta$ -glucosídeo, conhecido como Piceid **(VII)**, o qual foi obtido por biotransformação com a bactéria *Bacillus cereus* a partir do *trans*-resveratrol (CICHEWICZ; KOUZI, 1998). Esta mesma substância já foi extraída de culturas de *Vitis vinifera* (KORHAMMER; RENIERO; MATTIVI, 1995; TEGUO *et al.*, 1996). Pela sua proximidade em termos de estrutura química, foi utilizado como apoio ao esclarecimento do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo, produto natural inédito e, pela primeira vez, sintetizado por um processo de biotransformação.

#### 4.6 MECANISMO DE REAÇÃO POR VIA ENZIMÁTICA

Os compostos apresentados anteriormente foram oxifuncionalizados em decorrência das enzimas dos fungos presentes no meio reacional. A biodiversidade enzimática dos fungos pode ser demonstrada pela geração de moléculas que podem apresentar atividade farmacológica diferente do fármaco original (FABER, 1997).

Microrganismos contêm enzimas com diferentes estruturas, responsáveis por catalisar diversas reações. As enzimas podem ser classificadas dentro de seis categorias principais, de acordo com os tipos de reações que catalisam.

As modificações na estrutura química do *trans*-resveratrol usado como substrato e ocorrido no processo de biotransformação foram provavelmente ocasionadas por alguma dessas enzimas que, coletivamente, fazem parte da maquinaria enzimática dos fungos utilizados.

Na literatura há alguns estudos que demonstram que o *trans*-resveratrol foi biotransformado em diferentes produtos de oxidação (dímeros) utilizando, no processo, microorganismos inteiros. Exemplos são as culturas com *B. cinerea* (BREUIL *et al.*, 1998) e as reações com lacases (CICHEWICZ; KOUZI; HAMANN, 2000; NICOTRA *et al.*, 2004), como anteriormente citado. Neste contexto, seria interessante investigar a presença de oxiredutases no *B. sorokiniana* que, se presentes, poderiam esclarecer os mecanismos de produção do *trans*-dehidrodímero do resveratrol.

Dentre os microorganismos utilizados em reações de bioconversão destacam-se os fungos filamentosos, formados por células eucarióticas. No caso desse trabalho, os fungos que apresentaram resultados positivos para bioconversão são filamentosos e, portanto, apresentam sistema enzimático semelhante ao dos seres humanos, exemplificado pelo citocromo P<sub>450</sub>, ou CYP450 (FABER, 1997). Portanto, podem ser considerados como uma alternativa em estudos de metabolismo de fármacos, reduzindo, inclusive, ou mesmo eliminando, o uso de animais nesses modelos experimentais.

Os fármacos, assim como outros agentes químicos estranhos ao organismo, ou xenobióticos são metabolizados, principalmente, pelas enzimas microssômicas hepáticas, em que se destacam o CYP450 e a NADPH-Citocromo c redutase, uma hemoproteína oxidativa e uma flavoproteína, respectivamente, que associadas a lipídeos, formam o sistema MFO (oxidase de função mista). O CYP450 é uma molécula encontrada em várias espécies, incluindo a humana e nos organismos eucariontes utilizados neste trabalho.

Como já citado, o *trans*-resveratrol utilizado nesse trabalho como substrato é um fármaco que possui baixa biodisponibilidade *in vivo*. Interessante, portanto, seria estudar se os compostos obtidos no processo de biotransformação aqui relatado poderiam ser metabólitos com maior biodisponibilidade *in vivo*, uma vez que há similaridade entre os sistemas enzimáticos microbianos e o sistema mitocondrial dos citocromos dos mamíferos. Considerando que as monooxigenases são isoladas com dificuldade, por se tratarem de enzimas aderidas à membrana celular e que necessitam reciclar o cofator NADPH, uma alternativa para se obter os produtos das reações catalisadas por essas enzimas seria a utilização de sistemas que contenham esses microorganismos.

A principal desvantagem apresentada por essa metodologia foi o baixo rendimento dos produtos, fato este que pode se demonstrado sua utilidade, ser facilmente otimizado.

#### 4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO RESVERATROL E DOS DERIVADOS

Como já referido na introdução deste trabalho, o *trans*-resveratrol tem atraído muito interesse na área da farmacologia devido, principalmente, às suas ações antioxidantes (PINTO; GARCIA-BARRADO; MACIAS, 1999) e quimiopreventiva, devido a sua habilidade em bloquear alguns tipos de processos carcinogênicos por meio da captura de ROS e pela inibição de várias enzimas, como quinases, cicloxigenases, ribonucleotídeos redutases e DNA polimerases (JANG *et al.*, 1997), todas indispensáveis ao metabolismo celular. Além disso, o *trans*-resveratrol parece proteger o sistema vascular por inibição da LDL, mantendo o endotélio, possuindo propriedades antiateroscleróticas (SINHA; CHAUDHARY; GUPTA, 2002); é capaz, também, de fazer supressão da agregação plaquetária (WANG *et al.*, 2002a). Estas e outras ações aumentam as perspectivas benéficas para o seu uso em distúrbios cardiovasculares (RENAUD; DELORGERIL, 1992). Foram obtidos, também, resultados promissores de sua utilização em doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer e de Parkinson ou a Doença de Huntington (SAIKO *et al.*, 2008). Pelo fato da neurotoxicidade estar relacionada à deficiência orgânica mitocondrial, tal condição poderia ser melhorada pela inclusão de antioxidantes e de modificadores metabólicos como o *trans*-resveratrol ou seus derivados metabólicos, abrindo novas perspectivas para o seu emprego medicinal.

Como recentemente revisto por (COTTART *et al.*, 2010), estudos *in vitro* têm demonstrado que o *trans*-resveratrol inibe a proliferação celular, induzindo a apoptose e, conseqüentemente, bloqueando a progressão do ciclo celular em numerosos tipos de linhagens celulares de câncer humano. Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar se os compostos obtidos por biotransformação do *trans*-resveratrol seriam portadores de atividades biológicas, dentro da perspectiva de se tornarem medicamentos benéficos para a saúde humana. Com este objetivo em mente, estudou-se o efeito dos derivados *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo e *trans*-dehidrodímero do resveratrol sobre o comportamento de linhagens celulares em ensaios de proliferação, usando o teste clássico do MTT (MOSMANN, 1983) como metodologia experimental.

O MTT, ou o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, é uma substância que, em solução, possui coloração amarelada e sua redução leva à formação de *formazan*, um produto de coloração púrpura que pode ser doseado espectrofotometricamente. A maior aplicação deste ensaio ocorre quando se pretende conhecer a viabilidade de células ou o desempenho em termos de proliferação celular, tornando-se útil quando se quer avaliar a toxicidade de novas substâncias. As reações de redução ocorrem somente quando redutases intracelulares estão ativas e, portanto, a conversão é freqüentemente utilizada como uma medida de células viáveis metabolicamente ativas. Mudanças na atividade metabólica podem dar grandes alterações em resultados pelo ensaio do MTT enquanto o número de células viáveis é constante. Assim, quando a quantidade de *formazan* produzido por células tratadas com um determinado agente é comparada com a quantidade produzida pelas células sem exposição ao agente, a eficácia deste agente em causar a morte celular (comprometimento da viabilidade celular) ou alterar o metabolismo das células (interferência na proliferação celular) pode ser deduzida através da elaboração de curvas dose-resposta, onde a intensidade de *formazan* formada é diretamente proporcionais à atividade de desidrogenases mitocondriais presentes em células viáveis (MOSMANN, 1983).

#### 4.7.1 Avaliação da proliferação celular

As linhagens celulares McCoy, B16F10 e Hela, cujas morfologias estão retratadas na Figura 40, foram escolhidas para determinação do efeito do *trans-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo* e do dehidrodímero do resveratrol obtidos por biotransformação sobre a proliferação celular por se tratarem de células que podem ser mantidas por longos períodos em condições de cultivo *in vitro* e cujas reações frente a tratamentos com extratos de plantas ou compostos puros são simples de monitorar (RUMJANEK *et al.*, 2001), podendo revelar um potencial farmacológico diferenciado para as substâncias em estudo.

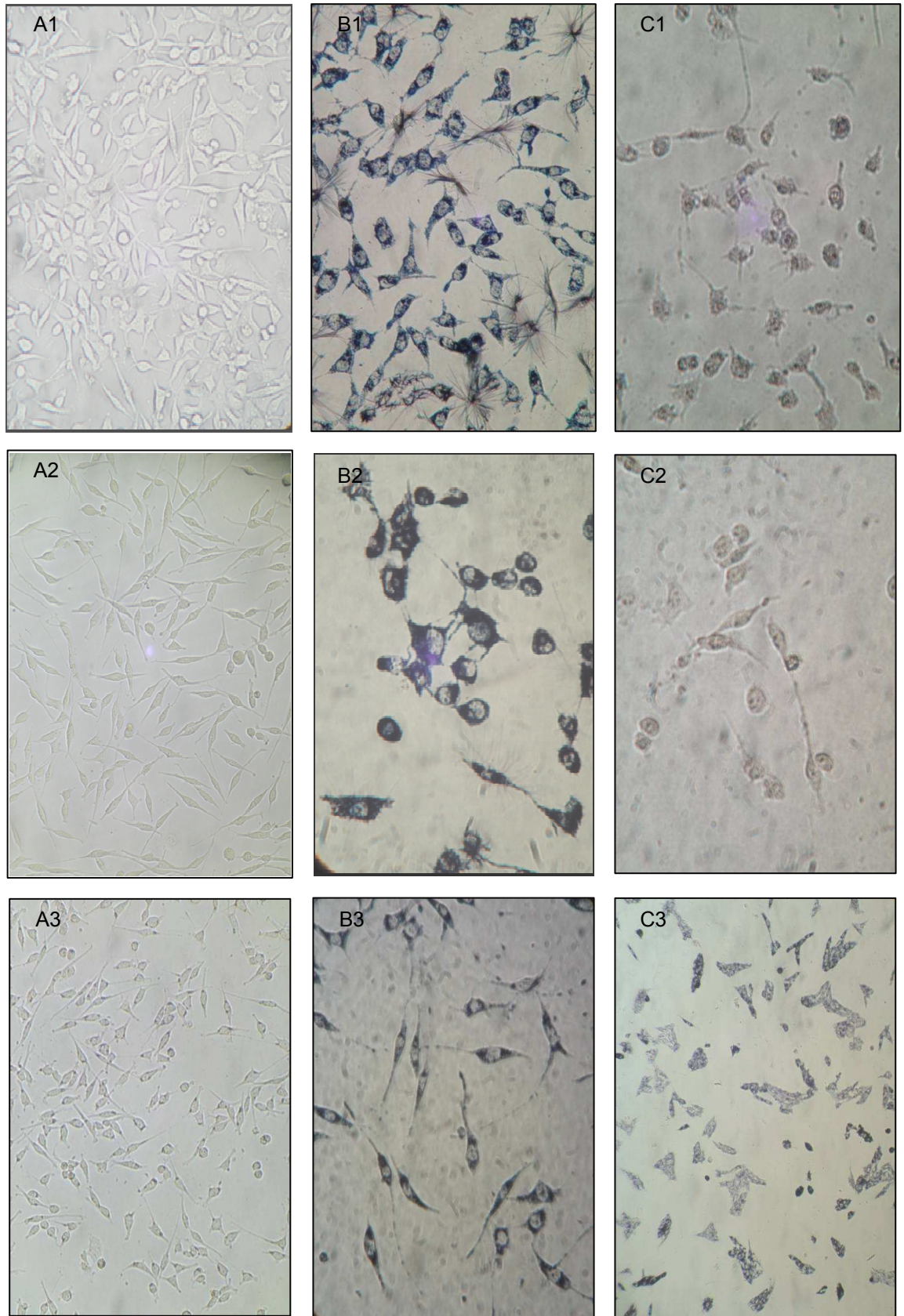


FIGURA 40- MORFOLOGIA CARACTERÍSTICA DE CÉLULAS McCOY (A1), B16F10 (A2) E HELA (A3) E APÓS TRATAMENTO POR 24h COM DMSO (0,1% - B1, B2, B3) E *TRANS-RESVERATROL* (800  $\mu$ M - C1, C2, C3) OBSERVADAS SOB MICROSCOPIA INVERTIDA. OS PAINÉIS B MOSTRAM CÉLULAS VIVAS COM CRISTAIS DE FORMAZAN ENQUANTO OS PAINÉIS C MOSTRAM CÉLULAS MORTAS.



Neste contexto, as células da linhagem McCoy são fibroblastos não tumorais de camundongos que proliferam de forma rápida e uniforme quando adequadamente cultivadas (GORDON; QUAN, 1965). Essa linhagem serve de modelo experimental para o estudo de várias ações biológicas de substâncias puras e extratos vegetais, com destaque para a avaliação da toxicidade celular dos mesmos (DRAGANOVA-FILIPOVA *et al.*, 2008).

A linhagem de melanoma murino B16F10 são células que podem ser mantidas com relativa facilidade *in vitro*. É altamente tumorigênica *in vivo*, proliferando espontaneamente quando inoculadas em camundongos, com grande habilidade para formar metástases (NAKAMURA *et al.*, 2002). Células B16F10 são usadas como modelo para o estudo das várias etapas envolvidas na melanogênese (NGUYEN *et al.*, 2007). Já as células da linhagem Hela, também facilmente cultivadas, são originárias do adenocarcinoma de cérvix uterino da cidadã americana Henriquetta Lacks, diagnosticada com tumor cervical em 1951 (BROWN; HENDERSON, 1983).

Células dessas linhagens foram, então, expostas por 24 horas com diferentes concentrações do *trans*-resveratrol, do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo e do *trans*-dehidrodímero do resveratrol e sua atividade metabólica avaliada através de curvas dose-resposta. O solvente DMSO foi usado a 2,5% como controle positivo do ensaio, pois nesta concentração mostrou-se capaz de induzir, de forma significativa, a morte celular ( $58,83 \pm 2,48\%$ ;  $p < 0,0001$   $n=4$ ) para o tratamento com a linhagem McCoy, ( $57,16 \pm 4,87\%$ ;  $p < 0,0001$   $n=4$ ) nas células B16F10 e ( $53,70 \pm 1,96\%$ ;  $p < 0,0001$   $n=4$ ) para o tratamento com a linhagem Hela. Na concentração de DMSO a 0,1%, quantidade esta presente nas culturas onde os compostos foram adicionados, mostrou não interferir no ensaio ( $95,60 \pm 2,02\%$ ;  $n=4$ ) para a linhagem McCoy, ( $93,90 \pm 4,64\%$ ;  $n=4$ ) para o tratamento com a linhagem B16F10 e ( $94,57 \pm 2,16\%$ ;  $n=4$ ) com células Hela, com resultados semelhantes ao grupo controle, ou seja, ao grupo de células não expostas aos compostos, os valores foram normalizados em 100%.

Para o *trans*-resveratrol, redução na percentagem de células recuperadas em relação ao controle, em todas as três linhagens incluídas neste trabalho, foi observada. Ainda, este efeito foi dependente da dose. Assim, somente

86,99±4,79 ( $p<0,05$ ;  $n=4$ ), 79,10±7,00; 70,65±4,44; 63,71±6,01; 58,60±1,89; 32,69±2,42; 26,76±3,04% de células McCoy foram recuperadas (Figura-41 A), respectivamente para as doses de 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  ( $p<0,0001$  para as doses entre 25 a 800  $\mu\text{M}$ ;  $n=4$ ).

Embora a linhagem celular de melanoma murino B16F10 (Figura 42-A) pareça ter sido mais resistente ao tratamento com o *trans*-resveratrol quando comparada a McCoy, o que já era esperado por serem células de melanoma, para as mesmas doses, os valores obtidos foram 91,15±6,17; 86,94±2,14; 72,67±4,58; 69,49±2,90; 60,30±1,70; 37,33±3,41; 28,80±0,31% ( $p<0,05$  para as concentrações de 50 a 800  $\mu\text{M}$ ;  $n=4$ ) e, para as células Hela (Figura 43-A), 77,63±5,15; 67,63±4,85; 57,55±0,37; 51,83±4,88; 44,94±4,94; 30,73±2,03; 23,07±4,77% ( $p<0,05$  para todas as doses;  $n=4$ ). Esses resultados com relação à ação do *trans*-resveratrol já eram esperados e corroboram com dados relatados para este polifenol (JANG *et al.*, 1997; (XIN *et al.*, 2009).

Efeito semelhante, porém de maior intensidade, foi observado para o derivado *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo, quando reduziu, também de forma significativa e nas mesmas concentrações, a percentagem de células recuperadas, com valores de 76,02±1,60; 62,12±7,32; 56,19±5,69; 51,74±6,87; 37,82±3,95; 21,74±1,58 e 19,85±2,55% ( $p<0,05$  para todos;  $n=4$ ) de células McCoy (Figura 41-B); 91,69±3,88; 78,53±2,53; 62,79±5,01; 57,57±4,70; 54,84±0,25; 42,19±4,13; 35,03±2,73% ( $p<0,05$  para as doses entre 25 e 800  $\mu\text{M}$ ;  $n=4$ ) para células B16F10 (Figura 42-B), e 75,60±0,47; 67,58 ±1,34; 63,81±1,84; 54,71±7,71; 43,40±9,96; 24,10±4,77; 20,35±5,14% ( $p<0,05$  para todas as doses;  $n=4$ ) de células Hela (Figura 43-B).

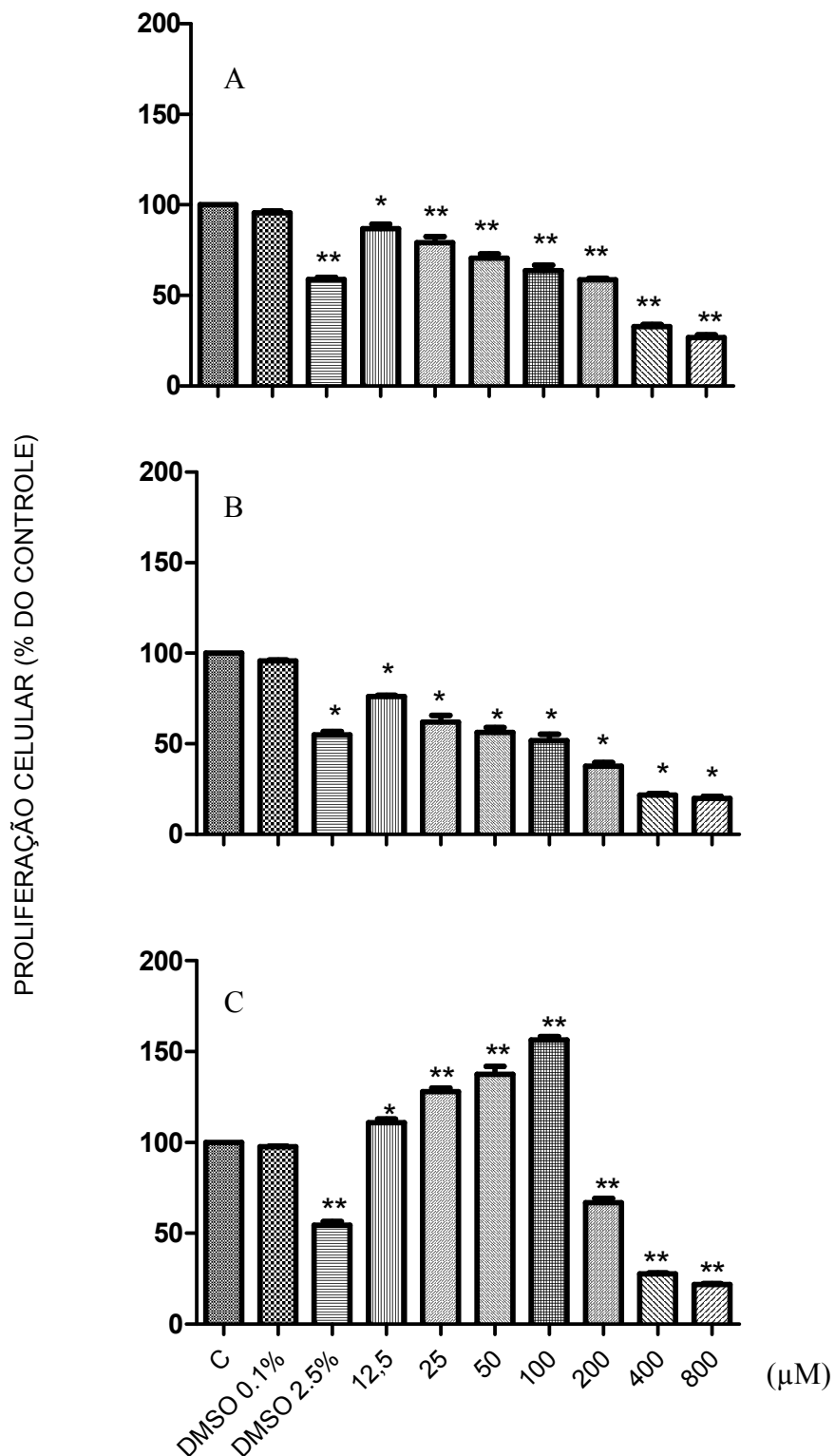


FIGURA 41- EFEITO DO *trans*-resveratrol E DERIVADOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS McCOY. CÉLULAS McCOY FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE *trans*-resveratrol (A), *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo (B) E *trans*-dehidrodímero do resveratrol (C) POR 24 h, A 37° C, EM ATMOSFERA ÚMIDA E SOB TENSÃO DE CO<sub>2</sub>. EM SEGUIDA, FORAM SUBMETIDAS AO ENSAIO DO MTT, COMO DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS. CADA BARRA REPRESENTA A PORCENTAGEM MÉDIA±DP DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ATIVAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE (C), NORMALIZADA EM 100%. DMSO FOI O SOLVENTE USADO PARA DISSOLVER AS SUBSTÂNCIAS. A 2,5%, FOI USADO COMO CONTROLE DE MORTE CELULAR; E A 0,1% CORRESPONDE A SUA QUANTIDADE MÁXIMA NOS ENSAIOS. [\*] p<0.05, [\*\*] p<0.0001 (n=4).

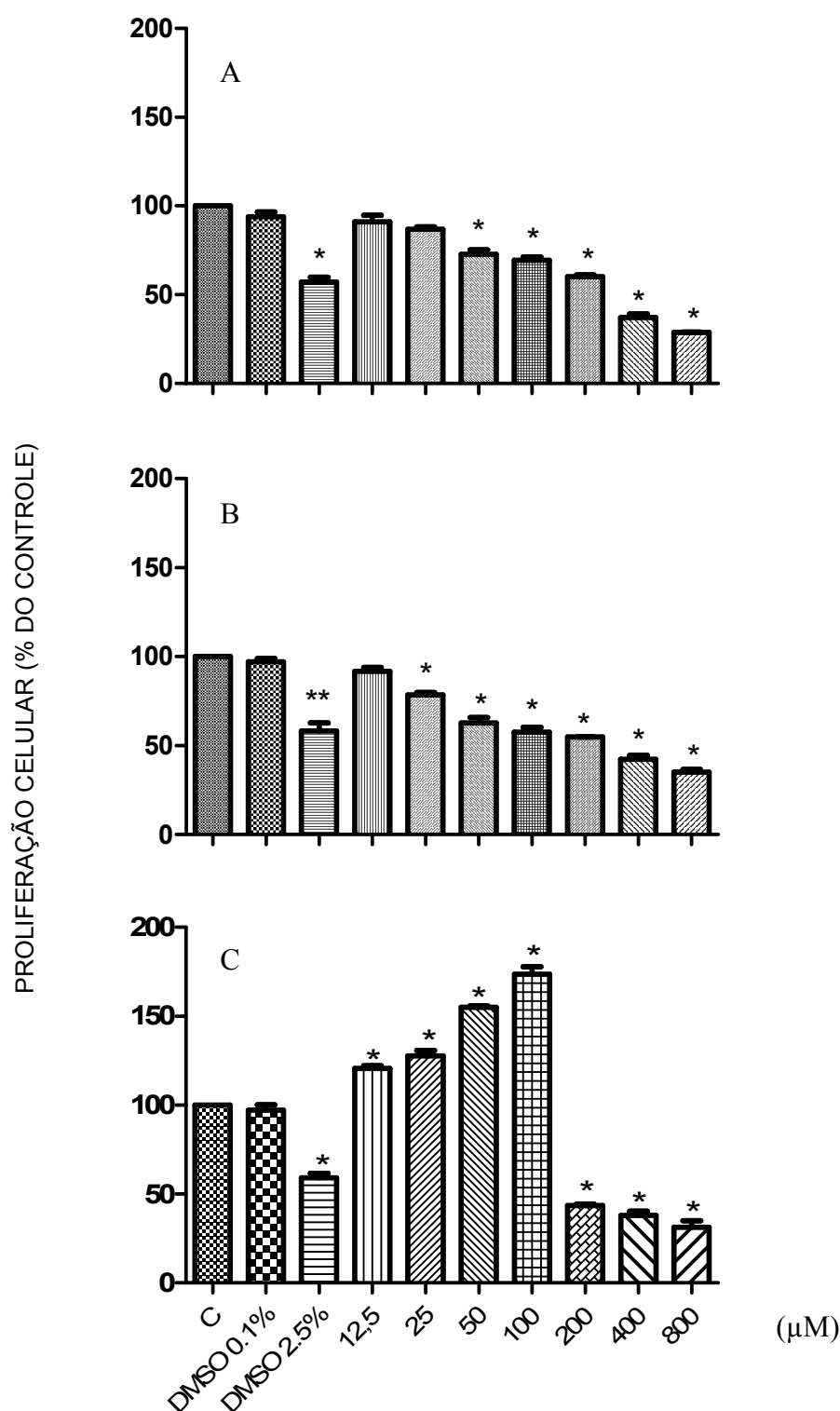


FIGURA 42- EFEITO DO *trans*-resveratrol e DERIVADOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS B16F10. CÉLULAS B16F10 FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE *trans*-resveratrol (A), *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo (B) E *trans*-dehidrodímero do resveratrol (C) POR 24 h, A 37° C, EM ATMOSFERA ÚMIDA E SOB TENSÃO DE CO<sub>2</sub>. EM SEGUIDA, FORAM SUBMETIDAS AO ENSAIO DO MTT, COMO DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS. CADA BARRA REPRESENTA A PORCENTAGEM MÉDIA±DP DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ATIVAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE (C), NORMALIZADA EM 100%. DMSO FOI O SOLVENTE USADO PARA DISSOLVER AS SUBSTÂNCIAS. A 2,5%, FOI USADO COMO CONTROLE DE MORTE CELULAR; E A 0,1% CORRESPONDE A SUA QUANTIDADE MÁXIMA NOS ENSAIOS. [\*] p<0.05, [\*\*] p<0.0001 (n=4).

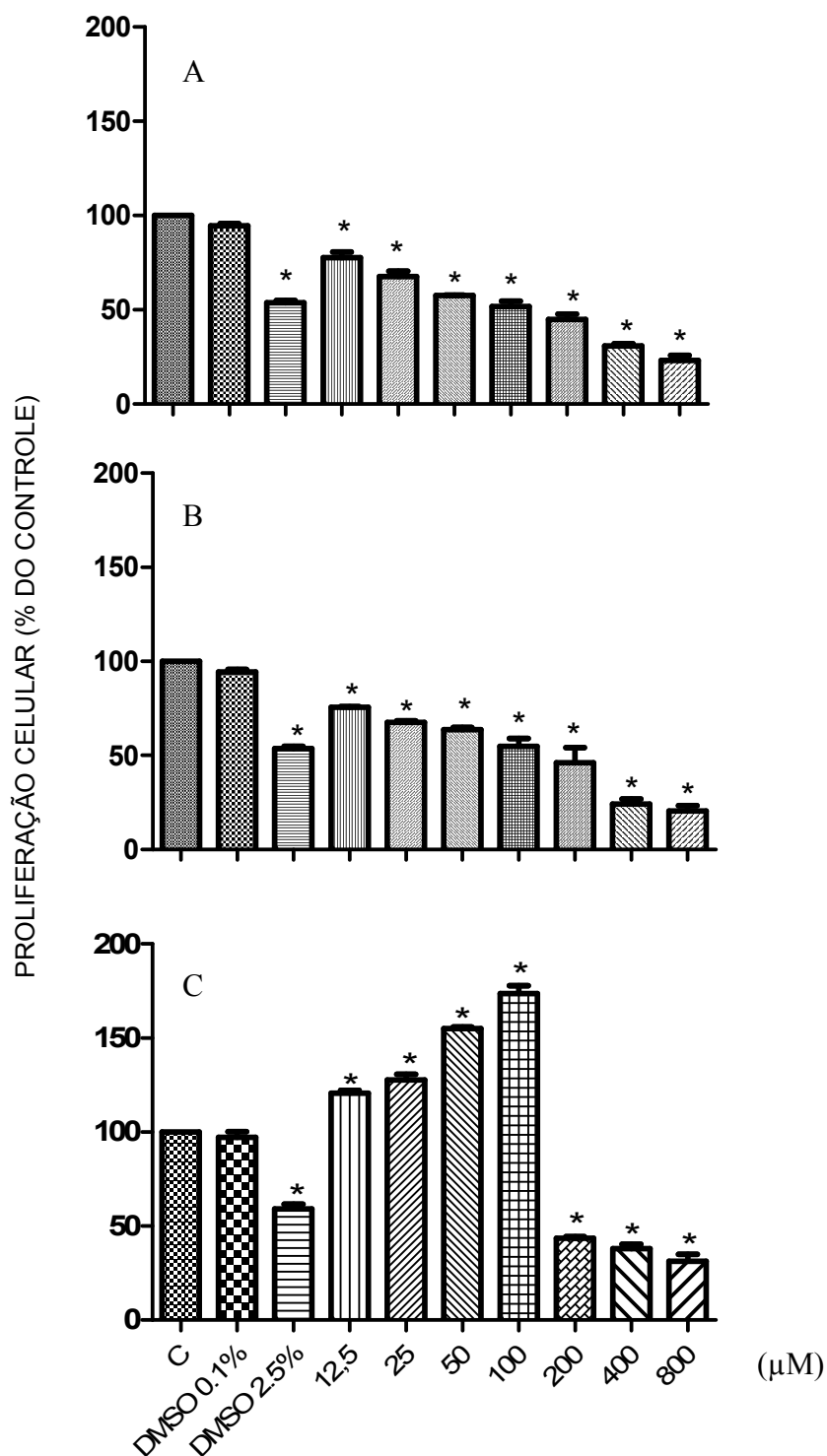


FIGURA 43- EFEITO DO *trans*-resveratrol SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS HeLa. CÉLULAS HeLa FORAM TRATADAS COM AS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE *trans*-resveratrol (A), *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O-β-glucosídeo (B) E *trans*-dehidrodímero do resveratrol (C) POR 24 h, A 37° C, EM ATMOSFERA ÚMIDA E SOB TENSÃO DE CO<sub>2</sub>. EM SEGUIDA, FORAM SUBMETIDAS AO ENSAIO DO MTT, COMO DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS. CADA BARRA REPRESENTA A PORCENTAGEM MÉDIA±DP DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ATIVAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE (C), NORMALIZADA EM 100%. DMSO FOI O SOLVENTE USADO PARA DISSOLVER AS SUBSTÂNCIAS. A 2,5%, FOI USADO COMO CONTROLE DE MORTE CELULAR; E A 0,1% CORRESPONDE A SUA QUANTIDADE MÁXIMA NOS ENSAIOS. [\*] p<0.05, [\*\*] p<0.0001 (n=4).

Importante ressaltar que, embora o perfil de ação do *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo tenha sido semelhante ao obtido para o *trans*-resveratrol neste ensaio preliminar, este efeito foi significativamente superior<sup>1</sup>, especialmente para linhagem McCoy, mostrando que a modificação química obtida pela biotransformação potencializou o efeito da substância original. Esses resultados abrem muitas perspectivas relacionadas à quimioprevenção e quando se deseja introduzir substâncias antioxidantes em preparações farmacêuticas, pois como já relatado anteriormente, o resveratrol vem sendo particularmente empregado em formulações dermatológicas com finalidades protetoras contra radiações UV, evitando danos à pele e resguardando-a do envelhecimento precoce, assim como protegendo o organismo contra a possibilidade de desenvolver câncer (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998; STEWART *et al.*, 1999; BRAKENHIELM; CAO; CAO, 2001; AGGARWAL *et al.*, 2004), capturando ROS e participando de mecanismos que evitem a peroxidação lipídica (WENZEL *et al.*, 2005; SENGOTTUVELAN; VISWANATHAN; NALINI, 2006).

Necessário e imprescindível se faz, entretanto, estudar com maior profundidade o potencial biológico desta substância, incluindo observações sobre sua biodisponibilidade *in vivo*. Tendo sua eficácia comprovada, poderia se tornar um aditivo em inúmeras formulações medicinais, a fim de prevenir ou amenizar certas patologias, agindo, por exemplo, na prevenção do envelhecimento cutâneo e das conseqüências causadas pela radiação UV a curto e longo prazo, como o câncer de pele; auxiliando os sistemas endógenos de proteção da epiderme, além de contribuir para prevenção de doenças crônicas em longo prazo.

Em contraste com o perfil de inibição demonstrado para o derivado *trans*-resveratrol-4'-O-metil-5-O-acetil-3-O- $\beta$ -glucosídeo, aumento significativo na proliferação celular de todas as linhagens celulares estudadas (Figuras 41-C, 42-C E 43-C) foi o efeito observado para o derivado *trans*-dehidrodímero do resveratrol até a dose de 100  $\mu$ M, cujos valores encontrados estão resumidos na Tabela 11. Já nas doses de 200 a 800  $\mu$ M, queda significativa foi observada,

---

<sup>1</sup> Os valores foram significativos  $p < 0,05$  ( $p < 0,0071$ ,  $p < 0,0068$ ,  $p < 0,0011$ ,  $p < 0,0015$ ,  $p < 0,0011$ ,  $p < 0,0005$  e  $p < 0,0022$ ) para as respectivas concentrações (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800  $\mu$ M).

provavelmente demonstrando efeito tóxico, o qual deverá ser confirmado com ensaios apropriados, como o do Azul de Trypan, por exemplo.

TABELA 11- EFEITO DO *trans*-dehidrodímero do resveratrol SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS McCOY, B16F10 E Hela AVALIADAS PELO ENSAIO DO MTT.

Dose ( $\mu$ M)	LINHAGEM CELULAR (% de inibição)		
	McCOY	B16F10	HELA
12,5	110,96 $\pm$ 4,04	120,61 $\pm$ 2,42	96,03 $\pm$ 5,70
25	127,85 $\pm$ 4,58	127,68 $\pm$ 5,39	103,62 $\pm$ 2,24
50	137,65 $\pm$ 8,52	155,09 $\pm$ 1,56	106,28 $\pm$ 1,40
100	156,45 $\pm$ 3,54	173,57 $\pm$ 7,57	119,02 $\pm$ 9,97
200	66,91 $\pm$ 4,82	43,50 $\pm$ 1,34	47,63 $\pm$ 3,55
400	27,93 $\pm$ 0,85	37,98 $\pm$ 4,07	25,26 $\pm$ 4,31
800	21,93 $\pm$ 1,39	31,18 $\pm$ 6,54	21,82 $\pm$ 5,97

Células McCoy, B16f10 e Hela foram tratadas com as concentrações indicadas de *trans*-dehidrodímero do resveratrol por 24 h, a 37° C, em atmosfera úmida e sob tensão de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram submetidas ao ensaio do MTT. Cada valor representa a porcentagem média $\pm$ DP de células metabolicamente ativas em relação ao controle, normalizado em 100%. [\*] p<0.05, [\*\*] p<0.0001 (n=4).

## 5 CONCLUSÃO

O processo de biotransformação com microrganismos é uma alternativa aos meios sintéticos convencionais para a produção de derivados com estrutura química diferenciada do substrato de origem, pois podem promover alterações em posições muitas vezes inacessíveis aos reagentes químicos tradicionais.

O *trans*-resveratrol, devido a sua estrutura química e propriedades farmacológicas, tornou-se instrumento desse estudo, com o objetivo de promover, através de um sistema biocatalisado por fungos, os quais possuem sistema enzimático diferenciado, modificações estruturais, visando maior ação biológica.

Para a biotransformação do substrato, uma triagem inicial foi realizada com dezenove fungos e, desses, somente os fungos *B. sorokiniana* e *Penicillium* sp (64) foram capazes de produzir dois derivados: o *trans*-dehidrodímero do resveratrol e o *trans*-resveratrol-4'-*O*-metil-5-*O*-acetil-3-*O*- $\beta$ -glucosídeo, sendo esse último um composto inédito.

Ambos se mostraram dotados de ação biológica, aqui exemplificada pela capacidade de intervir na proliferação de, pelo menos, três linhagens celulares. Relevante é o fato de que as modificações químicas ocorridas levaram a efeitos opostos, ou seja, enquanto o derivado *trans*-resveratrol-4'-*O*-metil-5-*O*-acetil-3-*O*- $\beta$ -glucosídeo promoveu inibição, de forma dependente da dose e com perfil semelhante à molécula precursora, da proliferação celular, seu *trans*-dehidrodímero levou à promoção significativa deste efeito.



## 6 REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.;DEMAIN, A. L. In: ADRIO, J. L.;DEMAIN, A. L. **Methods in biotechnology: Microbial enzymes and biotransformations**. Totowa: NJ. Humana Press Inc, 2005. p. cap. 1.

AFAQ, F.;ADHAMI, V. M.;AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 186, n. 1, p. 28-37, 2003.

AGGARWAL, B. B.;BHARDWAJ, A.;AGGARWAL, R. S.;SEERAM, N. P.;SHISHODIA, S.;TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**. v. 24, n. 5A, p. 2783-2840, 2004.

AKTAS, N.;CICEK, H.;UNAL, A. T.;KIBARER, G.;KOLANKAYA, N.;TANYOLAC, A. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. **Bioresource Technology**. v. 80, n. 1, p. 29-36, 2001.

ANDRUS, M. B.;LIU, J. Synthesis of polyhydroxylated ester analogs of the stilbene resveratrol using decarbonylative Heck couplings. **Tetrahedron Letters**. v. 47, n. 32, p. 5811-5814, 2006.

ARAKAWA, N. S. **Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de Vigueira robusta**. Description, City, 2007.

BARREIRO, E. J.;FRAGA, C., A. M. **Química Medicinal: As bases Moleculares da Ação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARTON, D.;OLLIS, W. D. **Advances in Medicinal Phytochemistry**. London: John Libbey, 1986.

BELGUENDOZ, L.;FREMONT, L.;GOZZELINO, M. T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**. v. 55, n. 6, p. 811-816, 1998.

BELLERI, M.;RIBATTI, D.;SAVIO, M.;STIVALA, L. A.;FORTI, L.;TANGHETTI, E.;ALESSI, P.;COLTRINI, D.;BUGATTI, A.;MITOLA, S.;NICOLI, S.;VANNINI, V.;PRESTA, M.  $\alpha$  v  $\beta$  3 Integrin-dependent antiangiogenic activity of resveratrol stereoisomers. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 7, n. 12, p. 3761-3770, 2008.

BELTER, P. A.;CUSSLER, E. L.;HU, W. S. Bioseparations - Downstream Processing for Biotechnology. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**. v. 202, n. p. 224-BIOT, 1991.

BLOND, J. P.;DENIS, M. P.;BEZARD, J. Antioxidant Action of Resveratrol in Lipid-Peroxidation. **Sciences Des Aliments**. v. 15, n. 4, p. 347-357, 1995.

BOHM, M.;ROSENKRANZ, S.LAUFS, U. Alcohol and red wine: impact on cardiovascular risk. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 19, n. 1, p. 11-16, 2004.

BOOCOCK, D. J.;FAUST, G. E. S.;PATEL, K. R.;SCHINAS, A. M.;BROWN, V. A.;DUCHARME, M. P.;BOOTH, T. D.;CROWELL, J. A.;PERLOFF, M.;GESCHER, A. J.;STEWARD, W. P.BRENNER, D. E. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. v. 16, n. 6, p. 1246-1252, 2007.

BRADAMANTE, S.;BARENGHI, L.VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**. v. 22, n. 3, p. 169-188, 2004.

BRAKENHIELM, E.;CAO, R. H.CAO, Y. H. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. **Faseb Journal**. v. 15, n. 8, p. 1798-+, 2001.

BREUIL, A. C.;ADRIAN, M.;PIRIO, N.;MEUNIER, P.;BESSIS, R.JEANDET, P. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. **Tetrahedron Letters**. v. 39, n. 7, p. 537-540, 1998.

BROWN, R. W.HENDERSON, J. H. M. The Mass-Production and Distribution of Hela-Cells at Tuskegee-Institute, 1953-55. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**. v. 38, n. 4, p. 415-431, 1983.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**. v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CALAMINI, B.;RATIA, K.;MALKOWSKI, M. G.;CUENDET, M.;PEZZUTO, J. M.;SANTARSIERO, B. D.MESECAR, A. D. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. **Biochemical Journal**. v. 429, n. p. 273-282, 2010.

CAMONT, L.;COLLIN, F.;MARCHETTI, C.;JORE, D.;GARDES-ALBERT, M.BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric identification of the oxidation end-products of trans-resveratrol in aqueous solutions. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 24, n. 5, p. 634-642, 2010.

CAMONT, L.;COTTART, C. H.;RHAYEM, Y.;NIVET-ANTOINE, V.;DJELIDI, R.;COLLIN, F.;BEAUDEUX, J. L.BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. **Analytica Chimica Acta**. v. 634, n. 1, p. 121-128, 2009.

CHANVITAYAPONGS, S.;DRACZYNSKALUSIAK, B.SUN, A. Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. **Neuroreport**. v. 8, n. 6, p. 1499-1502, 1997.

CHEN, X.;HE, H.;WANG, G.;YANG, B.;REN, W.;MA, L.YU, Q. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. **Biomed Chromatogr.** v. 21, n. 3, p. 257-265, 2007.

CHOI, J.;BAE, S. J.;HA, Y. M.;NO, J. K.;LEE, E. K.;LEE, J. S.;SONG, S.;LEE, H.;SUH, H.;YU, B. P.CHUNG, H. Y. A newly synthesized, potent tyrosinase inhibitor: 5-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,2,3-benzenetriol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 20, n. 16, p. 4882-4884, 2010.

CICHEWICZ, R. H.KOUZI, S. A. Biotransformation of resveratrol to piceid by *Bacillus cereus*. **Journal of Natural Products.** v. 61, n. 10, p. 1313-1314, 1998.

CICHEWICZ, R. H.;KOUZI, S. A.HAMANN, M. T. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products.** v. 63, n. 1, p. 29-33, 2000.

CONTI, R.;RODRIGUES, J. A. R.MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova.** v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.

COTTART, C. H.;NIVET-ANTOINE, V.;LAGUILLIER-MORIZOT, C.BEAUDEUX, J. L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research.** v. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.

CRQUI, M. H.RINGEL, B. L. Does Diet or Alcohol Explain the French Paradox. **Lancet.** v. 344, n. 8939-4, p. 1719-1723, 1994.

CROZIER, A.;JAGANATH, I. B.CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports.** v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

DAVIES, N. M.JAMALI, F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** v. 7, n. 3, p. 332-336, 2004.

DELMAS, D.;AIRES, V.;LIMAGNE, E.;DUTARTRE, P.;MAZUE, F.;GHIRINGHELLI, F.LATRUFFE, N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1215, n. 1, p. 48-59, 2011.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.

DOCHERTY, J. J.;FU, M. M.;HAH, J. M.;SWEET, T. J.;FAITH, S. A.BOOTH, T. Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. **Antiviral Research.** v. 67, n. 3, p. 155-162, 2005.

DOCHERTY, J. J.;SMITH, J. S.;FU, M. M.;STONER, T.BOOTH, T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. **Antiviral Research.** v. 61, n. 1, p. 19-26, 2004.

DRAGANOVA-FILIPOVA, M. N.;GEORGIEVA, M. G.;PEYCHEVA, E. N.;MILOSHEV, G. A.;SARAFIAN, V. S.PEYCHEV, L. P. Effects of propolis and CAPE on proliferation and apoptosis of McCoy-Plovdiv cell line. **Folia Med (Plovdiv)**. v. 50, n. 1, p. 53-59, 2008.

FABBRINI, M.;GALLI, C.;GENTILI, P.MACCHITELLA, D. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. **Tetrahedron Letters**. v. 42, n. 43, p. 7551-7553, 2001.

FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

FAIS, A.;CORDA, M.;ERA, B.;FADDA, M. B.;MATOS, M. J.;QUEZADA, E.;SANTANA, L.;PICCIAU, C.;PODDA, G.DELOGU, G. Tyrosinase inhibitor activity of coumarin-resveratrol hybrids. **Molecules**. v. 14, n. 7, p. 2514-2520, 2009.

FARNET, C. M.ZAZOPOULOS, E. In: FARNET, C. M.ZAZOPOULOS, E. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Totowa: Huma Press, 2005. p. 95-106.

FENG, Y. H.;ZHOU, W. L.;WU, Q. L.;LI, X. Y.;ZHAO, W. M.ZOU, J. P. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 23, n. 10, p. 893-897, 2002.

FERNANDES, T. M. **Plantas Mediciniais: memória da ciência no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2004.

FONTE, N. N. **A complexidade das Plantas Mediciniais : Enfoque Farmacêutico**. In: Correia Jr, C.; Graça, L. R.; Sceffer, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentos no Estado do Paraná - Diagnóstico e Perspectivas**. 1. ed. Curitiba: Emater, 2004.

FRANKEL, E. N.;WATERHOUSE, A. L.KINSELLA, J. E. Inhibition of Human Ldl Oxidation by Resveratrol. **Lancet**. v. 341, n. 8852, p. 1103-1104, 1993.

FULGENZI, A.;BERTELLI, A. A. E.;MAGNI, E.;FERRERO, E.FERRERO, M. E. In vivo Inhibition of TNF alpha-induced vascular permeability by resveratrol. **Transplantation Proceedings**. v. 33, n. 3, p. 2341-2343, 2001.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**. v. 11, n. 3-4, p. 133-142, 2006.

GEHM, B. D.;MCANDREWS, J. M.;CHIEN, P. Y.JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 25, p. 14138-14143, 1997.

GENTILLI, M.;MAZOIT, J. X.;BOUAZIZ, H.;FLETCHER, D.;CASPER, R. F.;BENHAMOU, D.SAVOURET, J. F. Resveratrol decreases hyperalgesia

induced by carrageenan in the rat hind paw. **Life Sciences**. v. 68, n. 11, p. 1317-1321, 2001.

GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: A conundrum. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. v. 12, n. 10, p. 953-957, 2003.

GIOVANNINI, L.; MIGLIORI, M.; LONGONI, B. M.; DAS, D. K.; BERTELLI, A. A. E.; PANICHI, S. V.; FILIPPI, C.; BERTELLI, A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 37, n. 3, p. 262-270, 2001.

GLAZER, A. N.; NIKALDO, H. **Microbial technology: fundamentals of applied microbiology**. 2. New York: W. H. Freeman & Co, 1995.

GOLDBERG, D. A.; YAN, J.; SOLEAS, G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**. v. 36, n. 1, p. 79-87, 2003.

GORDON, F. B.; QUAN, A. L. Isolation of the Trachoma Agent in Cell Culture. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 118, n. p. 354-359, 1965.

GRONBAEK, M.; DEIS, A.; SORENSEN, T. I. A.; BECKER, U.; SCHNOHR, P.; JENSEN, G. Mortality Associated with Moderate Intakes of Wine, Beer, or Spirits. **British Medical Journal**. v. 310, n. 6988, p. 1165-1169, 1995.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, n. p. 1-93, 2006.

HANSON, J. R. The microbiological transformations of diterpenoids. **Natural Product Reports**. v. 9, n. p. 139, 1992.

HOLVOET, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. **Acta Cardiologica**. v. 59, n. 5, p. 479-484, 2004.

HORVATH, Z.; MARIHART-FAZEKAS, S.; SAIKO, P.; GRUSCH, M.; OZSUY, M.; HARIK, M.; HANDLER, N.; ERKER, T.; JAEGER, W.; FRITZER-SZEKERES, M.; DJAVAN, B.; SZEKERES, T. Novel resveratrol derivatives induce apoptosis and cause cell cycle arrest in prostate cancer cell lines. **Anticancer Research**. v. 27, n. 5A, p. 3459-3464, 2007.

HOSHINO, J.; PARK, E. J.; KONDRATYUK, T. P.; MARLER, L.; PEZZUTO, J. M.; VAN BREEMEN, R. B.; MO, S. Y.; LI, Y. C.; CUSHMAN, M. Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, n. 13, p. 5033-5043, 2010.

HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W.; LAVU, S.; WOOD, J. G.; ZIPKIN, R. E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L.

L.;SCHERER, B.SINCLAIR, D. A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**. v. 425, n. 6954, p. 191-196, 2003.

HUSKEN, A.;BAUMERT, A.;MILKOWSKI, C.;BECKER, H. C.;STRACK, D.MOLLERS, C. Resveratrol glucoside (Piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, n. 8, p. 1553-1562, 2005.

JANG, M.;CAI, L.;UDEANI, G. O.;SLOWING, K. V.;THOMAS, C. F.;BEECHER, C. W.;FONG, H. H.;FARNSWORTH, N. R.;KINGHORN, A. D.;MEHTA, R. G.;MOON, R. C.PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

JANNIN, B.;MENZEL, M.;BERLOT, J. P.;DELMAS, D.;LANCON, A.LATRUFFE, N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**. v. 68, n. 6, p. 1113-1118, 2004.

JAYATILAKE, G. S.;BAKER, B. J.MCCLINTOCK, J. B. Isolation and identification of a stilbene derivative from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa*. **Journal of Natural Products**. v. 58, n. 12, p. 1958-1960, 1995.

JAYATILAKE, G. S.;JAYASURIYA, H.;LEE, E. S.;KOONCHANOK, N. M.;GEAHLEN, R. L.;ASHENDEL, C. L.;MCLAUGHLIN, J. L.CHANG, C. J. Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. **J Nat Prod**. v. 56, n. 10, p. 1805-1810, 1993.

KALDAS, M. I.;WALLE, U. K.WALLE, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 55, n. 3, p. 307-312, 2003.

KHAN, M. A.;MUZAMMIL, S.MUSARRAT, J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 30, n. 5, p. 243-249, 2002.

KHANDUJA, K. L.;BHARDWAJ, A.KAUSHIK, G. Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v. 50, n. 1, p. 61-65, 2004.

KIMMEY, M. B. Cardioprotective effects and gastrointestinal risks of aspirin: Maintaining the delicate balance. **American Journal of Medicine**. v. 117, n. p. 72S-78S, 2004.

KIMURA, Y.;OKUDA, H.KUBO, M. Effects of Stilbenes Isolated from Medicinal-Plants on Arachidonate Metabolism and Degranulation in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, n. 2, p. 131-139, 1995.

KONGSAEREE, P.;PRABPAI, S.;SRIUBOLMAS, N.;VONGVEIN, C.;WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

KORHAMMER, S.;RENIERO, F.;MATTIVI, F. An Oligostilbene from *Vitis* Roots. **Phytochemistry**. v. 38, n. 6, p. 1501-1504, 1995.

KOROLKIEWICZ, R. P.;SEIN-ANAND, J.;RUCZYNSKI, J.;REKOWSKI, P.;BIENIASZEWSKI, L.;CHODOROWSKI, Z.;PETRUSEWICZ, J.;UJDA, M.;DABKOWSKI, J.;BITEL, M.;KATO, S.;TAKEUCHI, K. The role and interactions of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and prostanooids in the pathogenesis of postoperative ileus in rats. **Journal of Gastrointestinal Surgery**. v. 8, n. 3, p. 346-357, 2004.

KOROLKIEWICZ, R. P.;UJDA, M.;DABKOWSKI, J.;RUCZYNSKI, J.;REKOWSKI, P.;PETRUSEWICZ, J. Differential salutary effects of nonselective and selective COX-2 inhibitors in postoperative ileus in rats. **Journal of Surgical Research**. v. 109, n. 2, p. 161-169, 2003.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**. v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LANCON, A.;HANET, N.;JANNIN, B.;DELMAS, D.;HEYDEL, J. M.;LIZARD, G.;CHAGNON, M. C.;ARTUR, Y.;LATRUFFE, N. Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: Metabolism and inducibility of detoxifying enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 35, n. 5, p. 699-703, 2007.

LANGCAKE, P.;PRYCE, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines. **Experientia**. v. 33, n. 2, p. 151-152, 1977.

LEE, H. S.;LEE, B. W.;KIM, M. R.;JUN, J. G. Syntheses of Resveratrol and its Hydroxylated Derivatives as Radical Scavenger and Tyrosinase Inhibitor. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. v. 31, n. 4, p. 971-975, 2010.

LIN, H. Y.;LANSING, L.;MERILLON, J. M.;DAVIS, F. B.;TANG, H. Y.;SHIH, A.;VITRAC, X.;KRISA, S.;KEATING, T.;CAO, H. J.;BERGH, J.;QUACKENBUSH, S.;DAVIS, P. J. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a receptor site for resveratrol. **Faseb J**. v. 20, n. 10, p. 1742-1744, 2006.

LIN, H. Y.;TANG, H. Y.;KEATING, T.;WU, Y. H.;SHIH, A.;HAMMOND, D.;SUN, M.;HERCBERGS, A.;DAVIS, F. B.;DAVIS, P. J. Resveratrol is pro-apoptotic and thyroid hormone is anti-apoptotic in glioma cells: both actions are integrin and ERK mediated. **Carcinogenesis**. v. 29, n. 1, p. 62-69, 2008.

LIU, W. H.;CHANG, L. S. Piceatannol induces Fas and FasL up-regulation in human leukemia U937 cells via  $Ca^{2+}$ /p38  $\alpha$  MAPK-mediated activation of c-Jun and ATF-2 pathways. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 42, n. 9, p. 1498-1506, 2010.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**. v. 74, n. 1, p. 49-62, 2000.

LU, R. Q.;SERRERO, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 179, n. 3, p. 297-304, 1999.

LUGARINI, F.;HRUPKA, B. J.;SCHWARTZ, G. J.;PLATA-SALAMAN, C. R.LANGHANS, W. A role for cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 283, n. 4, p. R862-R868, 2002.

MADIGAN, M., T.;MARTINKO, J. M.PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9. New Jersey: Prentice hall, 2000.

MANNILA, E.;TALVITIE, A.KOLEHMAINEN, E. Antileukemic Compounds Derived from Stilbenes in Picea-Abies Bark. **Phytochemistry**. v. 33, n. 4, p. 813-816, 1993.

MARIER, J. F.;VACHON, P.;GRITSAS, A.;ZHANG, J.;MOREAU, J. P.DUCHARME, M. P. 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**. v. 302, n. 1, p. 369-373, 2002.

MARTIN, A. R.;VILLEGAS, I.;LA CASA, C.DE LA LASTRA, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**. v. 67, n. 7, p. 1399-1410, 2004.

MAYER, A. M. Polyphenol Oxidases in Plants - Recent Progress .2. **Phytochemistry**. v. 26, n. 1, p. 11-20, 1987.

MAYER, A. M.HAREL, E. Polyphenol Oxidases in Plants. **Phytochemistry**. v. 18, n. 2, p. 193-215, 1979.

MAYER, A. M.STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MCCLINTOCK, S. D.;TILL, G. O.WARD, P. A. Protection from half-mustard gas-induced acute lung injury in the rat. **Faseb Journal**. v. 15, n. 4, p. A245-a245, 2001.

MERILLON, J. M.;FAUCONNEAU, B.;TEGUO, P. W.;BARRIER, L.;VERCAUTEREN, J.HUGUET, F. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. **Clinical Chemistry**. v. 43, n. 6, p. 1092-1093, 1997.



MIZUTANI, K.;IKEDA, K.YAMORI, Y. Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 274, n. 1, p. 61-67, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, K.;VENKATESH, M.;VENKATESH, P.;SAHA, B. P.MUKHERJEE, P. K. Effect of soy phosphatidyl choline on the bioavailability and nutritional health benefits of resveratrol. **Food Research International**. v. 44, n. 4, p. 1088-1093, 2011.

NAKAMURA, K.;YOSHIKAWA, N.;YAMAGUCHI, Y.;KAGOTA, S.;SHINOZUKA, K.KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci**. v. 70, n. 7, p. 791-798, 2002.

NAKASHIMA, T.;MAYUZUMI, S.;INABA, S.;PARK, J. Y.;ANZAI, K.;SUZUKI, R.;KUWAHARA, N.;UTSUMI, N.;YOKOYAMA, F.;SATO, H.;OKANE, I.;TSURUMI, Y.ANDO, K. Production of bioactive compounds based on phylogeny in the genus *Penicillium* preserved at NBRC. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 72, n. 11, p. 3051-3054, 2008.

NAVARRA, C.;GOODWIN, C.;BURTON, S.;DANIELI, B.RIVA, S. Laccase-mediated oxidation of phenolic derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 65, n. 1-4, p. 52-57, 2010.

NEWMAN, D. J.;CRAGG, G. M.SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**. v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.;CRAGG, G. M.SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, D. T.;NGUYEN, D. H.;LYUN, H. L.;LEE, H. B.;SHIN, J. H.KIM, E. K. Inhibition of melanogenesis by dioctyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. **J Microbiol Biotechnol**. v. 17, n. 10, p. 1585-1590, 2007.

NICOTRA, S.;CRAMAROSSA, M. R.;MUCCI, A.;PAGNONI, U. M.;RIVA, S.FORTI, L. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. **Tetrahedron**. v. 60, n. 3, p. 595-600, 2004.

NODARI, R. O.GUERRA, M. P. In: NODARI, R. O.GUERRA, M. P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2000. p. 11-25.

NONOMURA, S.;KANAGAWA, H.MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants . I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.). **Yakugaku Zasshi**. v. 83, n. p. 988-990, 1963.

OHGUCHI, K.;TANAKA, T.;KIDO, T.;BABA, K.;IINUMA, M.;MATSUMOTO, K.;AKAO, Y.NOZAWA, Y. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 307, n. 4, p. 861-863, 2003.

ORSINI, F.;PELIZZONI, F.;BELLINI, B.MIGLIERINI, G. Synthesis of biologically active polyphenolic glycosides (combretastatin and resveratrol series). **Carbohydrate Research**. v. 301, n. 3-4, p. 95-109, 1997.

PASCHOLATI, S. F.LEITE, B. In: PASCHOLATI, S. F.LEITE, B. **Manual de Fitopatologia : Princípios e Conceitos**. Agronômica Ceres, 1995. p. 415-453.

PAVIA, L. D.;LAMPMAN, M. G.;KRIZ, S. G.VYVYAN, R. J. **introdução à espectroscopia**. 4<sup>a</sup>. são paulo: cengage learning, 2010.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Adv Appl Microbiol**. v. 44, n. p. 1-80, 1997.

PEZET, R.;PONT, V.HOANGVAN, K. Evidence for Oxidative Detoxication of Pterostilbene and Resveratrol by a Laccase-Like Stilbene Oxidase Produced by *Botrytis-Cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 39, n. 6, p. 441-450, 1991.

PINTO, M. C.;GARCIA-BARRADO, J. A.MACIAS, P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 12, p. 4842-4846, 1999.

RATNA, W. N.; SIMONELLI, J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. v. 70, n. 13, p. 1577-1589, 2002.

REIS, E. M. Sementes de trigu infectadas por *Helminthosporium sativum*: Fonte de inóculo para a podridão comum de raízes e seu controle pelo tratamento com fungicidas. **Summa Phytopatologica**. v. 8, p. 29-38, (1982)

RENAUD, S.DELORGERIL, M. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart-Disease. **Lancet**. v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

RENAUD, S.RUF, J. C. The French Paradox - Vegetables or Wine. **Circulation**. v. 90, n. 6, p. 3118-3118, 1994.

ROBERTS, S. M.;TURNER, N., J.;WILLETS, A., JTURNER, M., K. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms**. New York: Cambridge University Pres, 1995.

RUMJANEK, V. M.;TRINDADE, G. S.;WAGNER-SOUZA, K.;MELETTI-DE-OLIVEIRA, M. C.;MARQUES-SANTOS, L. F.;MAIA, R. C.CAPELLA, M. A. M. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**. v. 73, n. 1, p. 57-69, 2001.

SAIKO, P.;SZAKMARY, A.;JAEGER, W.SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutat Res**. v. 658, n. 1-2, p. 68-94, 2008.

SEIDMAN, M.;BABU, S.;TANG, W. X.;NAEM, E. QUIRK, W. S. Effects of resveratrol on acoustic trauma. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. v. 129, n. 5, p. 463-470, 2003.

SEIGNEUR, M.;BONNET, J.;DORIAN, B.;BENCHIMOL, D.;DROUILLET, F.;GOUVERNEUR, G.;LARRUE, J.;CROCKETT, R.;BOISSEAU, M. R.;RIBEREAUGAYON, P.BRICAUD, H. Effect of the Consumption of Alcohol, White Wine, and Red Wine on Platelet-Function and Serum-Lipids. **Journal of Applied Cardiology**. v. 5, n. 3, p. 215-222, 1990.

SENGOTTUVELAN, M.;VISWANATHAN, P.NALINI, N. Chemopreventive effect of *trans*-resveratrol - a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 27, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

SHAW, N. M.;ROBINS, K. T.KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 345, n. 4, p. 425-435, 2003.

SHI, G.;RAO, L.;YU, H.;XIANG, H.;YANG, H.JI, R. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **Int J Pharm**. v. 349, n. 1-2, p. 83-93, 2008.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 43, n. 1, p. 49-52, 1992.

SINHA, K.;CHAUDHARY, G.GUPTA, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sciences**. v. 71, n. 6, p. 655-665, 2002.

STEWART, J. R.;WARD, N. E.;IOANNIDES, C. G.O'BRIAN, C. A. Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism. **Biochemistry**. v. 38, n. 40, p. 13244-13251, 1999.

STOUDT, T. H. **The microbiological transformation of steroids in Advances Applied Microbiology**. . 1960.

STRAATHOF, A. J. J.;PANKE, S.SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

STROBEL, G.DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 491-+, 2003.

SUBBARAMAIAH, K.;CHUNG, W. J.;MICHALUART, P.;TELANG, N.;TANABE, T.;INOUE, H.;JANG, M. S.;PEZZUTO, J. M.DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 34, p. 21875-21882, 1998.

TAKAOKA, M., J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes fl.). **J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University**. v. 3, n. p. 1-16, 1940.

TEGUO, P. W.;DECENDIT, A.;VERCAUTEREN, J.;DEFFIEUX, G.MERILLON, J. M. Trans-resveratrol-3-O-beta-glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**. v. 42, n. 6, p. 1591-1593, 1996.

THAKKAR, K.;GEAHLEN, R. L.CUSHMAN, M. Synthesis and Protein-Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Polyhydroxylated Stilbene Analogs of Piceatannol. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, n. 20, p. 2950-2955, 1993.

TINLINE, R. D.;WILDERMUTH, G. B.SPURR, D. T. Inoculum Density of *Cochliobolus-Sativus* in Soil and Common Root-Rot of Wheat Cultivars in Queensland. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 39, n. 4, p. 569-577, 1988.

TRABULSI, L. R.;ALTERTHUM, F.;GOMPERTZ, O. F.CANDEIAS, J. A. **Microbiologia**. 4. São Paulo: Ateneu, 1996.

VALENZANO, D. R.;TERZIBASI, E.;GENADE, T.;CATTANEO, A.;DOMENICI, L.CELLERINO, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. **Current Biology**. v. 16, n. 3, p. 296-300, 2006.

VITRAC, X.;DESMOULIERE, A.;BROUILLAUD, B.;KRISA, S.;DEFFIEUX, G.;BARTHE, N.;ROSENBAUM, J.MERILLON, J. M. Distribution of [C-14]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Sciences**. v. 72, n. 20, p. 2219-2233, 2003.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1215, n. p. 9-15, 2011.

WALLE, T.;HSIEH, F.;DELEGGE, M. H.;OATIS, J. E.WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Q.;XU, J. F.;ROTTINGHAUS, G. E.;SIMONYI, A.;LUBAHN, D.;SUN, G. Y.SUN, A. Y. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. **Brain Research**. v. 958, n. 2, p. 439-447, 2002a.

WANG, Z. R.;HUANG, Y. Z.;ZOU, J. G.;CAO, K. J.;XU, Y. N.WU, J. M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 9, n. 1, p. 77-79, 2002b.

WENZEL, E.;SOLDO, T.;ERBERSDOBLER, H.SOMOZA, V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 49, n. 5, p. 482-494, 2005.

WIEDER, T.;PROKOP, A.;BAGCI, B.;ESSMANN, F.;BERNICKE, D.;SCHULZE-OSTHOFF, K.;DORKEN, B.;SCHMALZ, H. G.;DANIEL, P. T.HENZE, G. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. **Leukemia**. v. 15, n. 11, p. 1735-1742, 2001.

WILKENS, A.;PAULSEN, J.;WRAY, V.WINTERHALTER, P. Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of trans-resveratrol and (-)-epsilon-viniferin. **J Agric Food Chem**. v. 58, n. 11, p. 6754-6761, 2009.

WITZTUM, J. L. The Oxidation Hypothesis of Atherosclerosis. **Lancet**. v. 344, n. 8925, p. 793-795, 1994.

WOLTER, F.;CLAUSNITZER, A.;AKOGLU, B.STEIN, J. Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. **Journal of Nutrition**. v. 132, n. 2, p. 298-302, 2002.

XIN, S.;SHULAN, L.;JING, Z.;SHENGNAN, L.;JIYONG, G.P, C. E. Effects of Res on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma cell lines C33A, SiHa and Hela. **Journal of medical colleges of PLA** v. 24, n. p. 148-154, 2009.

YANG, Y. B.PIAO, Y. J. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 24, n. 7, p. 703-710, 2003.

YU, L.;SUN, Z. J.;WU, S. L.PAN, C. E. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 9, n. 10, p. 2341-2343, 2003.

YUNES, R. A.CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais:sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R.; FILHO, C. V. Breve análise histórica da Química de Plantas Mediciniais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In : YUNES, A.; CALIXTO, J. B. **Plantas**

**Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó-SC: Argos, 2001. p. 18-42.