

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico

JOÃO LUIZ ESTEVES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: João Luiz Esteves da Silva
Orientadora: Prof.a Dr.a Nieve Araçari
Jacometti Cardoso Furtado

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 13/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, João Luiz Esteves da
Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico. Ribeirão Preto, 2013.
88p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso.

1. Biotransformação. 2. Ácido Copálico. 3. *Mucor rouxii*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: João Luiz Esteves da Silva

Título do trabalho: Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Prof.a Dr.a Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovado em:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais **Sebastião** e **Margareth** e à minha irmã, **Ana Bárbara**, por terem se dedicado a me permitir sonhar e realizar os meus sonhos, acreditando na minha capacidade para fazê-lo.*

*À minha namorada **Carol**, que me apoiou nos momentos mais difíceis e me mostrou o caminho para minha felicidade que eu havia perdido.*

*À **Maria Clara** que infelizmente, se foi cedo, mas aonde quer que esteja eu sei que está me protegendo e me guiando neste árduo caminho que escolhi trilhar. Você estará sempre marcada na minha história.*

*À **Angélica**, excelente técnica que me guiou, ajudou e aconselhou, tanto nos trabalhos, como na vida, a quem devo muito.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e protegido em todos os momentos.

À Capes por ter concedido a bolsa que me possibilitou a conquista desse sonho.

À professora Niede pela acolhida e orientação precisa desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Eliane, Camila, Eduardo, Marivane, Erick, Juliana, Mariza, Tatiane, Ingrid, Federico que me ajudaram e serei eternamente grato.

Aos pós-graduandos do laboratório de Farmacognosia.

Ao Vinícius Palaretti, pela colaboração nas obtenções dos espectros de RMN.

Ao José Carlos Tomás pelo auxílio na obtenção dos espectros de massa.

Aos técnicos Valtinho e Mário pelo auxílio e amizade.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pelas orientações.

Muito Obrigado!

*Do leite do saber,
beberei,
e o derramarei,
enchendo de perfume,
um ar ignorante
que contagia um mundo tolo,
sem nexos,
sem coerência,
hipócrita.
Na certeza que
enquanto houver,
a vontade de
passar o saber,
sem ganho,
com prazer,
a chama da esperança
de um mundo melhor,
brilhará.*

RESUMO

SILVA, J. L. E. da. **Utilização de modelos microbianos para estudos de metabolismo *in vitro* do ácido copálico**. 2013, 88p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O ácido copálico é um diterpeno de esqueleto do tipo labdano descrito na literatura como um dos diterpenos majoritários e biomarcador do oleorresina das espécies do gênero *Copaifera*. Este oleorresina é muito utilizado na medicina popular e estudos feitos com oleorresinas de diferentes espécies revelaram várias atividades biológicas. Entretanto, não há informações sobre o metabolismo dos constituintes do oleorresina após absorção no organismo. Assim, neste trabalho foram realizados estudos de biotransformação do ácido copálico com micro-organismos que apresentam potencial para mimetizar reações que ocorrem em humanos e também com alguns micro-organismos presentes no trato gastrointestinal humano. O ácido copálico foi obtido de oleorresina de *Copaifera* disponível no mercado nacional. Devido à complexidade química do oleorresina, houve necessidade de utilizar vários processos cromatográficos visando o isolamento do ácido copálico. Assim, foram utilizadas cromatografia sob pressão reduzida, cromatografia em coluna clássica e cromatografia em coluna clássica utilizando sílica impregnada com nitrato de prata. Partindo-se de 352,0 g de oleorresina foram isolados 1224,5 mg de ácido copálico, o qual foi identificado pelas análises dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono treze. O diterpeno isolado foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos a serem avaliados nos processos de biotransformação, o que possibilitou estabelecer a quantidade máxima de ácido copálico a ser adicionada nas culturas dos diferentes micro-organismos sem causar interferência no desenvolvimento dos mesmos. Os fungos filamentosos *Mucor rouxii* e *Aspergillus brasiliensis*, bem como as bactérias do trato gastrointestinal *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* e *Escherichia coli* foram utilizados no processo de triagem visando selecionar o micro-organismo mais promissor para os estudos de biotransformação do ácido copálico. Também foram realizados estudos em cultura mista de *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*. O processo de biotransformação conduzido com o fungo filamentoso *Mucor rouxii* evidenciou o potencial deste para biotransformar o ácido copálico. Os extratos obtidos das culturas do fungo *Mucor rouxii* foram submetidos às análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por aerossol carregado e por arranjo de diodos, sendo detectados seis produtos de biotransformação que foram isolados por cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa. No processo de biotransformação realizado com o fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* vários produtos foram detectados, mas com baixos rendimentos. Quanto aos estudos de biotransformação realizados com as bactérias, não foram detectados sinais de diterpenos nas culturas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. isoladas e em cultura mista incubadas com ácido copálico por 24 horas. Nas culturas de *Escherichia coli* foram detectados sinais do ácido copálico, mas não de produtos de biotransformação. Seis produtos de biotransformação foram isolados da cultura desenvolvida com o fungo *Mucor rouxii*. Dois destes tiveram suas estruturas químicas elucidadas. Nos dois produtos ocorreram hidroxilações no C-3 e no C-13 e em um dos produtos ocorreu também hidroxilação no C-18. Não há descrição na literatura das estruturas químicas dos produtos elucidados.

Descritores: Biotransformação. Ácido copálico. *Mucor rouxii*.

ABSTRACT

SILVA, J. L. E. da. **The use of microbial models to study the *in vitro* metabolism of copalic acid.** 2013, 88p. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Copalic acid is a labdane type diterpene which was reported in the literature as a major constituent and biomarker of the oil resin from *Copaifera* species. This oil resin has been used in popular medicine and studies carried out with different species showed several biological activities. However, there is no information regarding the metabolism of the constituents after absorption in organism. Therefore, biotransformation studies were carried out using microorganisms that showed potential to mimic reactions that occur in human and also with microorganisms from the gastrointestinal tract. Copalic acid was obtained from *Copaifera* oil resin available in national market. Due to the chemical complexity, it was necessary to perform different chromatographic procedures in order to isolate copalic acid. Column chromatography, column chromatography under reduced pressure and column chromatography using silica gel impregnated with silver nitrate were performed. Starting from 352.0 g of oil resin, 1224.5 mg of copalic acid were isolated and the chemical structure was determined by analysis of the hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance. The isolated diterpene was submitted to antimicrobial activity evaluation against the microorganisms used in the biotransformation processes which enable to establish the maximum amount of copalic acid to be added into the cultures without causing inhibitory effects. The filamentous fungi *Mucor rouxii* and *Aspergillus brasiliensis*, as well as the bacteria *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* and *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract were screened to select the most promising microorganism for biotransformation studies. In addition, biotransformation processes were carried out using mixed cultures of *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*. The biotransformation process performed by the filamentous fungus *Mucor rouxii* showed the great potential of this fungus to biotransform copalic acid. The extracts from the cultures of the fungus *Mucor rouxii* were submitted to high performance liquid chromatography with both charged aerosol and photodiode array detection and six biotransformation products were isolated by using high performance liquid chromatography in semi-preparative mode. Several biotransformation products were detected in the biotransformation process performed by *Aspergillus brasiliensis*, but with low yield. Regarding the biotransformation processes performed by bacteria, biotransformation products were not detected in the isolated and mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. after 24 hours. Also, only the signals of copalic acid were detected in the cultures of *Escherichia coli*. Six biotransformation products were isolated from the culture of the fungus *Mucor rouxii*. The chemical structures of two products were elucidated. Hydroxyl groups were introduced at C-3 and C-13 in both compounds and another hydroxyl group was introduced at C-18 in only one compound. These structures were not reported before.

Key words: Biotransformation. Copalic Acid. *Mucor rouxii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Em destaque as regiões onde são encontradas espécies de <i>Copaifera</i>	2
Figura 2. Principais sesquiterpenos encontrados no oleorresina de espécies de <i>Copaifera</i>	4
Figura 3. Principais diterpenos encontrados no oleorresina de espécies de <i>Copaifera</i>	5
Figura 4. Unidade de isopreno	6
Figura 5. Esquema das rotas biossintéticas de formação das unidades de isopreno.....	7
Figura 6. <i>Esqueletos-base dos principais tipos de diterpenos.</i>	8
Figura 7. Estrutura química do ácido copálico.....	9
Figura 8. Biotransformação do ácido ursólico.	12
Figura 9. Biotransformação do ácido <i>ent</i> -pimara-8(14),15-dien19-oico.	13
Figura 10. Biotransformação do diterpeno 18-hidroxi-diidro-abietano e do diterpeno 1 α ,18-dihidroxi-diidro-abietano.....	14
Figura 11. Biotransformação do triterpeno 20(S)-protopanaxadiol.....	15
Figura 12. Biotransformação da fraxinelona.....	17
Figura 13. Biotransformação do diterpeno ácido diidro-abiético.....	18
Figura 14. Biotransformação do sesquiterpeno $\Delta^{9,15}$ -africaneno.	19
Figura 15. Biotransformação da substância cinobufotalina.	20
Figura 16. Biotransformação da sulfasalazina. Em vermelho está a substância que causa os efeitos colaterais.	22
Figura 17. Fluxograma do isolamento do ácido copálico do oleorresina de <i>Copaifera</i> sp.....	30
Figura 18. Fluxograma da biotransformação e isolamento dos produtos de biotransformação do ácido copálico.	37

Figura 19. Cromatogramas de oleorresinas de espécies identificadas e de oleorresina comercial, obtidos com detector CAD. O cromatograma A refere-se ao oleorresina coletado da espécie *Copaifera reticulada Duckei*, o cromatograma B refere-se ao oleorresina extraído da espécie *Copaifera langsdorffii*, o cromatograma C refere-se a amostra de oleorresina comercial (lote 0790111). 40

Figura 20. Cromatogramas de oleorresinas de espécies identificadas e de oleorresina comercial utilizado na extração do ácido copálico, obtidos com detector DAD. O cromatograma A refere-se ao oleorresina coletado da espécie *Copaifera reticulada Duckei*, o cromatograma B refere-se ao oleorresina extraído da espécie *Copaifera langsdorffii*, o cromatograma C refere-se à amostra do oleorresina comercial (lote 0790111). 41

Figura 21. Cromatogramas da fração n-hexano:acetato de etila 8:2 obtidos com detectores diferentes CAD (A) e DAD (B). 42

Figura 22. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas do oleorresina após a primeira cromatografia por coluna sob pressão reduzida. 1: fração rica em ácido copálico; 2: fração hexano:acetato de etila 1:1; 3: fração hexano:acetato de etila 9:1; 4: fração hexano: acetato de etila 8:2; 5: fração hexano:acetato de etila 7:3; 6: fração acetato de etila. 43

Figura 23. Cromatogramas das frações 2 e 3 respectivamente, obtidos por CLAE-CAD. 44

Figura 24. Cromatograma da fração 4 obtida da coluna clássica. 44

Figura 25. Cromatograma da fração 3 obtida da coluna de sílica impregnada de nitrato de prata. 45

Figura 26. Espectro de massa da fração obtida na coluna de sílica impregnada de nitrato de prata. 45

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do ácido copálico (CDCl_3 , 500 MHz). 46

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido copálico (CDCl_3 , 125 MHz). 47

Figura 29. Comparação dos cromatogramas do controle do micélio do dia 6(A) com o cromatograma do micélio da biotransformação do dia 6(B). 49

Figura 30. Comparação dos cromatogramas do controle do dia 7(A) e da biotransformação do dia 7(B). 50

Figura 31. Cromatograma do controle em 24 horas (A) e cromatograma da biotransformação em 24 horas (B). 51

- Figura 32. Espectro de RMN ^1H do extrato obtido da cultura do fungo *Mucor rouxii* desenvolvida com ácido copálico por 120 horas (CDCl_3 , 500 MHz). 52
- Figura 33. Cromatograma do controle no dia 5 (A) e cromatograma da biotransformação no dia 5 (B) com os produtos de biotransformação destacados. ... 53
- Figura 34. Espectros no UV dos produtos de biotransformação Bp1(A), Bp3(B), Bp5(C), Bp6(D) e do ácido copálico (E). 53
- Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do extrato obtido da cultura de *E. coli* desenvolvida com ácido copálico em anaerobiose por 24 horas (CDCl_3 500 MHz). . 55
- Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do extrato obtido da cultura de *E. coli* desenvolvida com ácido copálico em aerobiose por 24 horas (CDCl_3 , 500 MHz). 56
- Figura 37. Cromatograma do extrato contendo os produtos de biotransformação do ácido copálico, destacando os principais produtos de biotransformação. 57
- Figura 38. Estrutura química do produto de biotransformação Bp1. 58
- Figura 39. Espectro de massas do produto de biotransformação Bp1. 61
- Figura 40: Estrutura química do produto de biotransformação Bp5. 62
- Figura 41. Espectro de massas do produto de biotransformação Bp5. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos que são biotransformados pelas bactérias do sistema digestório.....	23
Tabela 2. Cromatografia em coluna sob pressão reduzida do oleorresina.	28
Tabela 3. Cromatografia em coluna sob pressão reduzida da fração hexano:acetato de etila 8:2.	29
Tabela 4. Cromatografia em coluna clássica com sílica impregnada com nitrato de prata da fração hexano: acetato de etila (24:1).	29
Tabela 5. Cromatografia em coluna clássica da fração hexano: acetato de etila (23:2).....	30
Tabela 6. Produtos de biotransformação e suas massas.....	37
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H do ácido copálico (500 MHz, CDCl_3).	47
Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C do ácido copálico (125 MHz, CDCl_3).	48
Tabela 9. Valores de CIM do ácido copálico frente aos micro-organismos avaliados.	48
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H do produto de biotransformação Bp1 (400 MHz, CD_3OD)	58
Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação Bp1 (100 MHz, CD_3OD).	59
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H do produto de biotransformação Bp5 (400 MHz, CD_3OD).	62
Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação Bp5 (100 MHz, CD_3OD).	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- Acetil-CoA – Acetil coenzima A
- ACN - Acetonitrila
- AcOET – Acetato de Etila
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- CAD - *Charged Aerosol Detector* (Detector com Aerossol Carregado)
- CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
- δ - Deslocamento Químico
- d* - Duplete
- DAD - *Diode Array Detector* (Detector de Arranjo de Diodos)
- DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
- DMAPP – Pirofosfato de dimetilalila
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DXR - 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato redutase
- DXS - 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase
- GPP – Pirofosfato de geranila
- HDR - 4-Hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato redutase
- HDS - 4-Hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato sintase
- HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HMG-CoA redutase – 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase
- HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- IPP - Pirofosfato de isopentenila
- MEP - Metileritritol Fosfato
- MH – Caldo Mueller Hinton
- MRS – Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe
- m/z* - Razão massa-carga
- NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
- R_f – Fator de Retardamento

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

s - Singleto

s/ – Singleto Largo

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV – Ultravioleta

UV/VIS – Espectroscopia na luz Ultravioleta e no Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Copaífera</i> : fonte de ácido copálico	2
1.2 Terpenos	5
1.3 Biotransformação	10
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Lista de equipamentos	27
3.2 Análises dos oleorresinas.....	27
3.3 Extração do ácido copálico.....	28
3.4 Meios de cultura utilizados	31
3.5 Micro-organismos	31
3.6 Manutenção dos fungos filamentosos e das bactérias do trato gastrointestinal..	32
3.7 Produção de esporos e biomassa pelos fungos <i>Mucor rouxii</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i>	33
3.8 Determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido copálico	33
3.9 Biotransformação do ácido copálico.....	34
3.10 Obtenção dos extratos com solvente orgânico.....	35
3.11 Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H, 500 MHz).....	36
3.12 Isolamento e determinação estrutural dos produtos de biotransformação.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Análises dos oleorresinas.....	39
4.2 Extração do ácido copálico.....	42
4.3 Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido copálico.	48
4.4 Biotransformação do ácido copálico pelo fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	49
4.5 Biotransformação do ácido copálico pelo fungo <i>Mucor rouxii</i>	50
4.6 Biotransformação do ácido copálico pelas bactérias do trato gastrointestinal.....	54

4.7 Isolamento e identificação dos produtos de biotransformação do ácido copálico produzidos pelo fungo <i>Mucor rouxii</i>	56
---	----

5 CONCLUSÕES	66
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	68
-------------------------	-----------

ANEXO A	79
---------------	----

ANEXO B	80
---------------	----

ANEXO C	81
---------------	----

ANEXO D	82
---------------	----

ANEXO E	83
---------------	----

ANEXO F.....	84
--------------	----

ANEXO G	85
---------------	----

ANEXO H	86
---------------	----

ANEXO I.....	87
--------------	----

ANEXO J.....	88
--------------	----

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Copaífera*: fonte de ácido copálico

O gênero *Copaífera* sp. pertence à família Leguminosae Juss. Esse gênero é nativo das regiões tropicais da América Central e do Sul, da África, além de ser também encontrado na ilha de Bornéu e na Malásia, sendo conhecidas 72 espécies. No Brasil são encontradas mais de 20 espécies (Figura 1, baseada no artigo VEIGA JR. e PINTO, 2002).



Figura 1. Em destaque as regiões onde são encontradas espécies de *Copaífera*. (VEIGA JR. e PINTO, 2002)

Do gênero *Copaífera*, pode-se extrair um bálsamo, de cor e viscosidade variada e devido a sua composição de ácidos resinosos, é denominado de oleorresina. As características físico-químicas, como também sua constituição

química podem variar entre espécies, como também entre indivíduos, devido a características do solo, da região e da sazonalidade. A extração do oleorresina é de grande importância econômica na região Amazônica. Porém o oleorresina adquirido no mercado ou em cooperativas extrativas não provém de uma única espécie e, sim, da coleta de várias árvores de diferentes espécies. O oleorresina é indicado na medicina popular como anti-inflamatório, antitumoral, antisséptico, para tratar bronquites, sífilis, doenças de pele e úlceras (TINCUSI et al., 2002). A utilização do oleorresina como anti-inflamatório e cicatrizante já era bem difundida entre os índios brasileiros da região Amazônica na época do descobrimento (VEIGA JR. e PINTO, 2002). As formas de utilização são variadas, incluindo administração tópica e por via oral.

Estudos feitos com oleorresinas de diferentes espécies, revelaram várias atividades, como antimicrobiana (VASCONCELOS et al., 2008), antileishmaniose (SANTOS et al., 2008), cicatrizante (PAIVA et al., 2002), anti-inflamatória (BASILE et al., 1988) e antitumoral (LIMA et al., 2003; GOMES et al., 2008). Alguns estudos contradizem esses usos. Tal contradição pode ser explicada através da composição dos oleorresinas que podem variar entre espécies, populações, regiões, nutrição do solo, entre outros fatores que determinam a produção das substâncias presentes no oleorresina. Veiga Jr. et al. (2007) verificaram a constituição química do oleorresina de três espécies diferentes do gênero *Copaifera* e mostraram que apesar da similaridade constitucional, estas possuíam diferenças quanto às atividades biológicas relatadas.

As atividades biológicas de oleorresinas de *Copaifera* sp. têm sido atribuídas aos sesquiterpenos e diterpenos que parecem atuar em sinergismo. Izumi et al. (2012), descreveram um aumento da atividade antiparasitária quando utilizaram dois componentes do oleorresina: ácido copálico e o β -cariofileno. Esse dado explica em parte porque pequenas variações na constituição do oleorresina podem aumentar ou diminuir a atividade biológica. As atividades biológicas de algumas substâncias isoladas constituintes dos oleorresinas têm sido descritas, como a do sesquiterpeno β -cariofileno, o qual apresenta atividade repelente de insetos (BIRKETT et al., 2011) e anti-inflamatória (BAKIR et al., 2008). Dentre os diterpenos, o ácido caurenóico apresenta atividades antimicrobiana (AMBROSIO et al., 2008) e anti-inflamatória (PAIVA et al., 2003) e o ácido hardwickiico apresenta também atividade antimicrobiana (KUETE et al., 2007).

O oleorresina é constituído por uma parte volátil, onde se encontram sesquiterpenos e monoterprenos e por uma parte fixa, que contém uma gama de diterpenos. A parte volátil é alvo de interesse da indústria de perfumaria e cosméticos pelo aroma apresentado e representa a maior percentagem do oleorresina. Alguns estudos indicam que pode chegar a 90%, porém essa percentagem pode variar (LEANDRO et al., 2012). Os principais constituintes da parte volátil do oleorresina segundo Veiga Jr. et al. 2007, são: β -Bisabolol, γ -Amorfeno, Germacreno B, Germacreno D, β -Cariofileno, Óxido de Cariofileno, α -Humuleno, α -Cadinol, δ -Cadineno, α -Selineno, β -Selineno, α -Copaeno, α -Elemeno, β -Bisoboleno, α -Cubebeno, Trans- α -Bergamoteno, α -Cedreno (Figura 2).

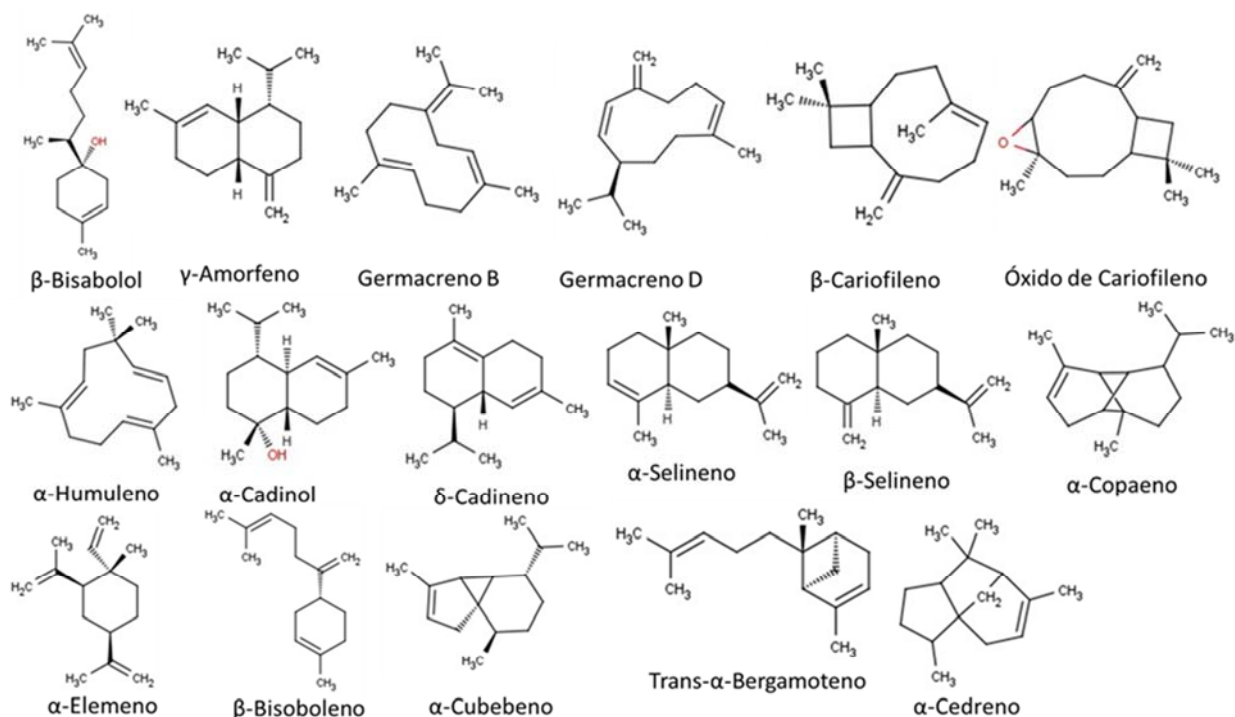


Figura 2. Principais sesquiterpenos encontrados no oleorresina de espécies de *Copaifera*.

Na Figura 3, na página 5 estão apresentados os principais diterpenos que constituem a parte não volátil do oleorresina: ácido copálico, ácido eperuico, ácido caurenóico, ácido hardwickiico (VEIGA JR. et al., 2007), ácido poliático, ácido *ent*-agático, ácido 3-hidroxi-copálico e ácido 3-acetoxi-copálico (LEANDRO et al., 2012).

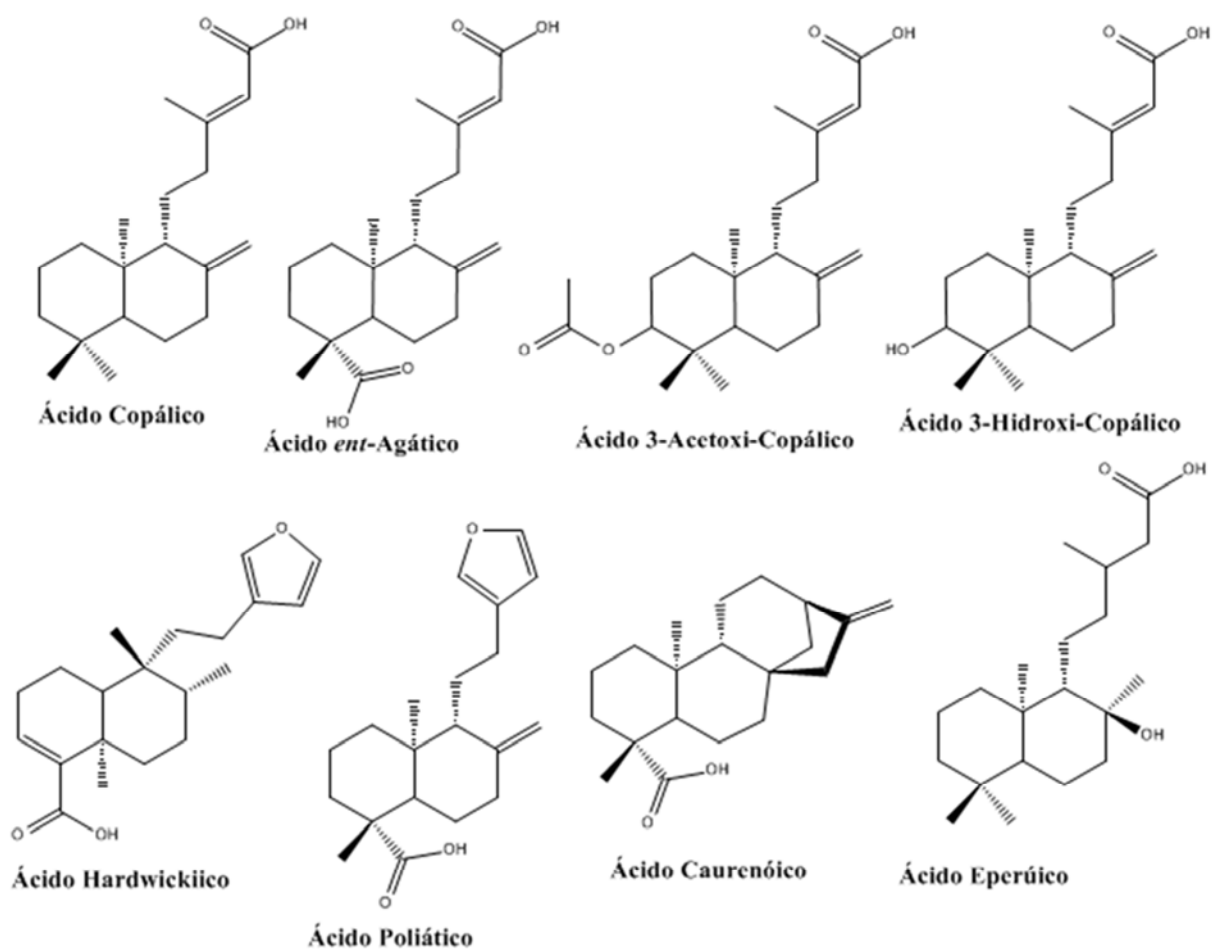


Figura 3. Principais diterpenos encontrados no oleorresina de espécies de *Copaifera*.

1.2 Terpenos

Terpenos são um grupo de compostos de origem natural, formados através da condensação de unidades de isopreno (C_5) (Figura 4, página 6). A fórmula molecular dos membros dessa classe de compostos é $(C_5H_8)_n$. Assim as subclasses desses compostos recebem o nome a partir do número de unidades de isoprenos: monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C), politerpenos (nC) (GONZALEZ-BURGOS e GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

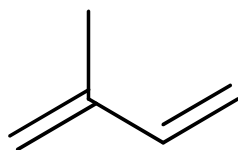


Figura 4. Unidade de isopreno

A formação das unidades de isopreno ocorre por duas vias: via do ácido mevalônico que ocorre nos organismos eucariotos, inclusive em mamíferos e em arqueobactérias (LOMBARD e MOREIRA, 2011) e pela a via do MEP, a qual ocorre em seres procariontes, com algumas exceções. As plantas possuem as duas vias (ROHMER, 2008).

O ácido mevalônico, da via do mevalonato (MVA), provém da condensação inicial de três moléculas de acetil-CoA, que origina o éster β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), e este sofre posterior hidrólise e redução enzimática para formação do ácido mevalônico.

A via do metileritritol fosfato inicia-se com a condensação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, intermediários da via glicolítica. Essa via foi descrita para a formação de terpenos por Rohmer et al. (1993) que descreviam a biossíntese de um triterpeno em bactéria.

As duas vias mencionadas acima conduzem a formação tanto do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) como do pirofosfato de isopentenila IPP, sendo que a combinação destes leva a formação do pirofosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos. Essa reação é do tipo cabeça-cauda. Para a formação dos terpenos pode ocorrer também a condensação do tipo cabeça-cabeça ou cauda-cauda, porém essa configuração formará os derivados que levam a síntese dos carotenóides, esteróis e hopanóides (OLDFIELD e LIN, 2012). Após, ocorrem adições de IPP ou até condensações entre os produtos formando outros terpenos. Os principais passos podem ser observados na Figura 5, página 7.

Célula Vegetal

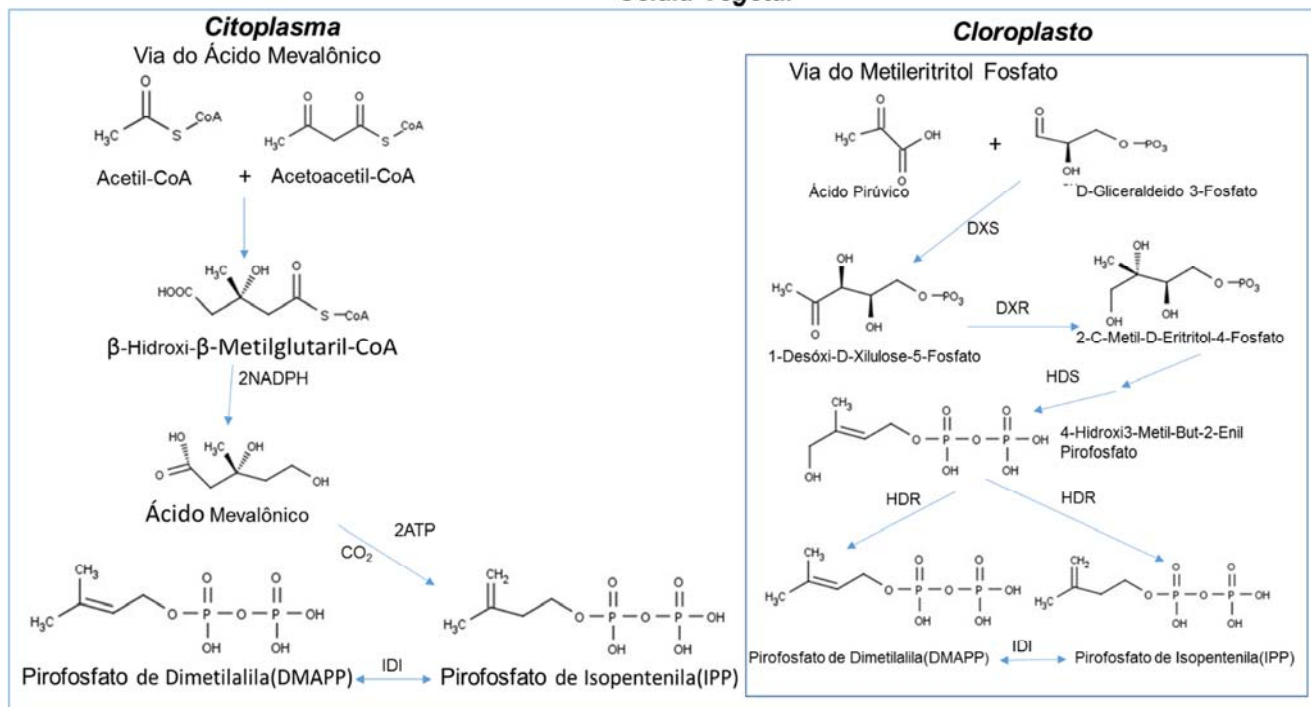


Figura 5. Esquema das rotas biossintéticas de formação das unidades de isopreno.

Os diterpenos são uma subclasse dos terpenos, possuem 20 carbonos, e possuem várias atividades descritas na literatura como antioxidante (GONZALEZ-BURGOS et al., 2012; GONZALEZ-BURGOS e GOMEZ-SERRANILLOS, 2012), antimicrobiana (URZÚA et al., 2006; RIJO et al., 2009; PORTO et al., 2009a), anti-inflamatória (HWANG et al., 2001; LIU e NAIR, 2011), vasodilatadora (HIPÓLITO et al., 2009), antiparasitária (SARTORELLI et al., 2010), antidiabética (HUNG et al., 2012), gastroprotetora (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2002), entre outras. Existem várias subclasses de diterpenos, podendo ter cadeias acíclicas e cíclicas, cadeias laterais, possuindo heteroátomos, anéis aromáticos, etc. Alguns exemplos de subclasses de diterpenos estão representados na Figura 6, página 8.

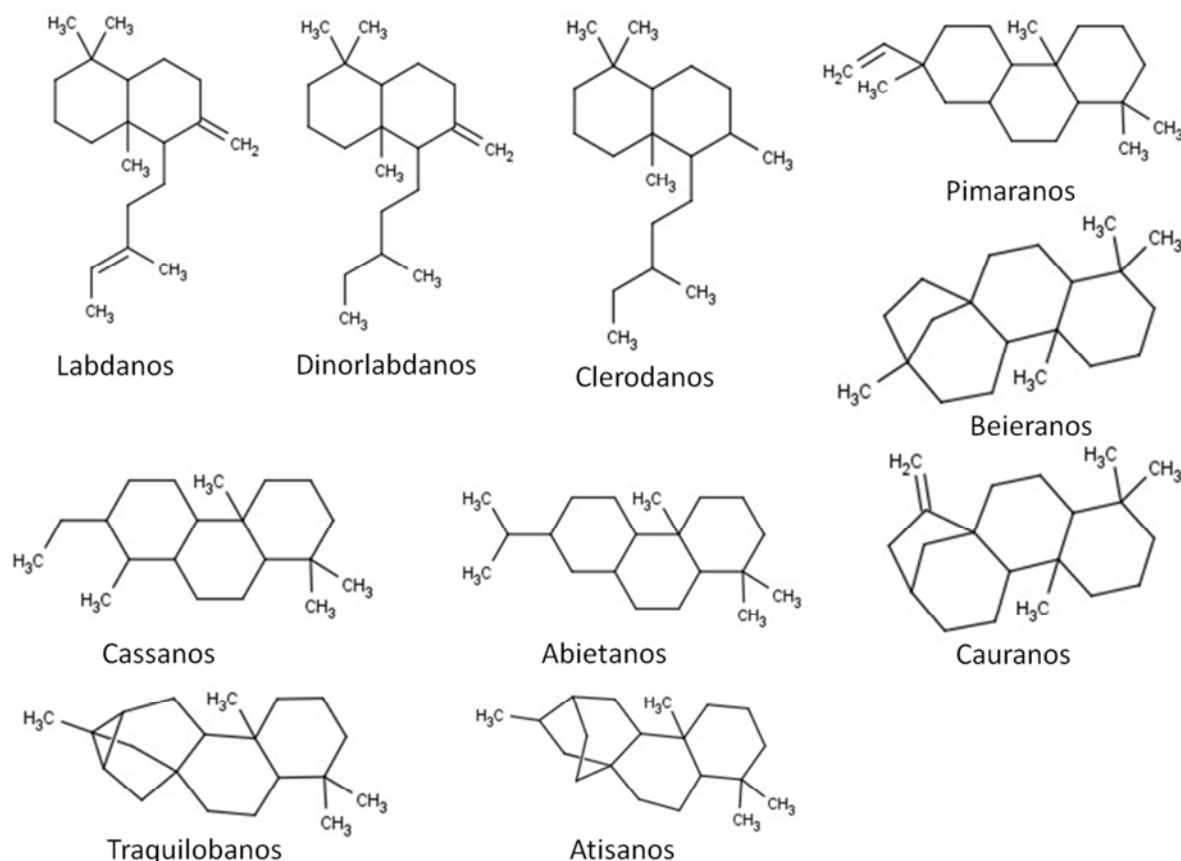


Figura 6. Esqueletos-base dos principais tipos de diterpenos.

O ácido copálico (Figura 7, página 9) é um diterpeno de esqueleto do tipo labdano, descrito pela primeira vez por Nakano e Djerassi (1961), que possui atividade antimicrobiana (TINCUSI et al., 2002; SOUZA et al., 2010), anti-inflamatória com certa seletividade para COX-2 (LIU e NAIR, 2011), tripanocida com alta seletividade para as células tripomastigotas do parasita (IZUMI et al., 2012) e baixa toxicidade para células de mamíferos (SARTORELLI et al., 2010) e antitumoral frente a linhagens de cânceres de pulmão, cólon, estômago, sistema nervoso central e de mama, inibindo as proliferações celulares em 10%, 26%, 35%, 27% e 34%, respectivamente (LIU e NAIR, 2011).

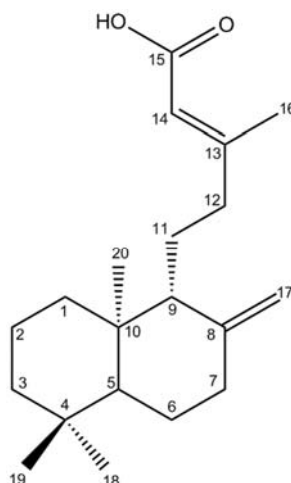


Figura 7. Estrutura química do ácido copálico.

Este diterpeno já foi isolado de espécies do gênero *Copaifera* (MAHAJAN e FERREIRA, 1971; VEIGA JR. et al., 2007), *Aristolochia* sp. (SARTORELLI et al., 2010; MARCHESINI et al., 2009), *Eperua* sp. (AMUSANT et al., 2007), *Hymenaea* sp. (DOMENECH-CARBO et al., 2009), *Curcuma mangga* (LIU e NAIR, 2011), *Detarium microcarpum* (CAVIN et al., 2006), *Pinus strobus* var. *chiapensis* (CARVALHO et al., 1996), *Oxystigma oxyphyllum* (BEVAN et al., 1968), sendo um dos diterpenos majoritários e biomarcador do oleorresina das espécies do gênero *Copaifera*.

Alguns autores descrevem que a atividade antimicrobiana dos diterpenos está associada ao esqueleto hidrofóbico e a uma porção hidrofílica oxigenada (PORTO et al., 2009b). Autores sugerem que a presença de um segundo grupo doador de hidrogênio no esqueleto diterpênico promove redução ou suspensão da atividade antimicrobiana (URZÚA et al., 2008) e apontam duas razões para isto: a primeira é que a diminuição da lipofilicidade pode levar a diminuição da interação com a membrana; a segunda é que as interações intramoleculares entre os grupos doadores de hidrogênio competem com ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos doadores de hidrogênio e a membrana celular. Nos resultados obtidos por Porto et al. (2009b), a presença de dois grupos doadores de hidrogênio no esqueleto diterpênico do tipo pimarano ocasionou diminuição da atividade antimicrobiana.

1.3 Biotransformação

Biotransformações são definidas como o uso de sistemas biológicos para realizar transformações químicas em substâncias que não constituem os substratos naturais (HANSON, 1995).

As biotransformações têm sido investigadas desde os tempos de Pasteur e foram impulsionadas por grandes químicos e bioquímicos do século XIX. 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 (ROBERTS et al., 1995).

O procedimento mais comumente utilizado nos estudos de biotransformação é feito através de células íntegras de micro-organismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, o que pode propiciar a obtenção de novos derivados, bem como mimetizar reações que ocorrem nos animais *in vivo*. Asha e Vidyavathi (2009), num artigo de revisão, discutiram o uso de espécies do gênero *Cunninghamella* como modelos para estudos de metabolismo de fármacos. Pode-se ainda utilizar enzimas puras, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essas últimas podem ser bastante onerosas, uma vez que além da enzima, pode ser necessário o uso de um ou mais cofatores para que a mesma seja ativa (FABER, 1997).

A utilização de fungos como modelos para estudos de metabolização de xenobióticos se deve ao fato de serem organismos eucariotos e de o aparato enzimático se assemelhar com o dos mamíferos (ABOURASHED et al., 1999). Os modelos microbianos do metabolismo animal, baseados na similaridade do metabolismo hepático e enzimático microbiano, tornaram-se uma alternativa promissora para a elucidação da rota metabólica de fármacos. Esse conceito foi desenvolvido no meio da década de 70 quando Smith e Rosazza (1974) escreveram um artigo no qual após uma revisão na literatura foram selecionados 11 fungos e bactérias para incubar 13 compostos que possuem anéis aromáticos, e esses micro-organismos foram capazes de gerar metabólitos majoritários que eram encontrados nas pesquisas *in vivo*. Osorio-Lozada et al. (2008), utilizaram a bactéria *Actinoplanes sp.* para estudar o metabolismo do diclofenaco, mostrando que essa

bactéria foi capaz de formar metabólitos hidroxilados, sendo alguns deles encontrados na urina humana. Outros trabalhos foram publicados usando fármacos que sofreram biotransformações como: celecoxibe (SRISAILAM e VEERESHAM, 2009), indometacina (ZHANG et al., 2006), pantoprazol (XIE et al., 2005), valdecoxibe (SRISAILAM e VEERESHAM, 2010), carbamazepina (KANG et al., 2008), trimegestona (LACROIX et al., 1999), verapamil (SUN et al., 2004), losartan (VIDYAWATHI et al., 2008) e albendazol (HILÁRIO et al., 2012).

Micro-organismos podem também ser utilizados em processos de biorremediação. Chen et al. (2013b) mostraram que a transformação abiótica do DDT é extremamente lenta, porém quando há micro-organismos presentes no solo a desclorificação é extremamente rápida. Os autores ainda demonstraram que a suplementação nutricional do solo com fontes de carbonos proporcionou um maior aumento da velocidade do processo. Zhou et al. (2013) mostraram que *Ensifer adhaerens*, uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada no solo, foi capaz de biodegradar um inseticida neonicotinóide de segunda geração.

Estudos de metabolismo podem ser usados para obtenção de informação sobre enzimas essenciais para alguns processos a serem desenvolvidos. Yamamoto (2012) escreveu um artigo de revisão onde o estudo do metabolismo microbiano de oligossacarídeos propiciou o isolamento e identificação de várias glicosidases, além de enzimas envolvidas em reações de transglicosilação que podem ser usadas na síntese de glicopeptídeos. Portanto, estudos com biotransformações poderiam ser utilizados para isolar enzimas com régio e estereoseletividade para alguns grupos, aumentando o leque de opções para a síntese orgânica.

Leipold et al. (2010) usaram a biotransformação como forma de obtenção de novos derivados do ácido ursólico e através dessa via de biotransformação que foi descrita, propuseram o uso do fungo *Nocardia sp.* como forma de produção de novos derivados de triterpenos (Figura 8, página 12).

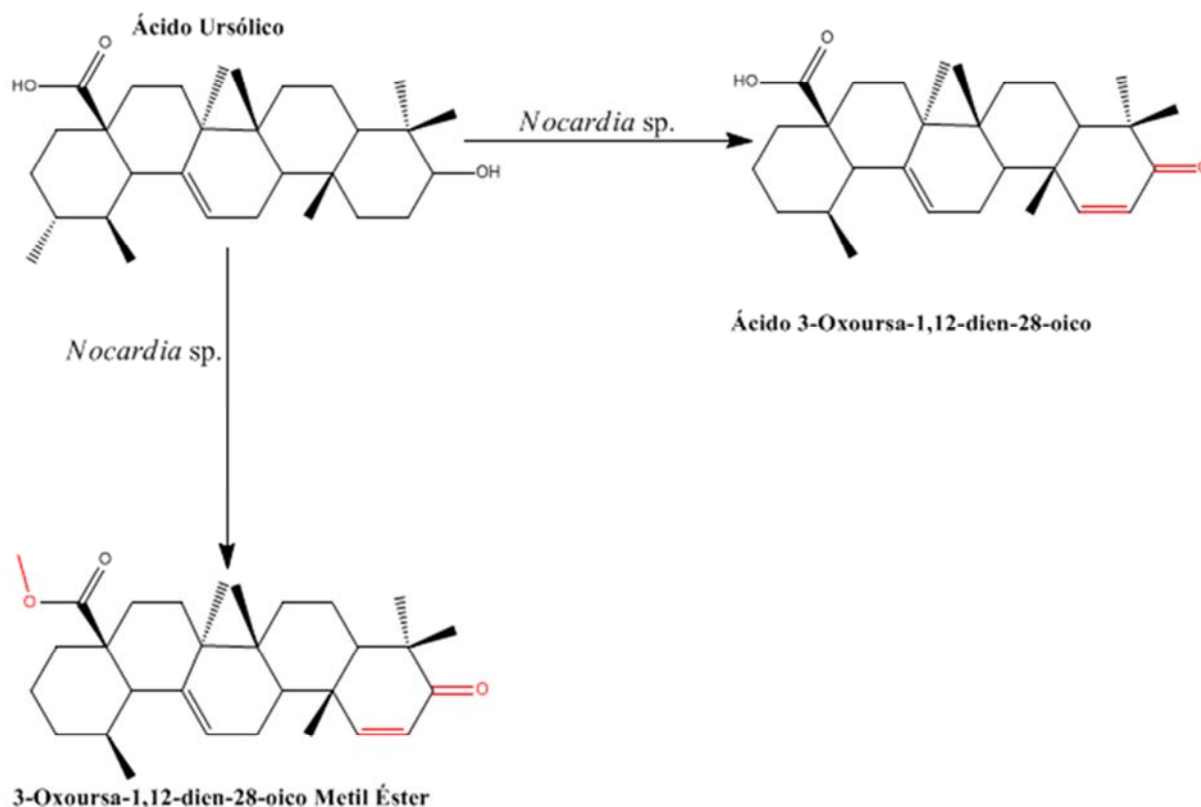


Figura 8. Biotransformação do ácido ursólico.

Os fungos têm sido extremamente úteis em processos de biotransformação (ZELINSKI e HAUER, 2002). As habilidades destes micro-organismos para realizar hidroxilações régio e estereoseletivas de triterpenos esteroidais, por exemplo, é bem conhecida e consiste em um método de bioconversão bastante explorado industrialmente (MUFFLER et al., 2011). Fungos filamentosos também são capazes de biotransformar monoterpenos (SIMEO e SINISTERRA, 2009), sesquiterpenos (KOSHIMURA et al., 2009), diterpenos (FRAGA et al., 2003 e 2004), bem como triterpenos (AKIHISA et al., 2002; CARVALHO et al., 2010; CAPEL et al., 2010). Kuriata-Adamusiak et al. (2012), num artigo de revisão discutiram sobre o uso de micro-organismo na síntese para obtenção de derivados quirais e estereoseletivos de terpenos. Schwab et al. (2013) destacam em uma revisão o uso da biotransformação na síntese de novos terpenos na química fina.

Um mesmo substrato pode ser biotransformado de maneira diferente, usando fungos diferentes. Um caso desses foi descrito por Severiano et al. (2010) no qual a biotransformação de um *ent*-pimarano ocasionou a redução do grupo carboxílico para uma hidroxila no processo desenvolvido com *Glomerella cingulata*. Utilizando *Mucor*

rouxii obtiveram a formação de dois produtos. Em um houve a simples mudança de posição de uma dupla, enquanto em outro além da mudança da posição da ligação dupla na cadeia, ocorreu a introdução de um grupo carbonílico (Figura 9).

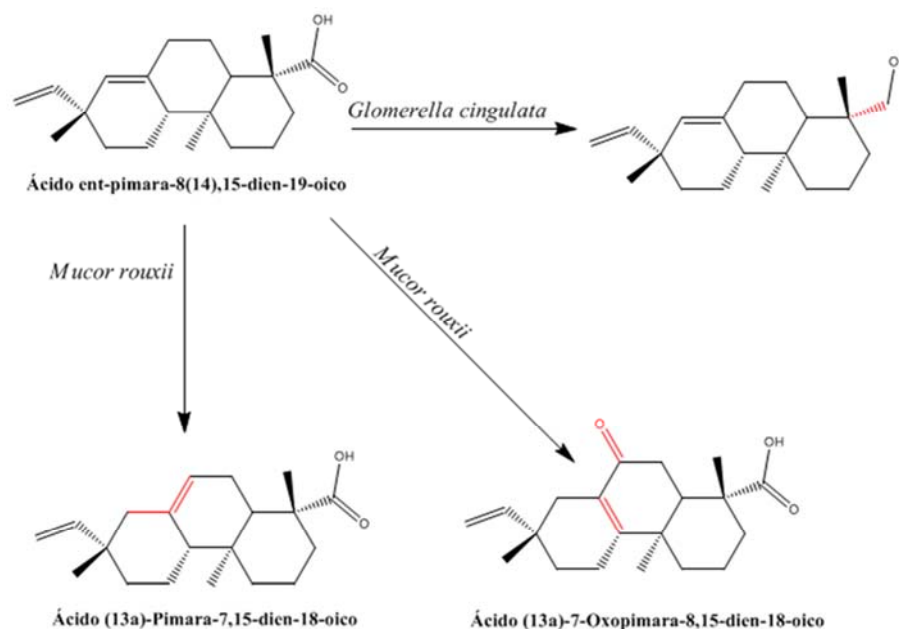


Figura 9. Biotransformação do ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien19-oico.

Existem vários fungos que podem ser usados em biotransformação, pertencentes a diferentes gêneros, e dentre estes pode se destacar o gênero *Mucor*. Fungos deste gênero pertencem à classe dos Zigomicetos, divisão Zigomicota, ordem Mucorales, família Mucoraceae. Esse gênero possui mais de 3000 espécies, com amplas aplicações. Uma delas que foi proposta recentemente e que pode ter um futuro promissor é a produção de etanol. O fungo *Mucor indicius* consegue produzir etanol a partir de várias fontes de açúcares, entre elas glicose, frutose e galactose e o mais importante, com a mesma produtividade que *Sacharomyces cerevisiae*, porém a maioria dos fungos filamentosos não consegue produzir etanol à partir da sacarose, tornando difícil a substituição de *S. cerevisiae* para esse substrato. Uma das dificuldades de se usar fungos filamentosos na produção de etanol é a produção de biomassa. No caso do fungo *Mucor indicius*, há a possibilidade de se controlar a sua forma (levedura e filamentosa), mudando as propriedades do meio. A presença de CO₂ numa condição anaeróbica pode levar a indução da forma leveduriforme. Além disso, grandes concentrações de açúcares hexoses podem também levar a formação da forma leveduriforme (KARIMI e ZAMANI, 2013).

Outra aplicação desse gênero é a produção de quitosana, que possui várias aplicações na indústria de alimentos, agricultura etc. Estudos para otimização da produção desse derivado da quitina têm sido feitos nos últimos anos. (CHATTERJEE et al., 2005,2006,2009). Moussa et al. (2011) testaram a quitosana extraída do fungo *Mucor rouxii* como um agente antimicrobiano para uso na indústria têxtil. Dissolveram-na numa solução aquosa de pH 6,5. Após, mergulharam o algodão nessa solução, em seguida efetuaram o teste antimicrobiano, conseguindo resultado satisfatório.

Fungos do gênero *Mucor* sp. podem também servir de matriz para extrações de enzimas. Handayani et al. (2012), imobilizaram lipase do *Mucor miehei* usando membranas de poliétersulfona aminada. Gustafsson et al. (2012) também imobilizaram lipases do mesmo fungo, porém utilizaram sílica e verificaram o efeito do tamanho e da morfologia da sílica na imobilização.

Por fim, fungos do gênero *Mucor* sp. têm sido amplamente utilizados em estudos de biotransformação. Chen et al. (2005) reportaram a biotransformação de três diterpenos utilizando *Mucor plumbeus*, obtendo 8 produtos de biotransformação, havendo mono e di-hidroxilação nas moléculas. Fraga et al. (2003) usaram como partida dois diterpenos e usando o mesmo fungo, obtiveram vários compostos oxigenados (Figura 10).

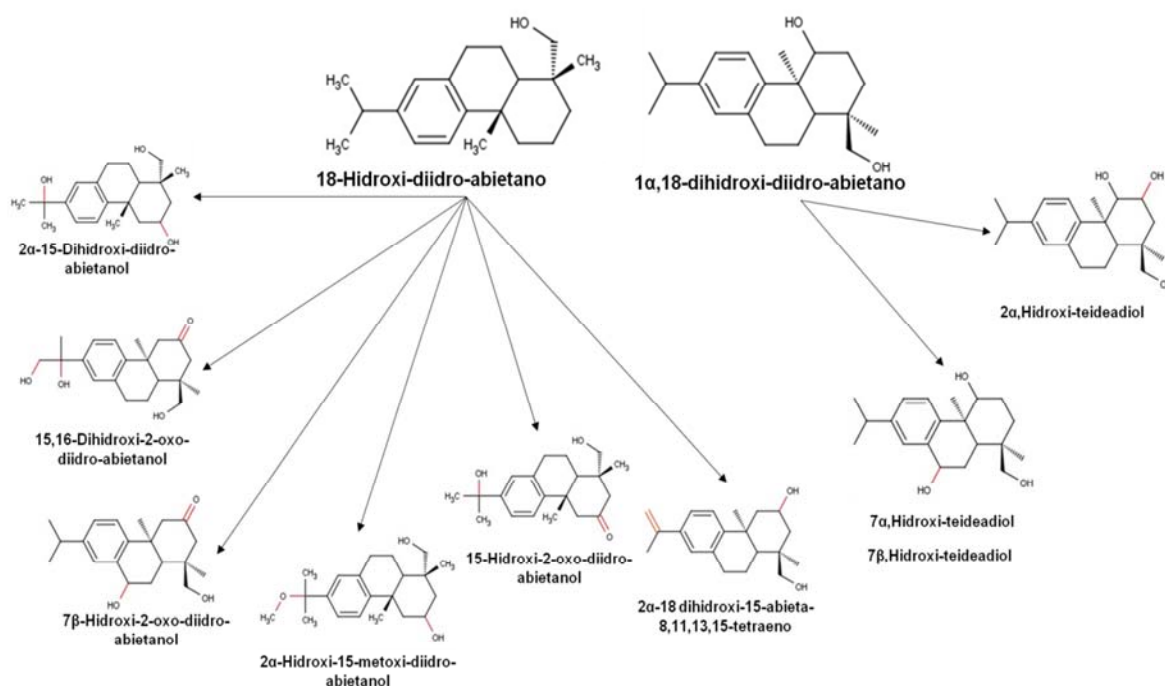


Figura 10. Biotransformação do diterpeno 18-hidroxi-diidro-abietano e do diterpeno 1α,18-dihidroxi-diidro-abietano.

No trabalho de Chen et al. (2013a), os autores reportaram a biotransformação do 20(s)-protopanaxadiol, um triterpeno, com atividade citotóxica, usando *Mucor racemosus* e conseguiram além de produtos hidroxilados, produtos com hidroxiperoxidação, reportados pela primeira vez nesse artigo (Figura 11).

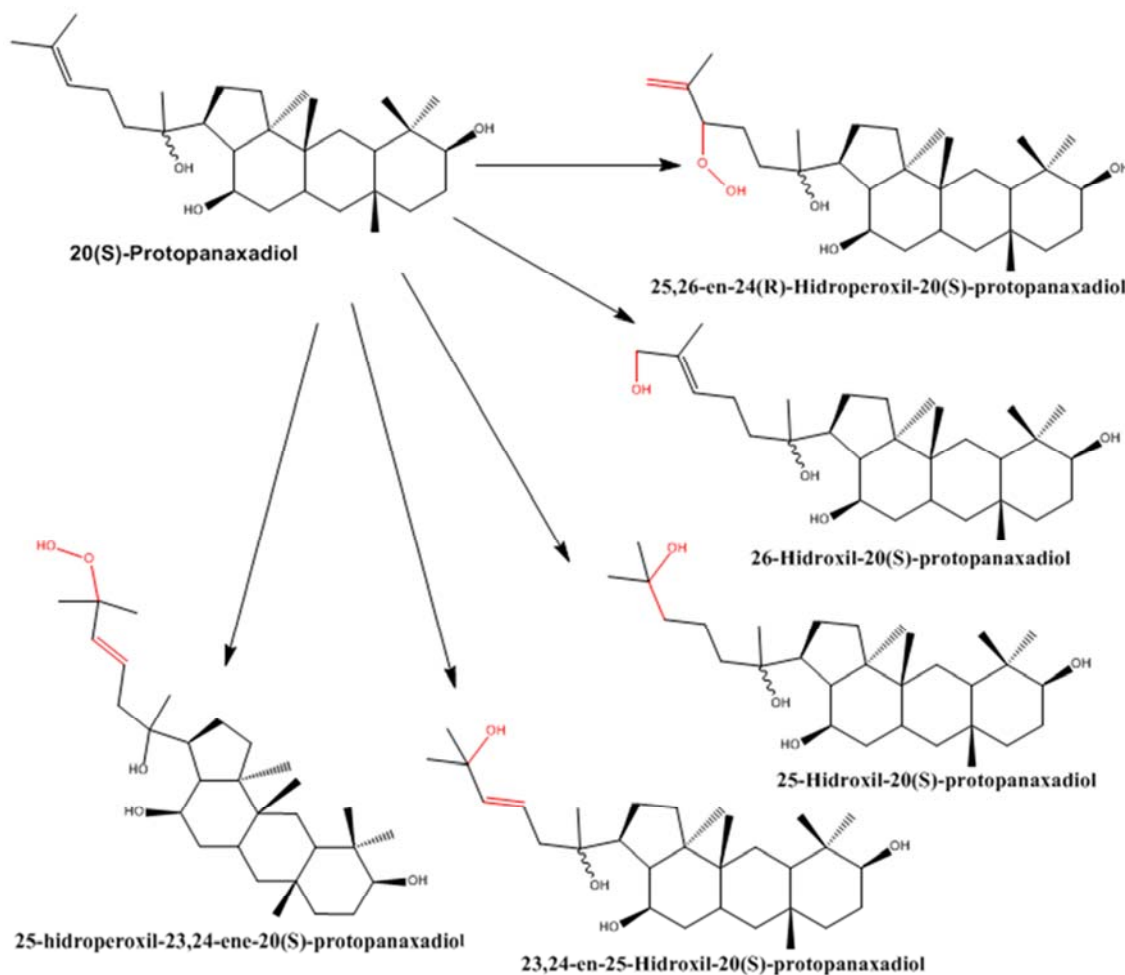


Figura 11. Biotransformação do triterpeno 20(S)-protopanaxadiol.

Areche et al. (2008) reportaram a biotransformação de um diterpeno, que possui ação antiplasmódica (LOYOLA et al., 2004), tricomonocida (LOYOLA et al., 2001), e tripanocida (ARAYA et al., 2003), usando *Mucor plumbeus* produzindo dois produtos: um monohidroxilado e outro di-hidroxilado.

Um dos maiores gêneros de fungos é o *Aspergillus*, que inclui entre 260 a 850 espécies. Entre elas existem diferenças genéticas significativas. Um exemplo disso são *A. nidulans* e *A. fumigatus* que geneticamente são tão diferentes quanto o homem do peixe, porém a diferença evolucionária entre o homem do peixe é de 450

milhões de anos enquanto que a diversificação do gênero *Aspergillus* se deu apenas há 200 milhões de anos. Essa diferença genética existente entre as espécies de fungos do gênero *Aspergillus* se deve a um aumento da taxa de aceleração evolucionária.(KRIJGSHELD et al., 2013).

Fungos do gênero *Aspergillus* podem causar aspergilose e doenças das vias respiratórias, como alergia e bronquite. Porém, de espécies desse gênero pode-se isolar enzimas (KRIJGSHELD et al., 2013) e fármacos como a lovastatina (JAHROMI et al., 2013).

O sucesso desse gênero se deve ao fato da alta taxa de esporulação, além de não possuir uma seletividade para o crescimento, podendo crescer entre temperaturas que variam entre 6 a 55°C. O maquinário enzimático desse gênero é impressionante. Produzem grande variedade de enzimas que permitem consumir qualquer tipo de substrato, assim é uma importante fonte de extração de enzimas como xilanases, amilases, pectinases entre outras (KRIJGSHELD et al., 2013).

Este gênero também é caracterizado pela produção de substâncias, como aflatoxinas, encontradas em alimentos como amendoim, as quais apresentam alta toxicidade para os seres humanos, lesionando principalmente os hepatócitos. Existem aproximadamente 14 diferentes tipos de aflatoxinas, sendo que a sua maior prevalência ocorre em países tropicais devido ao armazenamento inapropriado dos grãos e a maior umidade relativa do ambiente (LEONG et al., 2012). Em uma revisão, Yu e Keller (2005) descrevem sobre a regulação do metabolismo secundário, focando principalmente na produção de micotoxinas.

Fungos do gênero *Aspergillus* também são utilizados em estudos de biotransformação. Yang et al. (2005) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para biotransformar fraxinelona, obtendo dois produtos: um hidroxilado e outro onde houve a adição de um grupo carbonílico, sendo que ambos os produtos apresentaram efeito citotóxico moderado (Figura 12, página 17).

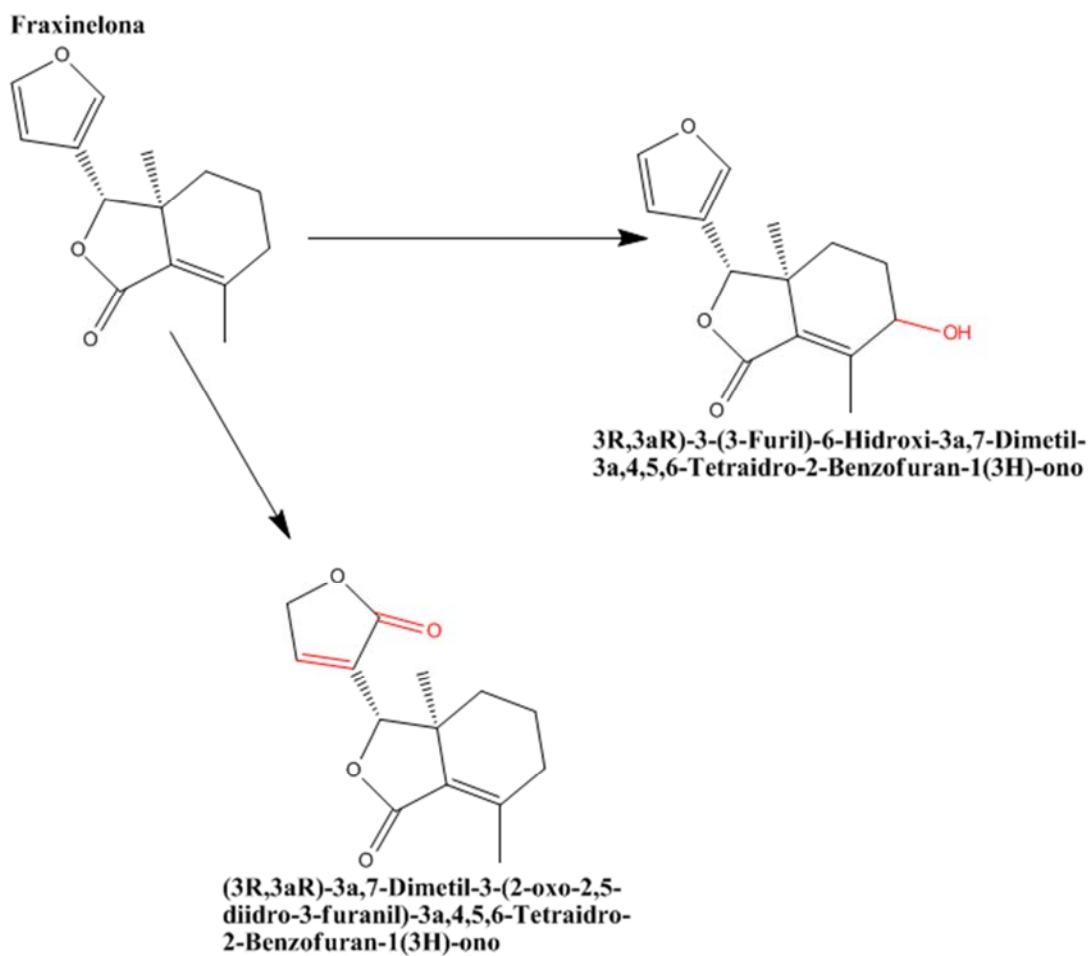


Figura 12. Biotransformação da fraxinelona.

Gouiric et al. (2004) biotransformaram o diterpeno ácido diidro-abiético, usando *Aspergillus niger* e obtiveram três produtos hidroxilados, sendo um di-hidroxilado, com as hidroxilas nas mesmas posições dos outros dois produtos (Figura 13).

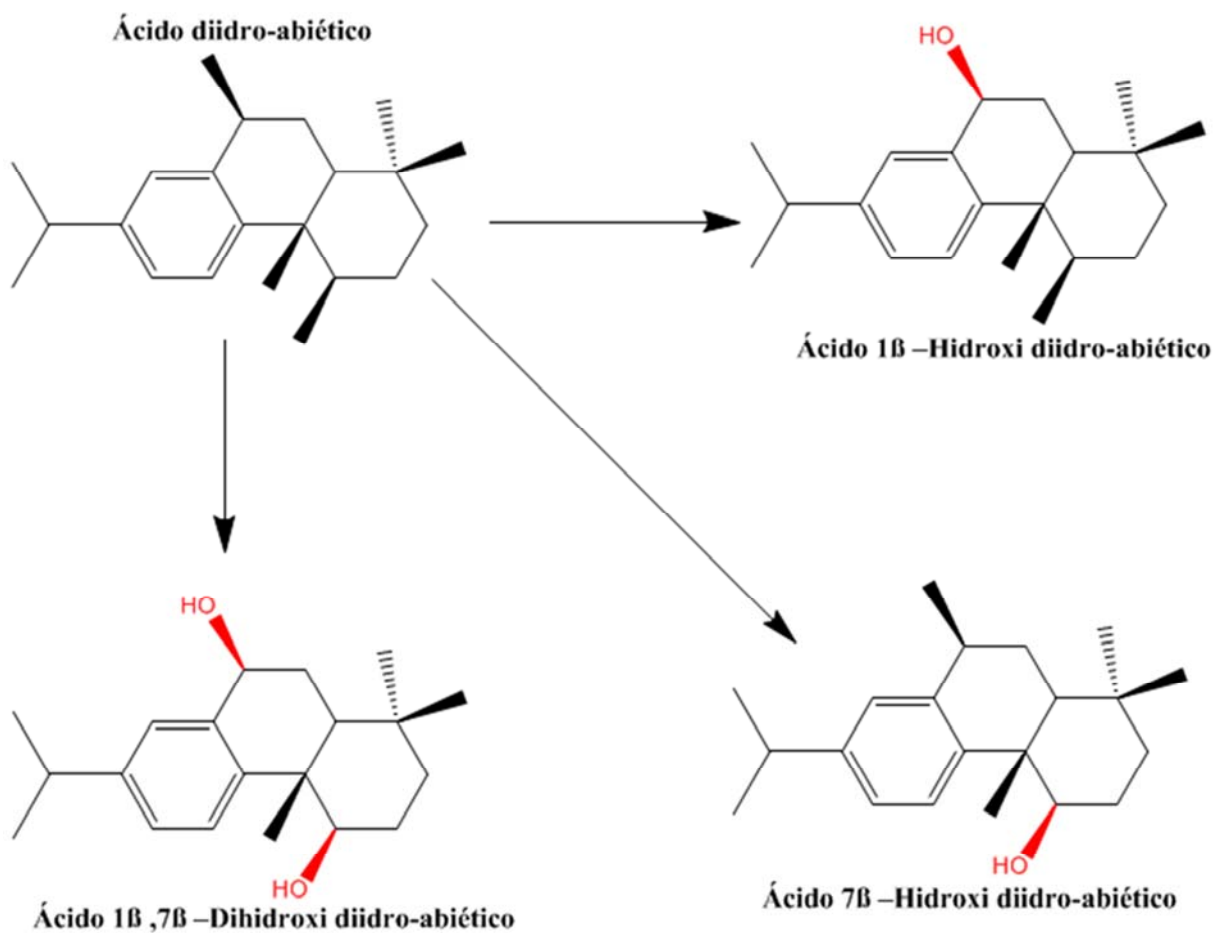


Figura 13. Biotransformação do diterpeno ácido diidro-abiético.

Venkateswarlu et al. (1999) utilizando *Aspergillus niger* reportaram a biotransformação do sesquiterpeno tricíclico $\Delta^{9,15}$ -africaneno, formando um composto hidroxilado e um epóxido. (Figura 14).

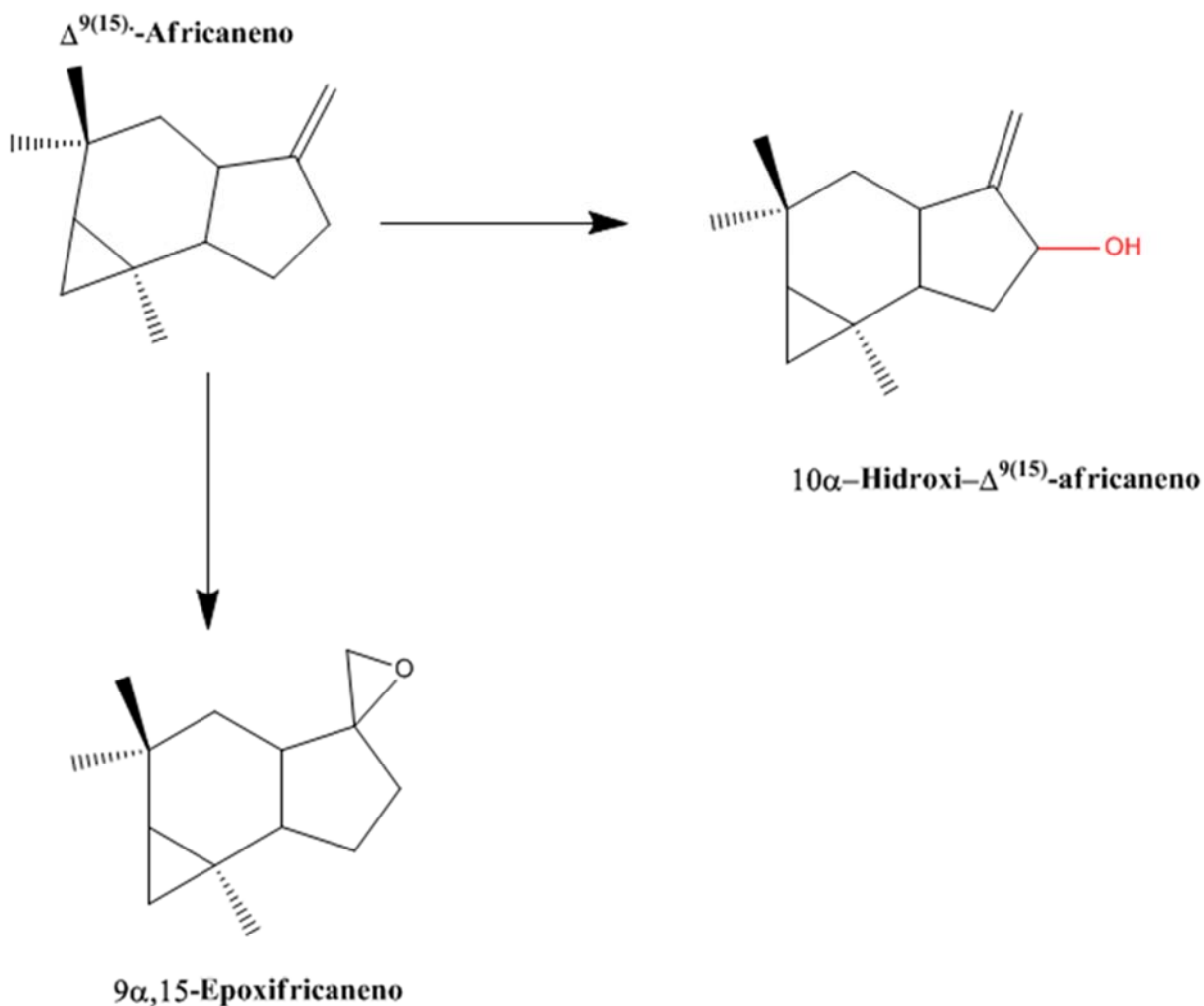


Figura 14. Biotransformação do sesquiterpeno $\Delta^{9,15}$ -africaneno.

Lu et al. (2013) biotransformaram a substância cinobufotalina, que possui um esqueleto esteroidal cardiotônico e que possui uma atividade citotóxica significativa. Neste estudo foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* e foram obtidos três compostos. Dentre as modificações ocorridas no esqueleto observaram-se hidroxilações (inclusive na posição 9 inédita na literatura), desidrogenação (formando um grupo carbonílico) e desacetilação (Figura 15).

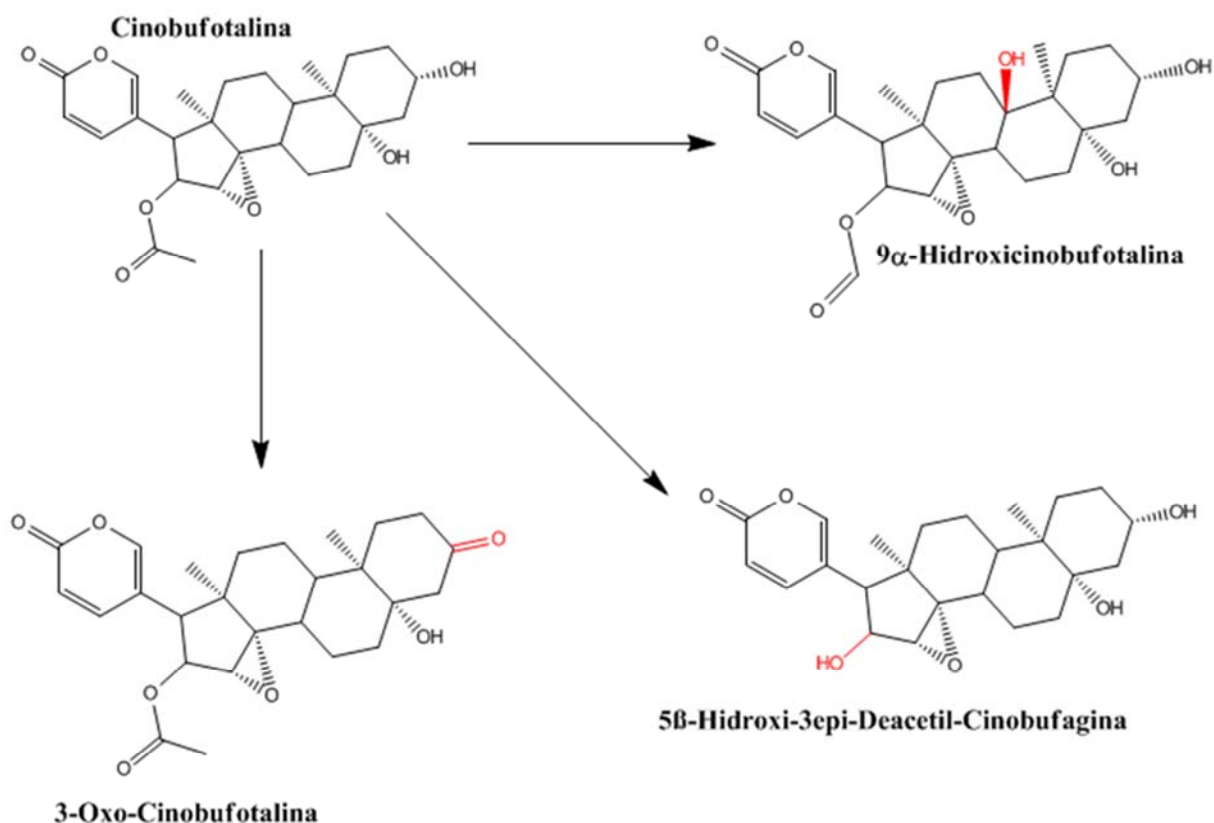


Figura 15. Biotransformação da substância cinobufotalina.

Além da utilização de fungos para avaliação da biotransformação de fármacos, o uso de bactérias da microbiota intestinal também se torna uma ferramenta extremamente útil, uma vez que xenobióticos, quando ingeridos, podem ser metabolizados por esses micro-organismos.

O cólon é constituído por um ecossistema altamente complexo de micro-organismos anaeróbios e anaeróbios facultativos, onde a colonização corresponde a um número aproximado de 10^{12} UFC por grama de conteúdo intestinal (RUBINSTEIN, 1990; DUNNE, 2001; DING et al., 2009).

Esse ecossistema co-evoluiu com os humanos formando uma simbiose intensa e de benefícios mútuos, levando a um grau de interdependência entre os

organismos envolvidos. A constituição da microbiota depende de alguns fatores, que as diferenciam e afetam seu funcionamento em cada indivíduo. Fatores como a dieta, estilo de vida, uso de antibióticos e doenças são alguns fatores dessa grande rede que modula a nossa microbiota. (NICHOLSON et al., 2012). Os probióticos (micro-organismos benéficos à saúde) têm sido incorporados em alimentos, contribuindo para a predominância de uma microbiota intestinal saudável. Dentre os diversos gêneros que integram o grupo dos probióticos, destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* (COPPOLA e TURNES, 2004). RECHNER et al. (2004) divulgaram um estudo sobre a dinâmica de metabolização dos polifenóis pela microbiota intestinal, mostrando que tanto a concentração do substrato, como a composição da microbiota intestinal influenciam na quantidade dos produtos de degradação desses compostos.

A microbiota exerce uma forte influência sobre o sistema imune do hospedeiro modulando-o desde o nascimento até a fase adulta. Além disso, exerce influência sobre o metabolismo secretando substâncias que alteram o metabolismo do hospedeiro (NICHOLSON et al., 2012). Por exemplo, alguns ácidos biliares são hepatotóxicos para o hospedeiro, portanto passam pela metabolização de fase 2, onde sofrem conjugação. Ao serem excretados via intestino são metabolizados pela microbiota produzindo diversas estruturas que retornam via circulação entero-hepática. (NICHOLSON et al., 2003). A variação da metabolização de substâncias ocorre também devido ao polimorfismo genético da população, porém é fácil imaginar que essa influência pode estar ligada a constituição da microbiota. (NICHOLSON et al., 2003). A microbiota pode influenciar o metabolismo de xenobióticos modulando a expressão gênica do hospedeiro, principalmente alguns citocromos (CLAUS et al., 2011).

Possemiers et al. (2011), escreveram uma revisão discutindo o metabolismo de polifenóis e fito-estrógenos, destacando a sua capacidade de alterar a bioatividade como ativar algumas substâncias (fito-estrógenos). Haiser e Turnbaugh (2012) discutiram como a microbiota pode interferir na metabolização de fármacos, podendo ativá-los (L-Dopa), inativá-los ou produzir uma nova substância tóxica para o hospedeiro, sendo ela responsável pelo efeito colateral. Um exemplo disso é a sulfazalazina que sofre biotransformação da microbiota formando dois metabólitos, um com atividade farmacológica e o outro responsável pelos principais efeitos colaterais do fármaco (Figura 16, página 22).

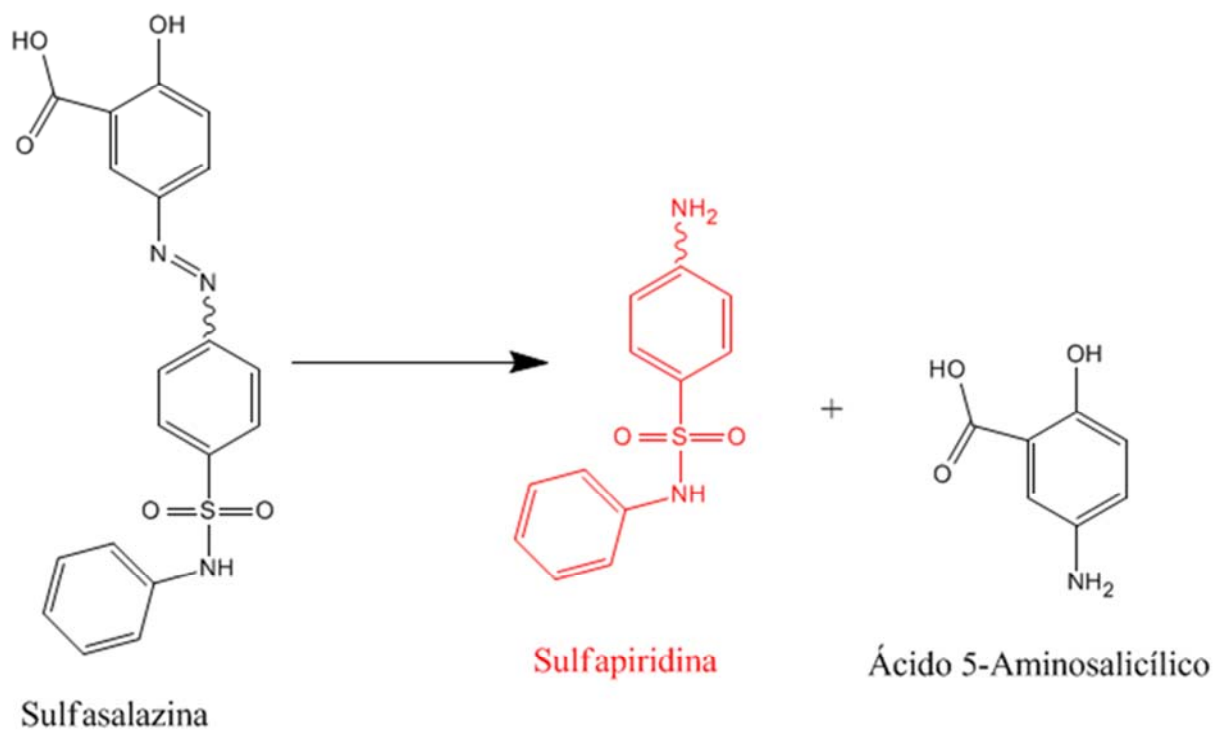


Figura 16. Biotransformação da sulfasalazina. Em vermelho está a substância que causa os efeitos colaterais.

Sousa et al. (2008) escreveram um artigo de revisão discorrendo sobre a biotransformação de fármacos pela microbiota intestinal (Tabela 1). Nesse trabalho os autores destacaram a importância da realização desses estudos e afirmaram que estes deveriam integrar os procedimentos para o desenvolvimento de novos medicamentos no mundo todo.

Tabela 1. Fármacos que são biotransformados pelas bactérias do Trato gastrointestinal.

Fármaco	Tipo de metabolização
Ácido 5-aminosalicílico	Acetilação
Balsalazida	Azo-redução
Calcitonina	Proteólise
Clonazepam	Redução
Cloranfenicol	Formação de amina e hidrólise da ligação amida
Daidzein	Redução
Digoxina	Redução
Fenacetina	Desacetilação
Flucitosina	Troca do grupo amino por um grupo carbonílico
Hesperidina	Desglicosilação
Insulina	Proteólise
Isossorbida dinitrato	Desnitração
Lactulose	Hidrólise
L-Dopa	Desidroxilação
Levamisole	Abertura do anel tiazólico
Metafetamina	N-desmetilação
Metronidazola	Redução
Misonidazol	Redução
Neoprontosil	Azo-redução
Nitrazepam	Redução
Nizatidina	Quebra da ligação N-óxido
Olsalazina	Azo-redução
Omeprazol	Redução
Oxonato de potássio	Redução
Prontosil	Azo-redução
Quercetina-3-glucosídeo	Desglicosilação
Ranitidina	Quebra da ligação N-óxido
Risperidona	Quebra da ligação N-óxido
Sorivudina	Hidrólise
Succinilsulfatiazol	Remoção do grupo succinato
Sulfasalasina	Azo-redução
Sulfimpirazona	Redução
Sulindaco	Redução
Trinitrato de gliceril	Desnitração
Zonisamida	Redução

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver processos de biotransformação do ácido copálico utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal, isolar e identificar os produtos de biotransformação majoritários.

2.2 Objetivos específicos

1. Isolar o ácido copálico de oleorresina de *Copaifera*;
2. Determinar a concentração inibitória mínima do ácido copálico frente aos micro-organismos a serem avaliados nos estudos de biotransformação;
3. Desenvolver processos de biotransformação do ácido copálico utilizando fungos filamentosos e bactérias da microbiota intestinal;
4. Selecionar um ou dois processos mais promissores para o desenvolvimento em escala ampliada;
5. Desenvolver o(s) processo(s) selecionado(s) em escala ampliada;
6. Isolar e elucidar as estruturas químicas dos produtos de biotransformação majoritários.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lista de equipamentos

- Cromatógrafo Waters[®], modelo Breeze[™], com detector Dionex Corona CAD, da Thermo Scientific[®].
- Cromatógrafo Shimadzu[®] com detector de arranjos de diodos (DAD), modelo SPD – M10AVP.
- Cromatógrafo Shimadzu[®] com detector UV/VIS, modelo SPD – 20A.
- Autoclave vertical Phoenix, modelo AV 75.
- Estufa de cultura Fanem Ltda, modelo 002CB.
- BOD Solab, modelo SL 200/334.
- Bancada de fluxo laminar vertical Pachane, modelo 310.
- Espectrofotômetro Biospectro, modelo SP-220.
- Agitador de tubos Phoenix, modelo AP56.
- Agitador magnético Ika, modelo color squid.
- Câmara de anaerobiose Whitley, modelo DG250.
- Speed vacuum Thermo Cooperation[®], modelo Savant SPD2010.
- Evaporador a vácuo Fisaton, modelo 801.
- Balança analítica Sartorius, modelo BL 210-S.
- Balança Marte, modelo AS – 2000 C.

3.2 Análises dos oleorresinas

Oleorresinas de diferentes procedências foram analisados com o objetivo de selecionar a melhor quanto ao teor de ácido copálico: oleorresina comercial adquirida da Apis Flora[®] lote 0790111, oleorresina coletada da espécie *Copaifera langsdorffii* e oleorresina coletada da espécie *Copaifera duckei*.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por aerossol carregado (CAD) e por detector de arranjos de diodos (DAD). Utilizou-se coluna da marca Waters, modelo sunfire C-18 (4,6 mm x 100mm de

diâmetro de partículas de 5 μm). Para proteção da coluna analítica foi empregada uma pré-coluna analítica com as mesmas especificações. As amostras foram eluídas em dois sistemas isocráticos, o primeiro de proporção 9:1 acetonitrila:água com 0,1% de ácido acético (SOUZA et al., 2013) e o segundo de proporção 7:3 acetonitrila:água com 0,1% de ácido acético.

3.3 Extração do ácido copálico

Amostra do oleorresina adquirido da Apis Flora[®] (352 g) foi submetida à cromatografia em coluna sob pressão reduzida empregando-se coluna de 25 cm de altura e 14,5 cm de diâmetro, empacotada com 720 g de sílica gel 60H Merck (0,063 – 0,200 mm). O oleorresina foi previamente incorporado à sílica gel 60 Acros Organics (0,060-0,200 mm). As informações da cromatografia: volume da fase móvel e massas das frações obtidas, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Cromatografia em coluna sob pressão reduzida do oleorresina.

<i>Eluentes</i>	<i>Volume (L)</i>	<i>Massa (g)</i>
n-Hexano	2	153,6
n-Hexano:AcOET(9:1)	2	39,2
n-Hexano:AcOET(8:2)	2	68,2
n-Hexano:AcOET(7:3)	2	17,7
n-Hexano:AcOET(1:1)	2	10,5
AcOET	2	6,3
MeOH	2	3,9

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa. A fração n-hexano:acetato de etila 8:2 (68,2 g) foi submetida novamente à cromatografia em coluna sob pressão reduzida empregando-se uma coluna de 25 cm de altura e 14,5 cm de diâmetro, empacotada com 720 g de sílica gel 60H Merck (0,063 – 0,200 mm). A fração foi previamente incorporada à sílica gel 60 Acros Organics (0,060-0,200 mm). A amostra foi eluída por gradiente, tendo as proporções, volumes e massas, apresentados na Tabela 3, página 29.

Tabela 3. Cromatografia em coluna sob pressão reduzida da fração n-hexano:acetato de etila 8:2.

<i>Eluentes</i>	<i>Volume (L)</i>	<i>Massa (g)</i>
n-Hexano	1	6,4
n-Hexano:AcOET(24:1)	1	22,6
n-Hexano:AcOET(23:2)	1	13,9
n-Hexano:AcOET(22:3)	1	5,6
n-Hexano:AcOET(21:4)	1	1,5
n-Hexano:AcOET(4:1)	1	1,5
AcOET	1	2,2
MeOH	1	5,1

As frações 24:1 e 23:2 n-hexano:acetato de etila foram selecionadas após análise por CCDC para a continuidade do processo de isolamento e 0,85 g da fração 24:1 foram submetidas a uma cromatografia em coluna clássica utilizando sílica gel 60 Acros Organics (0,060-0,200 mm) impregnada com nitrato de prata empregando-se uma coluna de 45 cm de altura e 3 cm de largura. A impregnação do adsorvente com nitrato de prata foi realizada de acordo com Andreão et al., 2010. Pesaram-se 120 g de sílica gel 60 Acros Organics (0,060-0,200 mm), num béquer, revestido com papel alumínio. Em seguida, em outro béquer revestido também com papel alumínio foram pesados 13 g de nitrato de prata (Cennabrás). O nitrato de prata foi solubilizado em 50 ml de água destilada e verteu-se a solução na sílica, misturando com bastão de vidro. Por fim cobriu-se o béquer com duas camadas de papel alumínio furado e o mesmo permaneceu em estufa a 75 °C por três dias para a ativação da sílica.

Após ativação, empacotou-se a coluna numa capela com pouca luminosidade, usando lâmpada amarela no ambiente e por fim revestiu-se a coluna com papel alumínio. A eluição da coluna foi realizada com 100% de n-hexano. Foram coletadas frações de 5 mL (Tabela 4) e para monitoramento das frações foram realizadas cromatografias em camada delgada comparativa e algumas frações foram também analisada por CLAE-CAD.

Tabela 4. Cromatografia em coluna clássica com sílica impregnada com nitrato de prata da fração n-hexano: acetato de etila (24:1).

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>
Fração 1	102,0
Fração 2	24,0
Fração 3	45,5
Fração 4	4,5
Fração 5	79,0
Fração 6	241,0

4,8 g da fração 23:2 foram submetidas à cromatografia em coluna clássica (Tabela 5) empregando-se uma coluna de 45 cm de altura e 3 cm de largura, empacotada com sílica gel 60 Acros Organics (0,060-0,200 mm). Utilizou-se fase móvel isocrática 98% de n-hexano e 2% de acetato de etila. A fração foi previamente incorporada à mesma sílica. Posteriormente, as frações obtidas foram submetidas às análises por cromatografia em camada delgada comparativa.

Tabela 5. Cromatografia em coluna clássica da fração n-hexano: acetato de etila (23:2).

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>
Fração 1	363,5
Fração 2	26,2
Fração 3	59,0
Fração 4	1179,0
Fração 5	309,4
Fração 6	491,8

A fração 4 da coluna clássica (Tabela 5) e a fração 3 da coluna de nitrato de prata (Tabela 4) permaneceram no dessecador por 24 horas e então foram enviadas para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . Os espectros (RMN ^1H , 500 MHz) e (RMN ^{13}C , 125 MHz) foram obtidos em clorofórmio deuterado em espectrômetro Bruker® DRX-500, no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O fluxograma do isolamento do ácido copálico está apresentado na Figura 17.

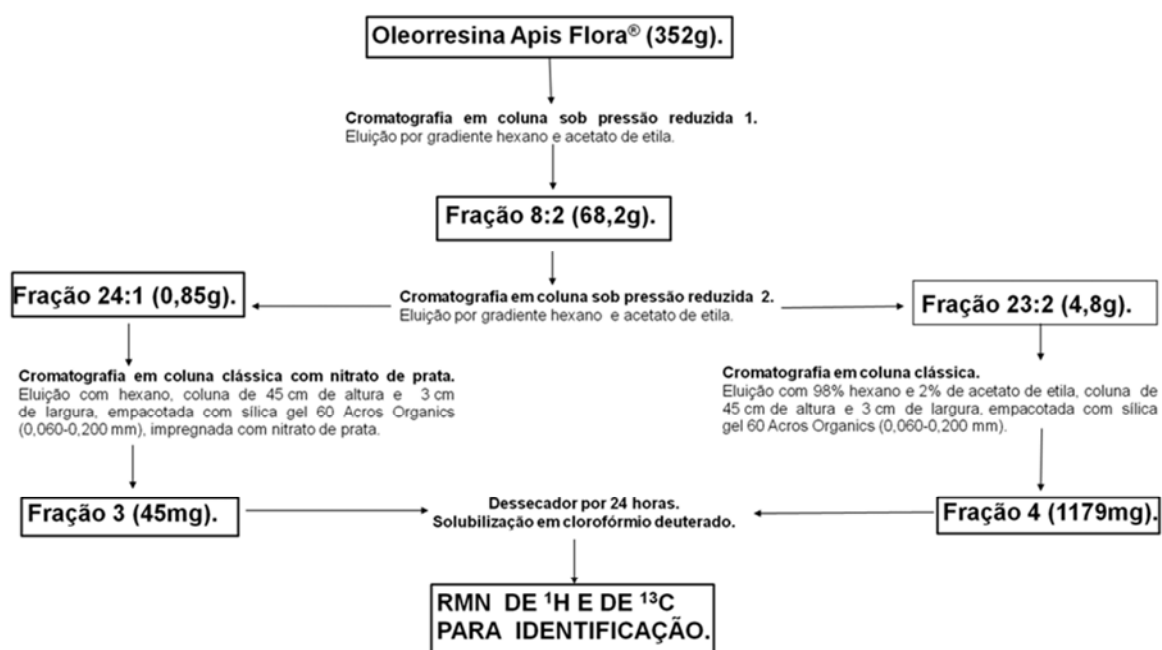


Figura 17. Fluxograma do isolamento do ácido copálico do oleorresina de *Copaifera* sp.

3.4 Meios de cultura utilizados

Foram utilizados meios sólidos e líquidos. As descrições encontram-se abaixo:

a. Meios sólidos:

- Extrato de Malte: 2,0% de extrato de malte (Himedia), 2,0% de glicose (Synth), 0,1% de peptona (Himedia), 1,8% de ágar (Himedia);
- Ágar MRS: 6,715% de Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid),
- Ágar MH: 2,1% de Ágar Mueller Hinton (Himedia); 1,8% de ágar (Himedia);

b. Meios líquidos:

- Caldo MRS: 5,2% de Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (Oxoid);
- Caldo MH: 2,1 % de Caldo Mueller Hinton (Himedia);
- Koch's K1: 0,18% de glicose (Synth), 0,06% de peptona (Himedia) e 0,04% de extrato de levedura (Himedia);
- Jackson et al. (1993): 0,25% de pó de milho (Veranita), 1,0% de glicose (Synth), 1,0% de farinha de aveia (Quaker), 4,0% de pasta de tomate (Quero), 1,0% de CaCl₂. 2H₂O (Vetec) e 10,0 mL/L da solução com traços de elementos (0,1% de FeSO₄. 7H₂O (Vetec), 0,1% de MnCl₂. 4H₂O (Vetec), 0,0025% de CuCl₂. 2H₂O (Vetec), 0,01% de CaCl₂. 2H₂O (Vetec), 0,056% de H₃BO₃ (Vetec), 0,0019% de (NH₄)₆.MoO₂. 4H₂O (Vetec) e 0,02% de ZnSO₄. 7H₂O (Vetec);

Todos os meios de cultura foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 minutos antes do uso.

3.5 Micro-organismos

O fungo filamentoso *Mucor rouxii* NRRL 1894, gentilmente cedido pelo Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, ARS, USDA, Peoria, IL, USA), pertence à coleção mantida no Departamento de Biologia

da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e foi avaliado quanto à capacidade de biotransformar o ácido copálico. O fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) foi adquirido da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Culturas provenientes da CHR Hansen, a qual fornece às indústrias alimentícias culturas de micro-organismos para a produção de alimentos funcionais probióticos, também foram utilizadas incluindo cultura láctica que contém *Lactobacillus acidophilus* (FERM FD DVS LA-5[®] - Probio-Tec[™]), cultura láctica que contém *Bifidobacterium* (FERM FD DVS BB 12[®] - Probio-Tec[™]) e cultura láctica de cepas mistas que contém *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *Thermophilus* (FERM F DVS ABT-4). A linhagem de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi adquirida da ATCC.

3.6 Manutenção dos fungos filamentosos e das bactérias do trato gastrointestinal

A manutenção das culturas puras dos fungos filamentosos (*Mucor rouxii* e *Aspergillus brasiliensis*) foi realizada em partículas de sílica gel (14 a 20 mesh). Para isto, inicialmente, o fungo foi repicado e cultivado em condições adequadas para a produção de esporos (item 3.7). Posteriormente, 3 mL de solução de leite em pó desnatado (7,5% de pó em água destilada), previamente esterilizada, foram adicionadas às superfícies das culturas para obtenção das suspensões de esporos. O volume de 1 mL de cada suspensão preparada foi adicionado em tubos de ensaio contendo sílica gel previamente esterilizada. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por uma hora e, posteriormente, foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos antes de serem estocados a 4°C.

As culturas das bactérias probióticas foram mantidas congeladas em caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid), acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%) contendo 40% v/v de glicerol. A linhagem de *Escherichia coli* foi mantida congelada em caldo triptona de soja contendo 40% v/v de glicerol.

3.7 Produção de esporos e biomassa pelos fungos *Mucor rouxii* e *Aspergillus brasiliensis*

Os fungos filamentosos *Mucor rouxii* e *Aspergillus brasiliensis* foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura extrato de malte por 7 dias a 30°C. Após o término do período de incubação, foram adicionados 5 mL de solução aquosa de Tween 80 a 2 % em cada tubo. O número de esporos (4×10^6 /mL) foi estimado através de contagem dos esporos em câmara de Neubauer e em seguida foram inoculados em 15 mL de meio pré-fermentativo, descrito por Jackson et al. (1993). As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyers sob agitação constante de 120 rpm, a 30°C por 48 horas (*Mucor rouxii*) e 24 horas (*Aspergillus brasiliensis*).

3.8 Determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido copálico

Com o intuito de evitar possíveis efeitos tóxicos da substância a ser biotransformada sobre as linhagens avaliadas, foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do ácido copálico frente aos micro-organismos utilizados, pelo método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006 e 2007), com adaptações.

Os micro-organismos foram cultivados previamente em meio sólido. Os fungos *Mucor rouxii* e *Aspergillus brasiliensis* foram repicados em tubos contendo meio extrato de malte e as bactérias probióticas e a cultura mista, em placas contendo ágar MRS suplementado com l-cisteína/HCl(0,05%) 33,33% m/m de glicose. A bactéria *Bifidobacterium* sp cresceu nas mesmas condições que as anteriores, sem a necessidade de glicose. O repique da bactéria *E. coli* foi feito em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH). As culturas desenvolvidas foram utilizadas para a preparação dos inóculos.

Os inóculos foram de 10^7 UFC/mL para bactérias e de 4×10^6 esporos/mL para os fungos.

Para o teste utilizaram-se concentrações entre 400 e 0,195 µg/mL de ácido copálico no meio de cultura. Uma solução de ácido copálico (1mg) em 125 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizada como solução mãe após adição de meio de cultura. Numa placa de 96 poços foram realizadas diluições seriadas e por fim foram adicionados 20 µL de inóculo.

Foram realizados controles de:

- Esterilidade dos meios de cultivo.
- Crescimento do inóculo (5 % de DMSO).
- Esterilidade do ácido copálico.
- Viabilidade do inóculo.
- Controles positivos (miconazol para os fungos, penicilina para as bactérias probióticas e estreptomicina para a bactéria *E. coli*).

Para revelação das placas inoculadas com bactérias utilizou-se solução aquosa de resazurina (40 µL/poço) a 0,02%.

3.9 Biotransformação do ácido copálico

As massas miceliais obtidas das duas culturas fúngicas desenvolvidas no meio pré-fermentativo (item 3.7) foram transferidas para 30 mL de meio Koch's K1.

Adicionou-se então 0,1g/L de ácido copálico no meio de cultura previamente solubilizado em DMSO (3 mg/300 µL). A cultura contendo ácido copálico, bem como as culturas controles com o meio de cultura inoculado, sem a substância a ser biotransformada e com o meio de cultura não inoculado contendo a substância, foram desenvolvidas a 30°C, sob agitação constante de 120 rpm, por 168 horas, sendo que 1 Erleymeyer controle e 1 Erleymeyer da biotransformação foram retirados nos tempos 6 horas, 12 horas (*Aspergillus brasiliensis*) e a cada 24 horas visando o monitoramento do processo.

Os processos de biotransformação realizados com as bactérias do trato gastrointestinal foram desenvolvidos em câmara de anaerobiose, em atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio, na temperatura controlada de 37°C. As culturas foram inicialmente ativadas em caldo DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid), acrescido de L-cisteína/HCl (0,05%), sendo adicionados 33,3% m/m de glicose nos meios de cultivo destinados à cultura láctica contendo *Lactobacillus*

acidophilus e à cultura láctica mista, para favorecimento do crescimento (GODERSKA et al., 2008). As culturas permaneceram no caldo durante 24 horas, sendo posteriormente inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS e cultivadas por 36 horas a 37°C. A bactéria *E. coli* foi reativada em caldo Mueller Hinton (MH) tanto para o cultivo em câmara de anaerobiose como para o cultivo em condições aeróbias em estufa, ambos a 37°C. Após 24 horas nessas condições as culturas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MH e incubadas nas condições anaeróbia ou aeróbia, sendo cultivadas por mais 24 horas. Posteriormente, inóculos de 10⁶ UFC/mL foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo MRS ou MH (*E.coli*). O inóculo foi preparado usando o método de turbidimetria em espectrofotômetro a 625 nm e o tempo de cultivo foi determinado pela curva de crescimento das bactérias escolhendo o início da fase estacionária (12 horas para *E.coli* e *Lactobacillus acidophilus*, 18 horas para a cultura mista e 32 horas para *Bifidobacterium* sp). As bactérias foram cultivadas sob agitação, com auxílio de barra magnética, até atingirem a fase estacionária, sendo então adicionado o ácido copálico. Os processos foram avaliados após 24 horas de incubação.

Controles das culturas bacterianas contendo 3,33% de DMSO e dos meios de cultura não inoculados contendo 0,1 g/L de ácido copálico, solubilizado em DMSO, foram conduzidos em paralelo.

3.10 Obtenção dos extratos com solvente orgânico

Após o período de incubação, as culturas provenientes dos processos desenvolvidos com os fungos foram filtradas à vácuo e os filtrados obtidos foram submetidos a partição líquido-líquido com 10 mL de acetato de etila (repetiu-se o procedimento 3 vezes). O micélio foi congelado por um dia, macerado e submetido a extração com acetato de etila.

As culturas provenientes dos processos desenvolvidos com as bactérias foram centrifugadas durante três minutos a 4000 rpm sob refrigeração de 15°C. Posteriormente, os caldos foram submetidos também a partição líquido-líquido com 10 mL de acetato de etila (repetiu-se o procedimento 3 vezes).

Após o processo extrativo, os solventes foram evaporados à vácuo até a *secura*.

3.11 Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H , 500 MHz)

Para a realização das análises qualitativas dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizou-se o detector CAD da Thermo Scientific® e o detector UV/VIS da Shimadzu®. Utilizou-se uma coluna Waters, modelo sunfire C-18 (4,6 mm x 100 mm, diâmetro de partículas de 5 μm) e para a proteção da coluna analítica foi empregada uma pré-coluna analítica com as mesmas especificações. Extratos preparados a partir dos meios de cultura não inoculados foram também analisados.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: sistema de eluição por gradiente, iniciando com acetonitrila:água (4:6), passando para 100% de acetonitrila em 50 minutos, mantendo essa condição por 5 minutos e retornando a condição inicial após 5 minutos; vazão de 1,0 mL/min. Os extratos foram solubilizados na fase móvel inicial de modo a obter-se uma concentração de 1 mg/mL. Foram injetados 30 μL de cada extrato.

3.12 Isolamento e determinação estrutural dos produtos de biotransformação

A partir da cultura do fungo *Mucor rouxii* contendo 145 mg de ácido copálico incubada por cinco dias foram obtidos 196 mg de extrato em acetato de etila. Para isolamento dos produtos de biotransformação produzidos pelo fungo *Mucor rouxii* foi realizada CLAE-UV/VIS em escala semi-preparativa utilizando uma coluna Waters, modelo sunfire C-18 (10 mm x 100 mm, diâmetro de partículas de 5 μm).

A amostra foi então diluída na fase móvel inicial numa concentração de 23,4 mg/mL e foram retiradas alíquotas desta solução diluindo-se para a concentração de 4,7 mg/mL. Por fim a amostra foi centrifugada, filtrada e injetada (300 μL) (Figura18).

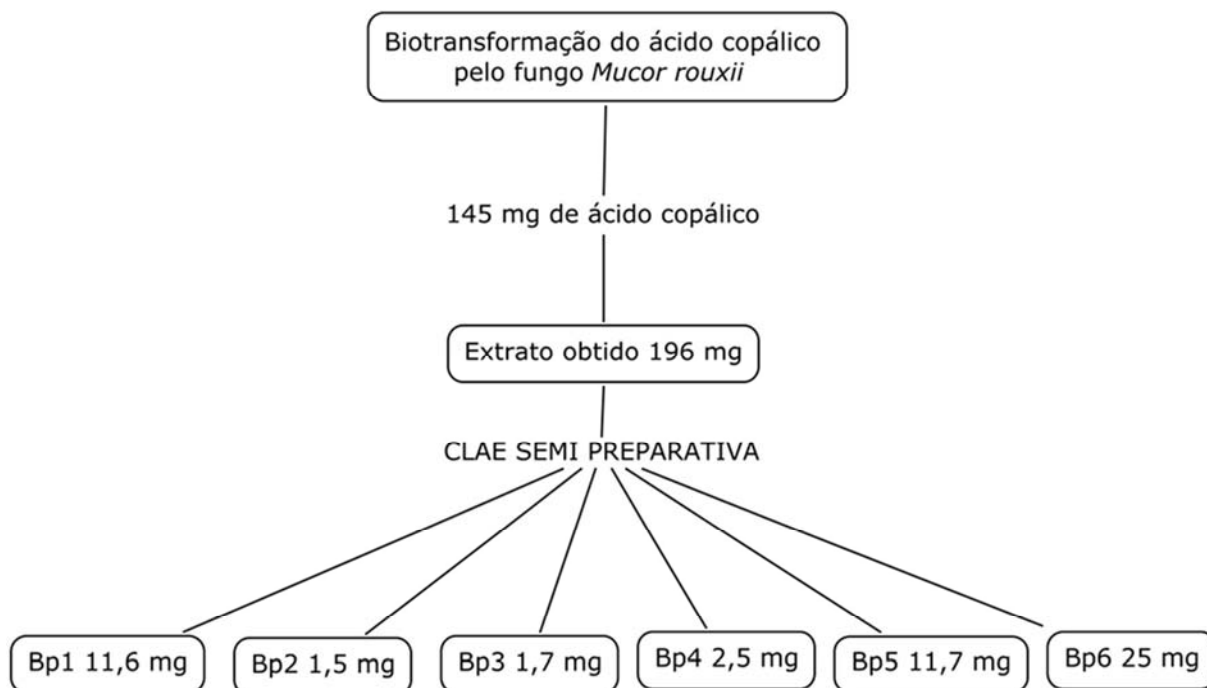


Figura 18. Fluxograma da biotransformação e isolamento dos produtos de biotransformação do ácido copálico.

Como fase móvel utilizou-se uma gradiente iniciado numa proporção de 35% de ACN em água chegando-se em 45% de ACN em 18 minutos e após um minuto em 100% de ACN, mantendo-se por 4 minutos nesta condição e retornando para a condição inicial em 3 minutos. Os comprimentos de onda de 200 e 210 nm foram selecionados para as análises. Os códigos das substâncias isoladas da biotransformação e suas respectivas massas estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Produtos de biotransformação e suas massas.

Frações	Massa (mg)
Bp1	11,6
Bp2	1,5
Bp3	1,7
Bp4	2,5
Bp5	11,7
Bp6	25,0

Para identificação, as substâncias foram submetidas às análises de RMN de ^1H , 500 MHz, RMN de ^{13}C , 125 MHz em metanol deuterado em espectrômetro Bruker® DRX-500, no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde também foram obtidos os mapas de contornos HMQC e HMBC.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises dos oleorresinas

Foram analisados oleorresinas de diferentes procedências, tanto comercial como extraídas diretamente das árvores, cujas espécies foram identificadas tendo como objetivo avaliar a composição química e selecionar o oleorresina com maior teor de ácido copálico.

As análises foram realizadas em dois cromatógrafos diferentes com detectores também diferentes utilizando dois sistemas de eluição. Ao analisar os perfis dos oleorresinas (Figuras 19 e 20, páginas 40 e 41, respectivamente), constata-se uma diferença já esperada entre eles devido à influência de vários fatores: sazonalidade, solo, clima, diferenças entre espécies, entre outras. Porém, o que chama a atenção é o oleorresina comercial que apresenta um perfil mais complexo do que os oleorresinas obtidos diretamente das espécies identificadas. Esse fato pode ser indicativo de que a amostra comercial é constituída de oleorresinas de diferentes espécies. Nas análises realizadas por CLAE-CAD não são detectados sesquiterpenos e monoterpenos, pois o detector CAD, não possibilita a detecção de substâncias com pressão de vapor maior que 10^{-4} .

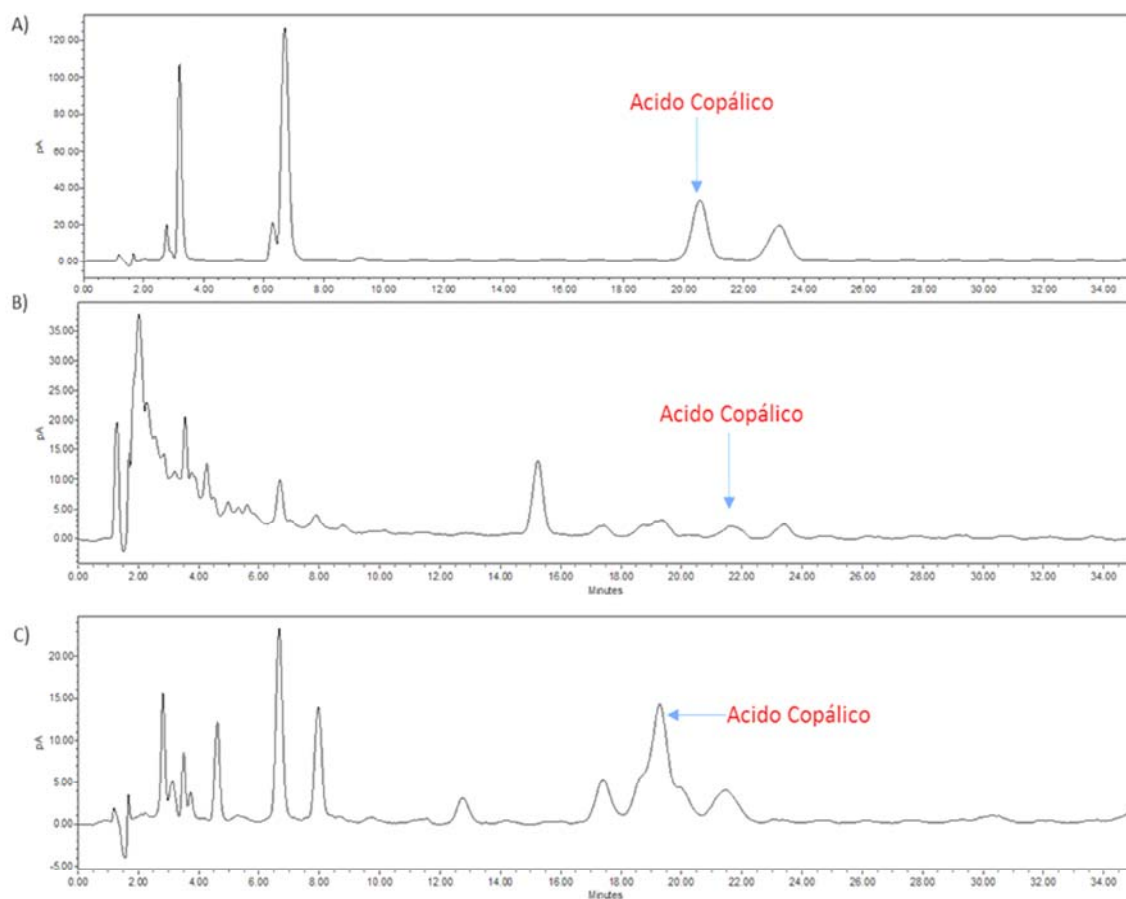


Figura 19. Cromatogramas de oleorresinas de espécies identificadas e de oleorresina comercial, obtidos com detector CAD. O cromatograma A refere-se ao oleorresina coletado da espécie *Copaifera reticulada Duckei*, o cromatograma B refere-se ao oleorresina extraído da espécie *Copaifera langsdorffii*, o cromatograma C refere-se a amostra de oleorresina comercial (lote 0790111).

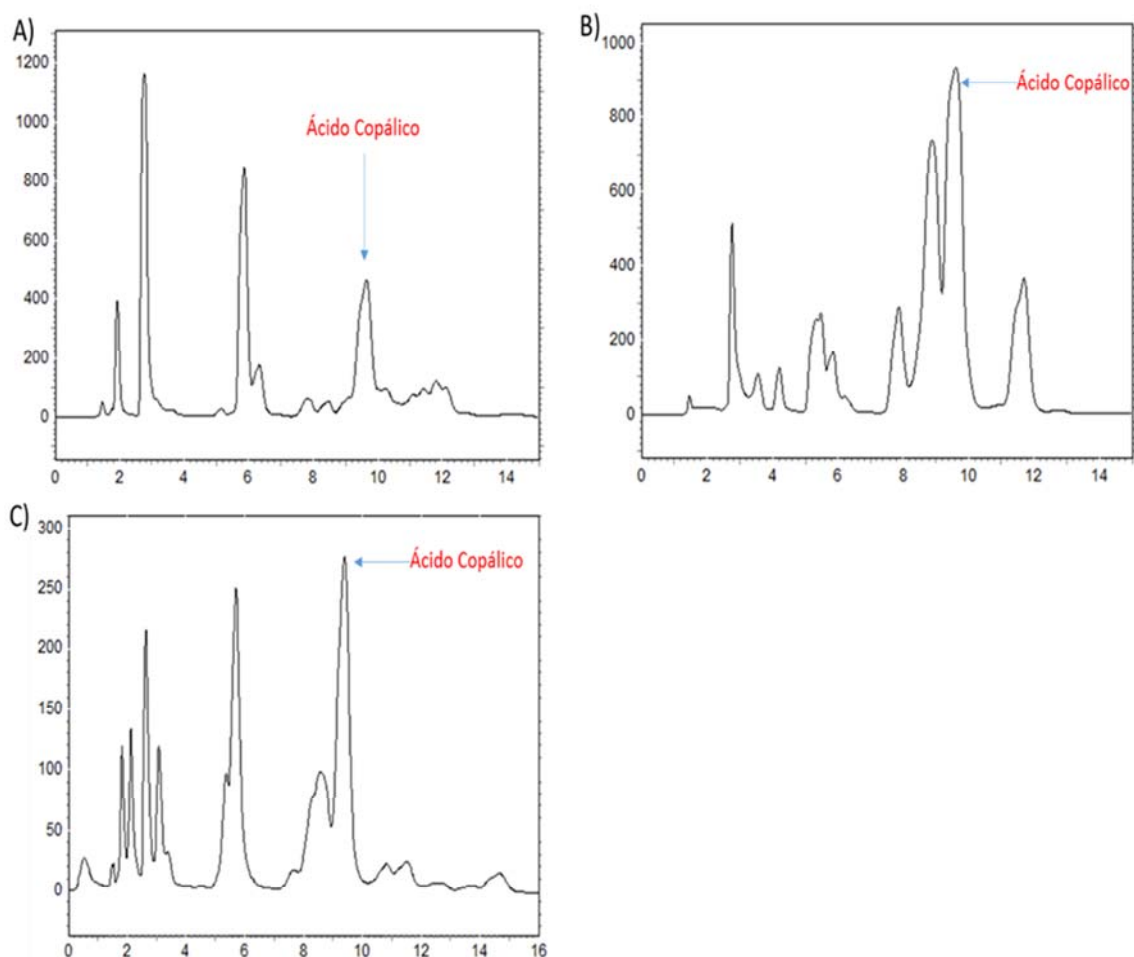


Figura 20. Cromatogramas de oleorresinas de espécies identificadas e de oleorresina comercial utilizado na extração do ácido copálico, obtidos com detector DAD. O cromatograma A refere-se ao oleorresina coletado da espécie *Copaifera reticulada Duckei*, o cromatograma B refere-se ao oleorresina extraído da espécie *Copaifera langsdorffii*, o cromatograma C refere-se à amostra do oleorresina comercial (lote 0790111).

4.2 Extração do ácido copálico

Devido à complexidade do oleorresina selecionado (cromatograma C Figura 19, página 40), foram necessárias várias etapas para purificação. O primeiro processo foi a cromatografia em coluna sob pressão reduzida. Nessa etapa visou-se separar os constituintes da amostra retirando-se os compostos polares, os sesquiterpenos e os monoterpenos. Foi observado que a fração com maior massa foi a fração n-hexânica, o que era de se esperar, pois essa fração contém os compostos voláteis como sesquiterpenos e monoterpenos. A fração n-hexano:acetato de etila 8:2 obtida no primeiro processo cromatográfico realizado com o oleorresina (Tabela 2 página 28, Figuras 21 e 22, páginas 42 e 43), contém ácido copálico e corresponde a cerca de 30% do oleorresina. Pode-se observar na Figura 22, página 43, que a fração n-hexano:acetato de etila 7:3 também apresenta-se menos complexa do que a fração n-hexano:acetato de etila 9:1, a qual também contém ácido copálico (componente de Rf 0,44, destacado na mesma figura). Deve-se salientar que nos cromatogramas existem alguns picos que não são detectados no detector de arranjo de diodos (DAD). Isso ressalta a importância de se utilizar várias técnicas de análise no isolamento de substâncias oriundas de matrizes complexas como extratos de planta e oleorresinas.

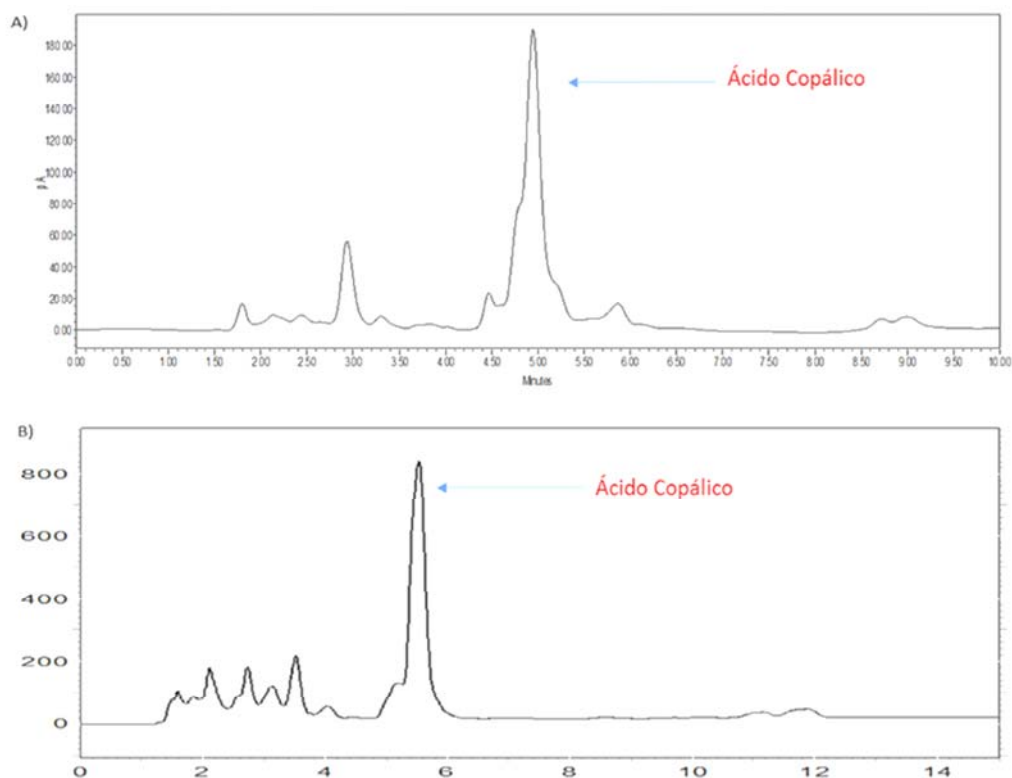


Figura 21. Cromatogramas da fração n-hexano:acetato de etila 8:2 obtidos com detectores diferentes CAD (A) e DAD (B).

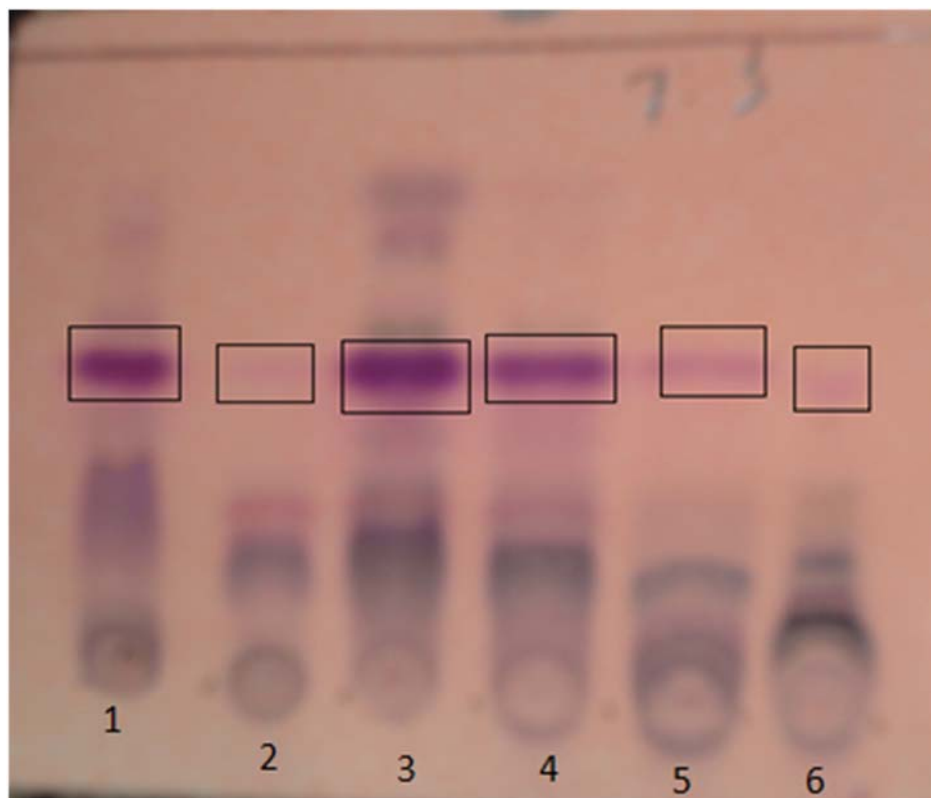


Figura 22. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas do oleorresina após a primeira cromatografia por coluna sob pressão reduzida. 1: fração rica em ácido copálico; 2: fração hexano:acetato de etila 1:1; 3: fração hexano:acetato de etila 9:1; 4: fração hexano: acetato de etila 8:2; 5: fração hexano:acetato de etila 7:3; 6: fração acetato de etila.

A segunda cromatografia por coluna sob pressão reduzida foi realizada com um sistema de eluição diferente. Nessa etapa o ácido copálico foi detectado na segunda e na terceira fração.

Como observado nos cromatogramas (Figura 23, página 44), as complexidades são semelhantes, porém as duas amostras não foram reunidas. Foram submetidas a uma purificação específica para cada uma delas devido à complexidade das substâncias que estão acompanhando o ácido copálico. Na primeira, devido ao formato do pico (indicando haver mais de um composto junto com o ácido copálico) optou-se por fazer uma coluna clássica com sílica impregnada com nitrato de prata. A opção dessa técnica foi devida a sua seletividade em separar isômeros de diterpenos que possuem ligações duplas e grupos oxigenados (ANDREÃO et al., 2010). A segunda amostra por ter um perfil melhor na região do ácido copálico foi purificada em uma coluna clássica com sílica gel.

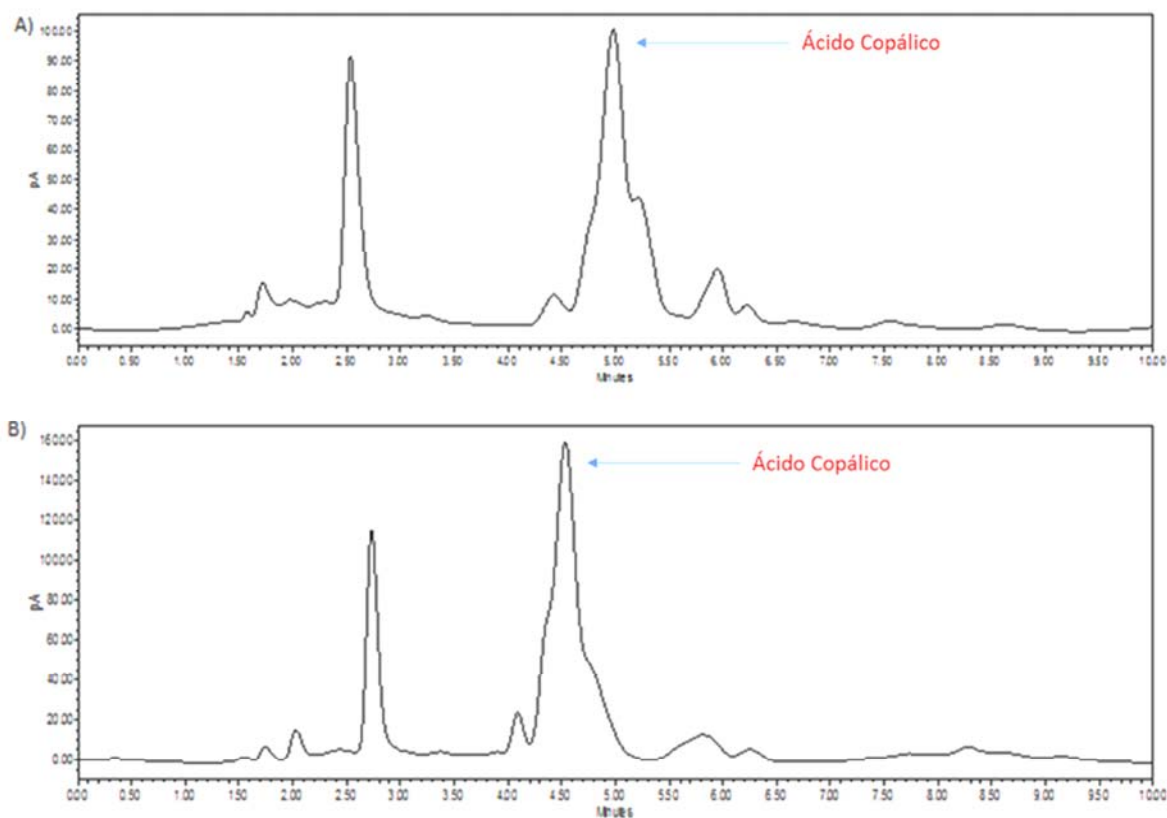


Figura 23. Cromatogramas das frações 2 e 3 respectivamente, obtidos por CLAE-CAD.

A coluna clássica apresentou-se como uma ótima alternativa para purificação dessa amostra (Figura 24). A eluição da coluna foi realizada com o sistema n-hexano:acetato de etila 98:2, obtendo-se 430 frações e em torno de 25% de ácido copálico por coluna.

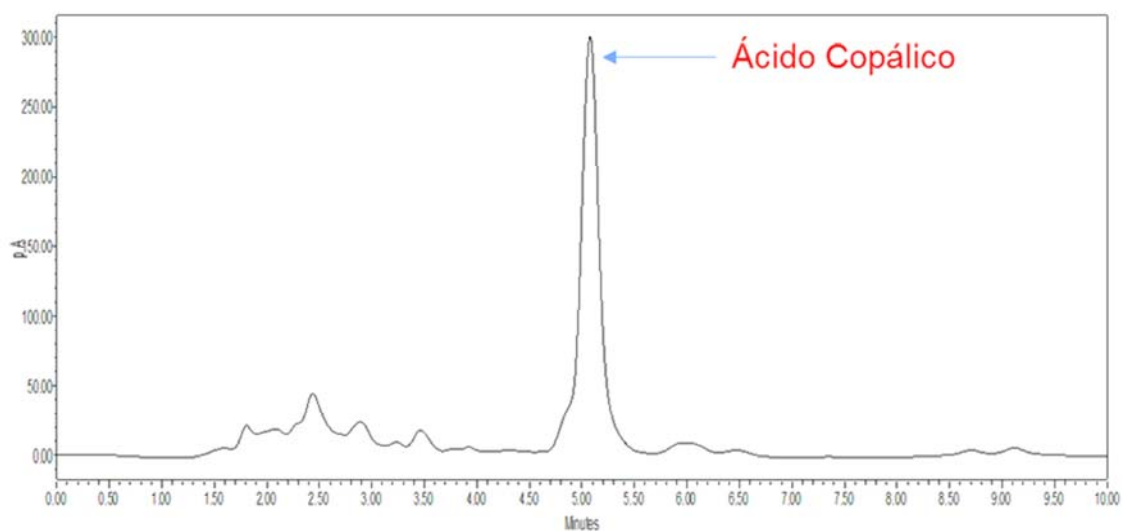


Figura 24. Cromatograma da fração 4 obtida da coluna clássica.

O processo cromatográfico em coluna de sílica impregnada com nitrato de prata foi mais rápido, sendo necessário em torno de 100 frações para purificação. Apesar de obter-se em torno de 5% de ácido copálico o diterpeno obtido apresentou menor teor de impurezas (Figura 25 e Figura 26).

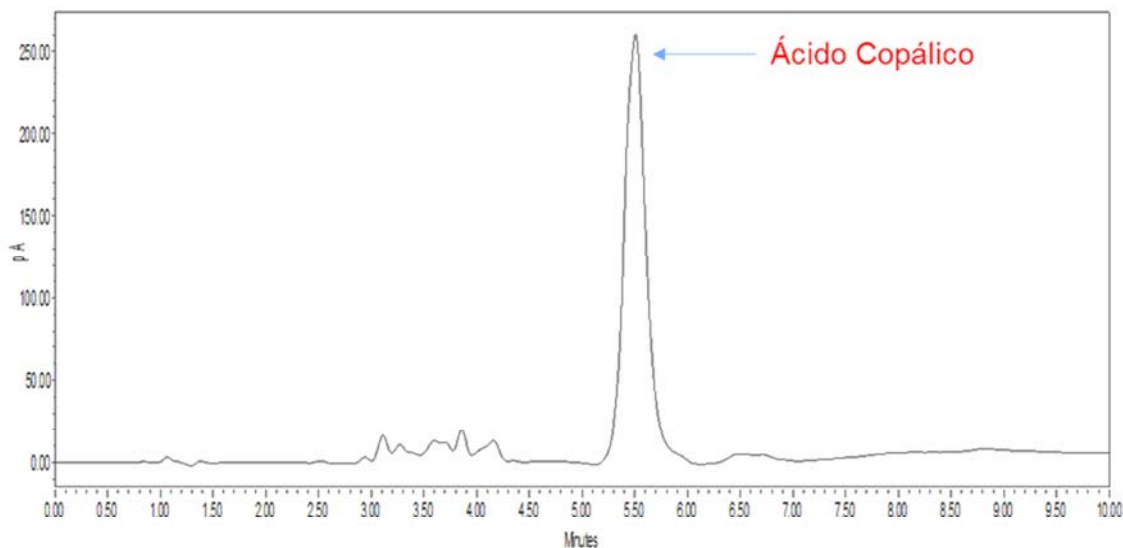


Figura 25. Cromatograma da fração 3 obtida da coluna de sílica impregnada de nitrato de prata.

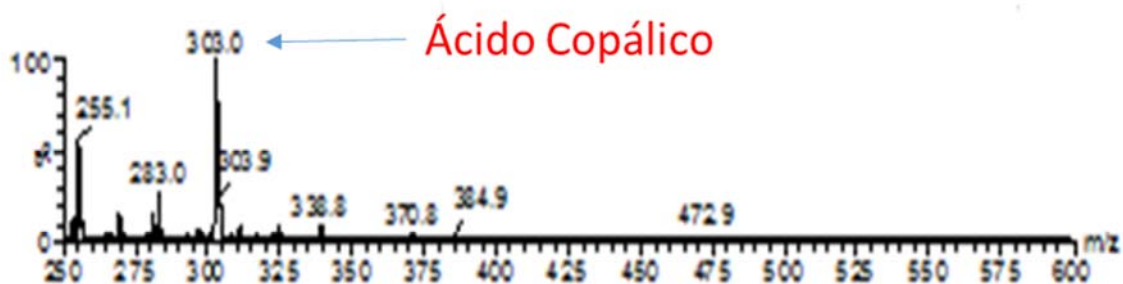


Figura 26. Espectro de massa da fração obtida na coluna de sílica impregnada de nitrato de prata.

Como mencionado anteriormente, o ácido copálico foi identificado com base nas análises de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C . Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 27 e 28 (páginas, 46 e 47).

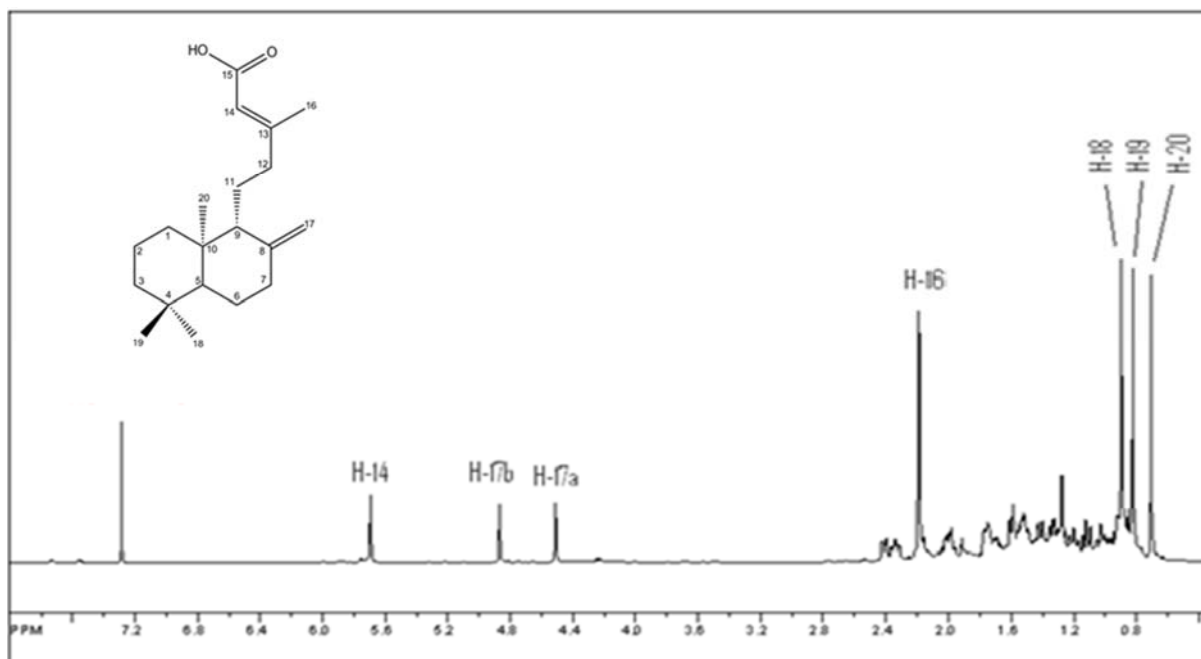


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do ácido copálico (CDCl_3 , 500 MHz).

No espectro de RMN de ^1H desse diterpeno é possível verificar a presença de três sinais (s, integrados para 1H cada) em δ 5,67, 4,48 e 4,84 atribuídos aos hidrogênios H-14, H-17a e H-17b respectivamente. Esses sinais são característicos de diterpenos do tipo labdano comumente encontrados no oleorresina de plantas do gênero *Copaifera* (VEIGA JR. e PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004; VEIGA JR. et al., 2007). Nesse espectro, observa-se também em δ 0,68, 0,79, 0,86 e 2,16 a existência de 4 sinais (s, integrados para 3H cada) que foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das metilas H-20, H-19, H-18 e H-16. O deslocamento paramagnético observado para a metila H-16 em relação às demais, deve-se ao fato desta estar ligada a um carbono do tipo sp^2 .

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se a presença de 19 sinais, destacando-se a presença de um carbono carbonílico (δ 172,3; C-15) e dos carbonos olefínicos em δ 106,5, 114,9, 148,4 e 164,4, referentes aos carbonos C-17, C-14, C-8 e C-13 respectivamente. Podem-se observar também os sinais referentes aos carbonos quaternários, metílicos, metilênicos e metínicos presentes nesta substância. As atribuições referentes aos átomos de hidrogênios e carbonos encontram-se respectivamente nas Tabelas 7 e 8 (páginas 47 e 48).

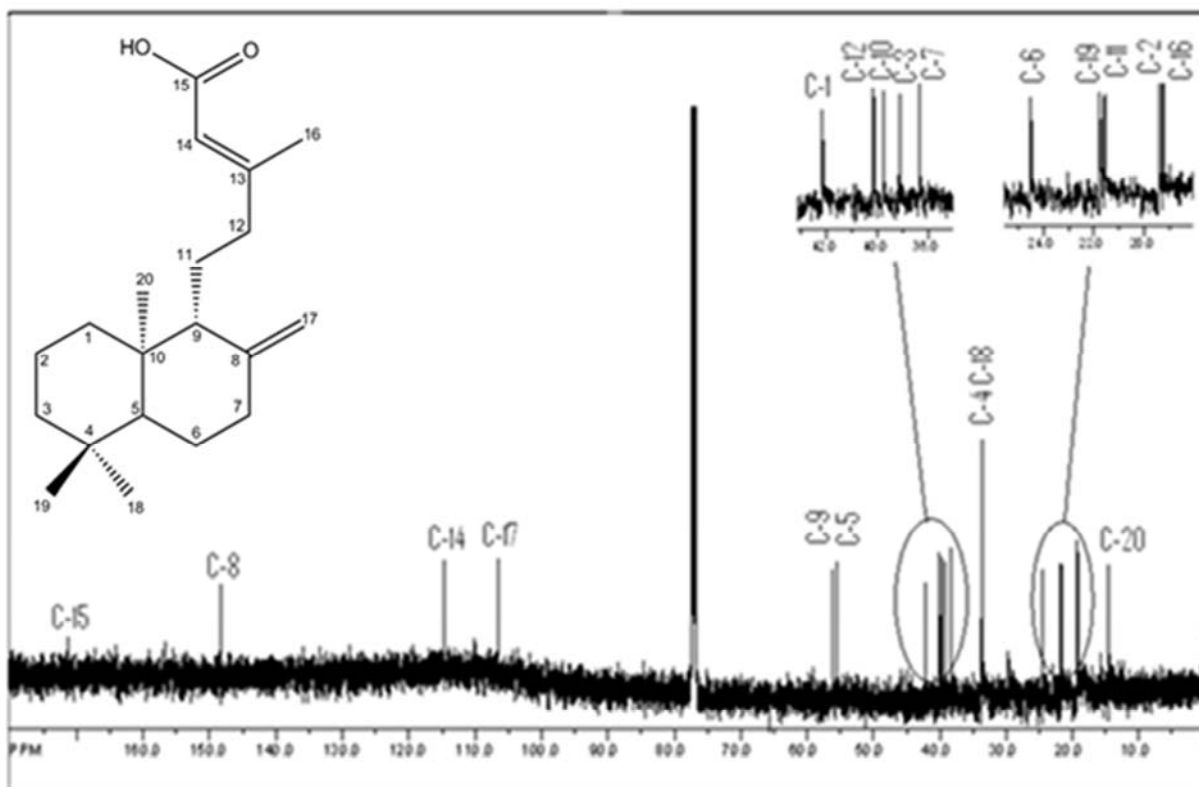


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido copálico (CDCl_3 , 125 MHz).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H do ácido copálico (500 MHz, CDCl_3).

Hidrogênio	Ácido copálico (FUJII et al., 2009)	Ácido copálico isolado
H-14	5,67 d (1,0 Hz, 1H)	5,67 sl
H-16	2,17 d (1,0 Hz, 3H)	2,16 s
H-17a	4,50 s	4,48 sl
H-17b	4,85 d (1,0 Hz, 1H)	4,84 sl
H-18	0,88 s	0,86 s
H-19	0,80 s	0,79 s
H-20	0,69 s	0,68 s

Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C do ácido copálico (125 MHz, CDCl_3).

Carbono	Ácido copálico (FUJII et al., 2009)	Ácido copálico isolado
1	42,0	42,2
2	19,3	19,5
3	39,0	39,1
4	33,5	33,7
5	55,4	55,4
6	24,4	24,5
7	38,2	38,4
8	148,2	148,4
9	56,1	56,2
10	39,6	39,8
11	21,4	21,6
12	40,0	40,1
13	163,8	164,4
14	114,8	114,9
15	172,0	172,3
16	19,1	19,4
17	106,3	106,5
18	33,5	33,7
19	21,6	21,8
20	14,4	14,6

4.3 Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido copálico.

Os valores de CIM do ácido copálico frente aos micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação estão apresentados na Tabela 9:

Tabela 9. Valores de CIM do ácido copálico frente aos micro-organismos avaliados.

Micro-organismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Mucor rouxii</i>	>400
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	>400
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	200
<i>Bifidobacterium</i> sp	200
Cultura mista	200
<i>E. coli</i>	200

Os resultados obtidos propiciaram determinar a quantidade de ácido copálico a ser adicionada nas culturas dos diferentes micro-organismos sem causar interferência no desenvolvimento dos mesmos. Assim ao comparar-se a concentração (100 µg/mL) de substâncias utilizadas em nosso laboratório para a realização das biotransformações com as CIM obtidas (200 à 400 µg/mL), certificamos que a concentração de ácido copálico utilizada no estudo foi adequada.

4.4 Biotransformação do ácido copálico pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*

O processo de biotransformação foi monitorado durante sete dias de incubação e retirou-se um frasco controle e um frasco de biotransformação a partir de 6 horas de cultivo. Em 6 horas não havia mais sinal do ácido copálico no extrato obtido da cultura e então foi analisado também o extrato obtido do micélio, sendo detectado neste extrato (Figura 29). O ácido copálico foi detectado no extrato do micélio até o sexto dia de incubação.

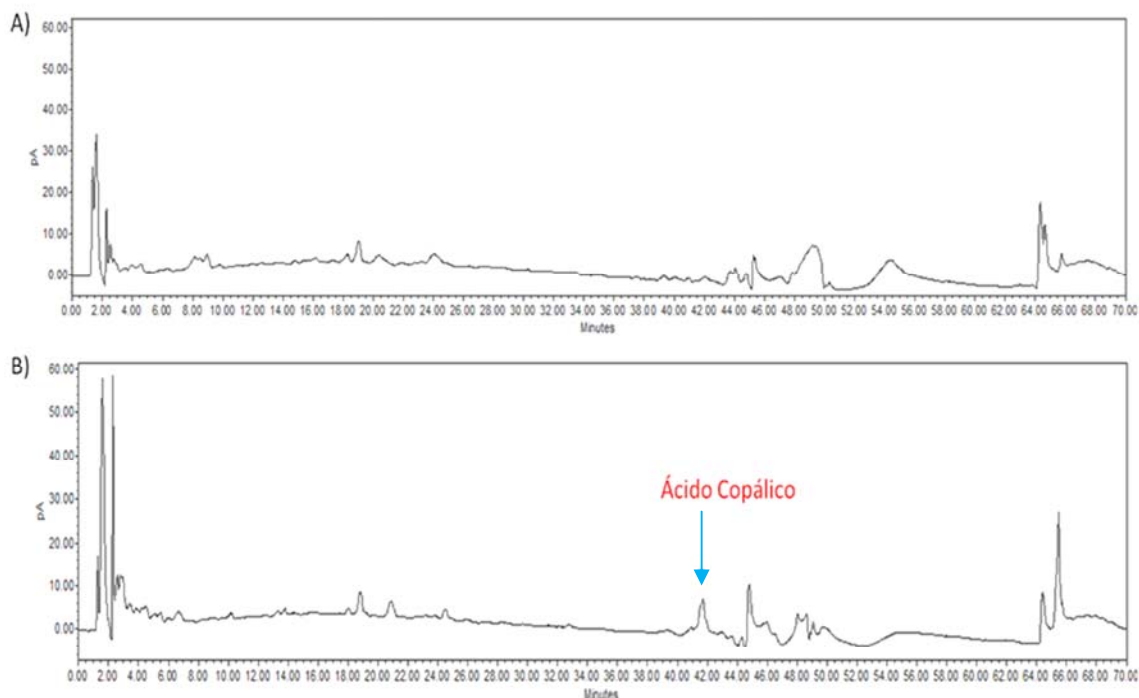


Figura 29. Comparação dos cromatogramas do controle do micélio do dia 6(A) com o cromatograma do micélio da biotransformação do dia 6(B).

Analisando os cromatogramas dos extratos obtidos dos controles com os extratos obtidos das biotransformações pôde-se observar a presença de vários compostos nos extratos de biotransformação, mas em baixas intensidades, sugerindo estarem em baixas concentrações. O melhor tempo para a biotransformação foi o sétimo dia, mas ainda assim as intensidades permaneceram muito baixas (Figura 30).

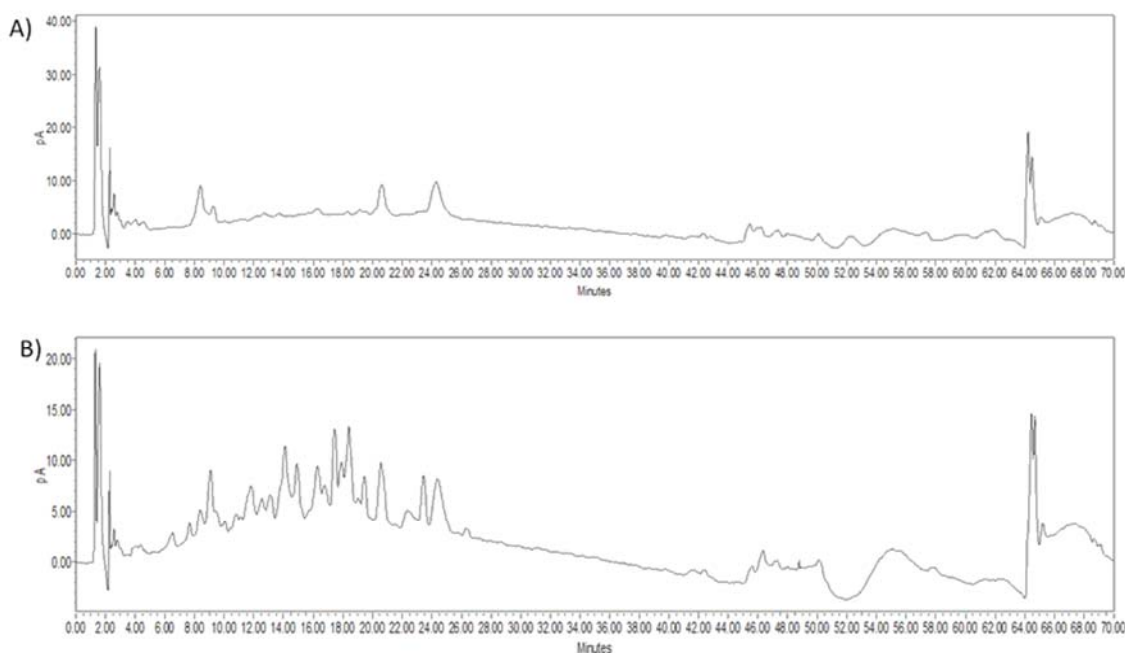


Figura 30. Comparação dos cromatogramas do controle do dia 7(A) e da biotransformação do dia 7(B).

4.5 Biotransformação do ácido copálico pelo fungo *Mucor rouxii*

O processo de biotransformação foi monitorado durante sete dias de incubação iniciando-se também a retirada dos Erlenmeyers dos controles e das biotransformações a partir de 6 horas de cultivo. O micélio foi analisado e não foi detectada a presença de ácido copálico, o qual ainda foi detectado no extrato do caldo da cultura incubada por 24 horas (Figura 31, página 51).

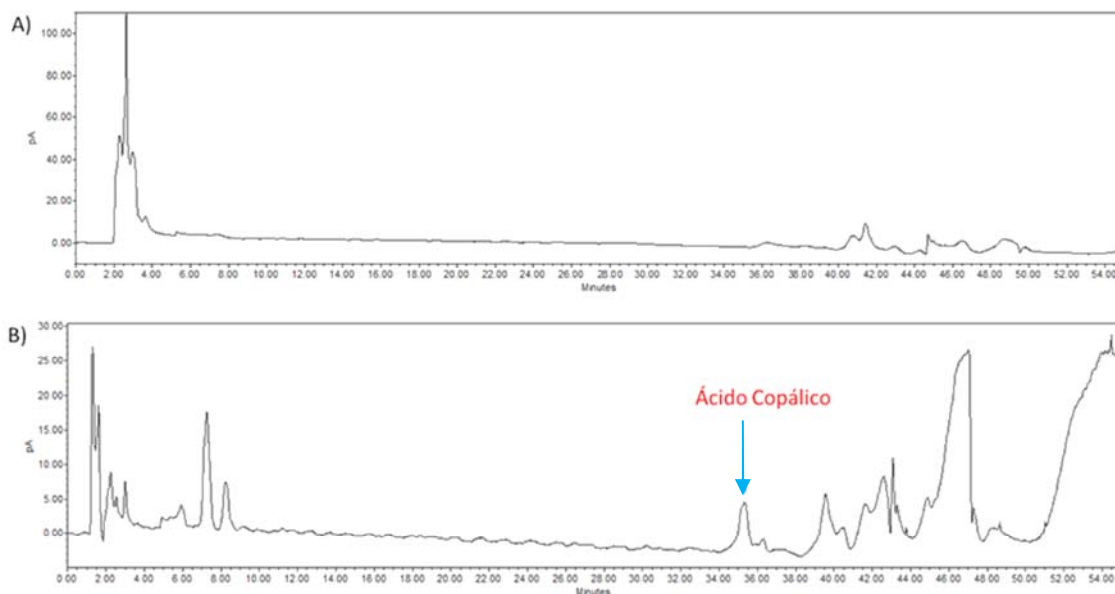


Figura 31. Cromatograma do controle em 24 horas (A) e cromatograma da biotransformação em 24 horas (B).

O extrato obtido do caldo da cultura incubada com ácido copálico por 120 horas foi submetido à análise por RMN de ^1H e foram detectados os sinais em δ_{H} 4,84 e em δ_{H} 4,48, correspondentes aos hidrogênios H-17b e H-17a do ácido copálico, mas o sinal em δ_{H} 5,67, correspondente ao hidrogênio H-14, não foi detectado, bem como o sinal do grupo metílico (H-16) em δ_{H} 2,16, sendo indicativo da ocorrência de biotransformação. Na Figura 32, página 52, está apresentado o espectro de RMN de ^1H do extrato obtido da cultura incubada por 120 horas.

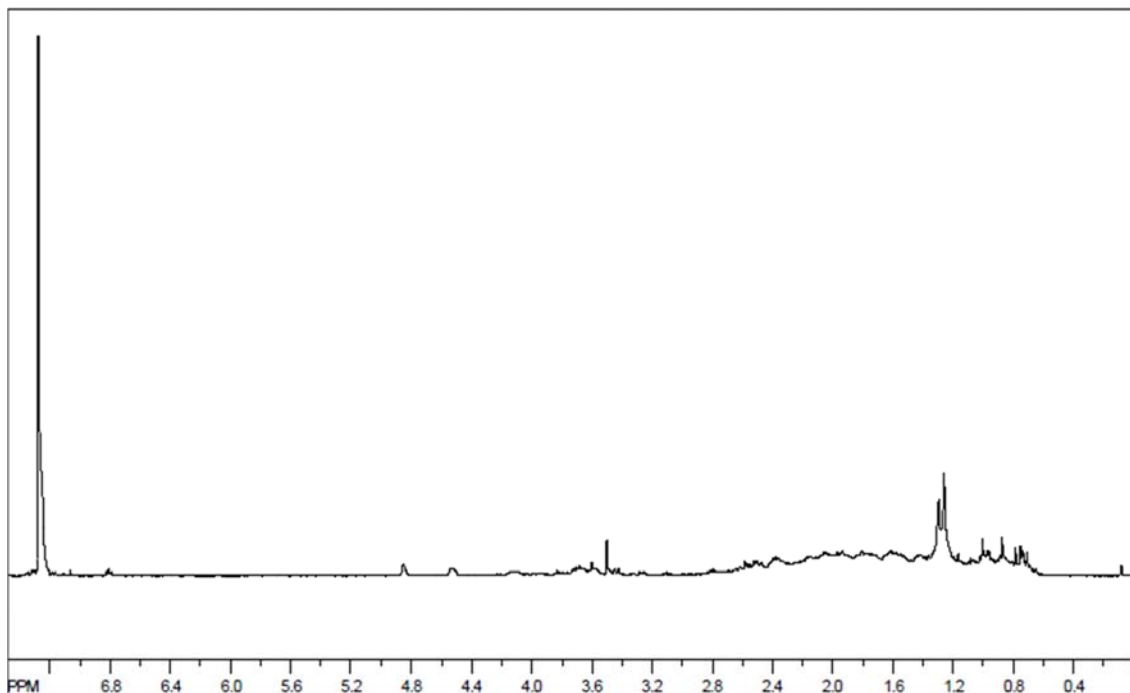


Figura 32.Espectro de RMN ^1H do extrato obtido da cultura do fungo *Mucor rouxii* desenvolvida com ácido copálico por 120 horas (CDCl_3 , 500 MHz).

Analisando os perfis obtidos das culturas controle e de biotransformação observou-se primeiramente a formação de quatro produtos de biotransformação codificados como Bp1, Bp3, Bp5 e Bp6. Estes picos detectados por CLAE-DAD apresentaram espectros no UV semelhantes ao do ácido copálico. Escolheu-se o quinto dia de biotransformação (120 horas) por ter sido o menor tempo com a maior quantidade de produtos biotransformados (Figura 33, página 53). Os espectros no UV do ácido copálico e dos possíveis produtos de biotransformação estão apresentados na Figura 34, página 53.

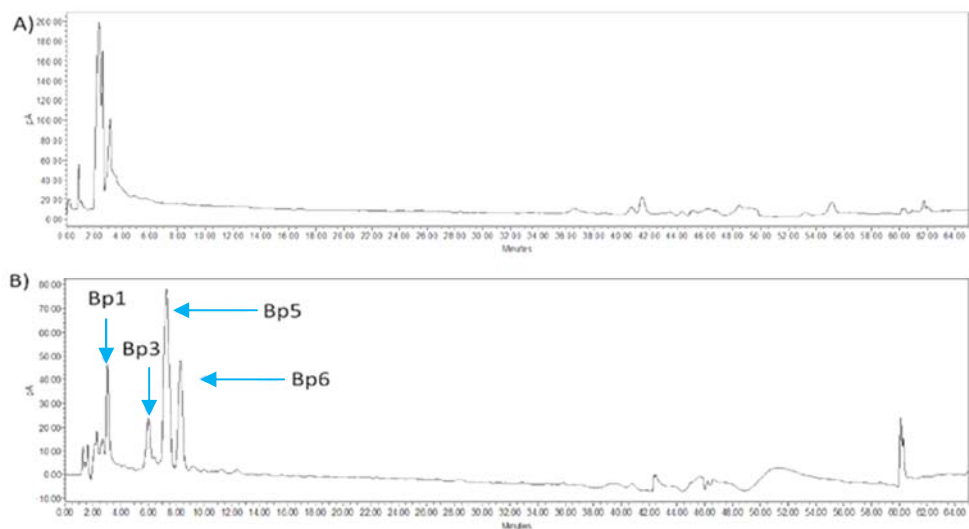


Figura 33. Cromatograma do controle no dia 5 (A) e cromatograma da biotransformação no dia 5 (B) com os produtos de biotransformação destacados.

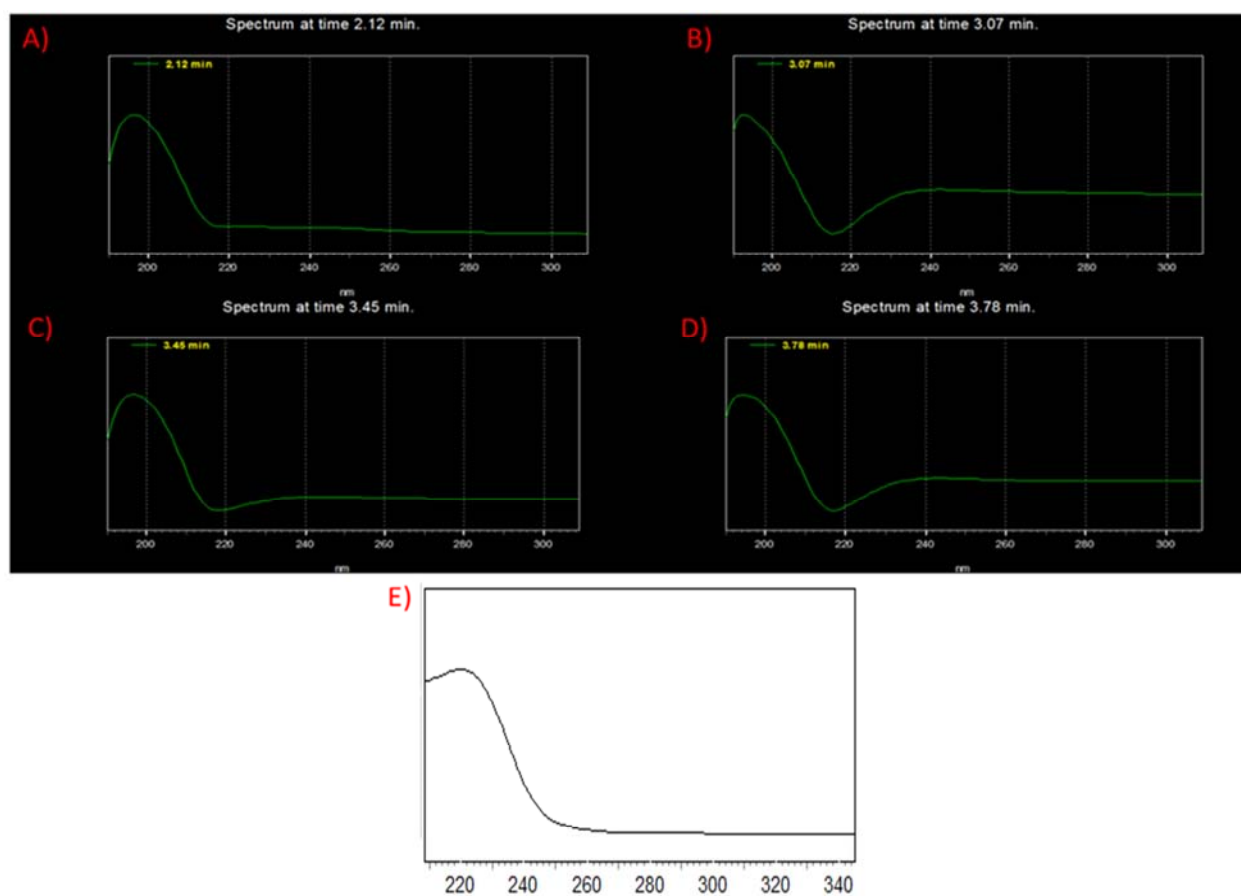


Figura 34. Espectros no UV dos produtos de biotransformação Bp1(A), Bp3(B), Bp5(C), Bp6(D) e do ácido copálico (E).

Após a detecção dos produtos e a seleção do melhor dia, ampliou-se a escala de produção dos extratos. Com o intuito de otimizar o tempo de trabalho optou-se pelo aumento do número de Erlenmeyers, pois o aumento do volume do meio poderia levar a uma diminuição ou até mesmo uma inibição da produção dos produtos de biotransformação devido a diferenças na aeração.

Em seguida foi analisado o extrato da biotransformação para certificar-se da reprodutibilidade dos resultados, que foram confirmados na análise dos cromatogramas. Procedeu-se então ao isolamento e identificação dos compostos.

4.6 Biotransformação do ácido copálico pelas bactérias do trato gastrointestinal

Diferentemente do que foi observado nas análises dos espectros dos extratos das culturas fúngicas desenvolvidas por diferentes períodos, não foram detectados sinais de diterpenos nas culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e na cultura de cepas mistas que contém *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* incubadas com ácido copálico por 24 horas. Para que pudéssemos descartar a possibilidade de obtenção de produtos de biotransformação do ácido copálico por estes microorganismos, haveria necessidade de desenvolvermos os processos em tempos de incubação menores, já que o crescimento e o metabolismo das bactérias são muito mais acelerados quando comparados aos fungos.

Por outro lado, nos espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos das culturas de *E. coli* desenvolvidas por 24 horas em aerobiose e em anaerobiose (Figuras 35 e 36, páginas 55 e 56, respectivamente) foram detectados os sinais dos hidrogênios do ácido copálico, que foi confirmado com a análise da amostra por CLAE-CAD. Porém não foi detectado nenhum produto de biotransformação.

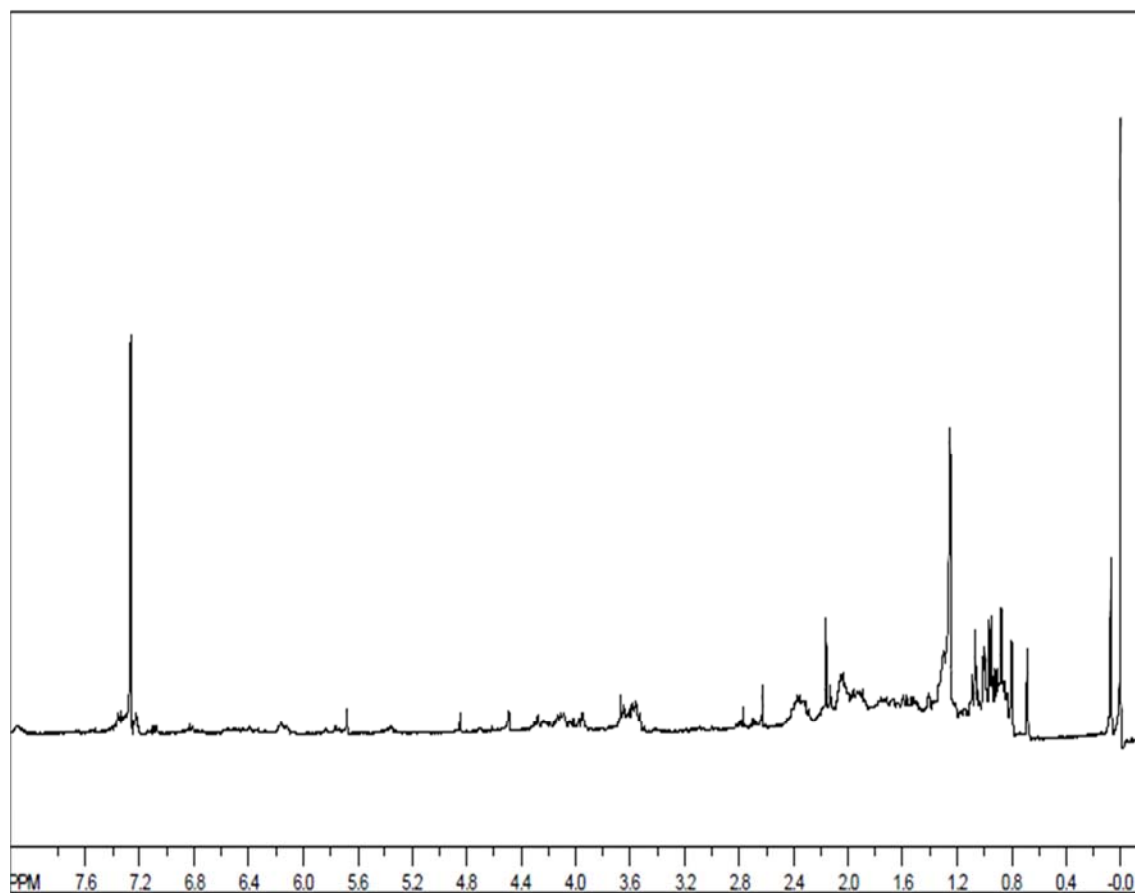


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do extrato obtido da cultura de *E. coli* desenvolvida com ácido copálico em anaerobiose por 24 horas (CDCl_3 500 MHz).

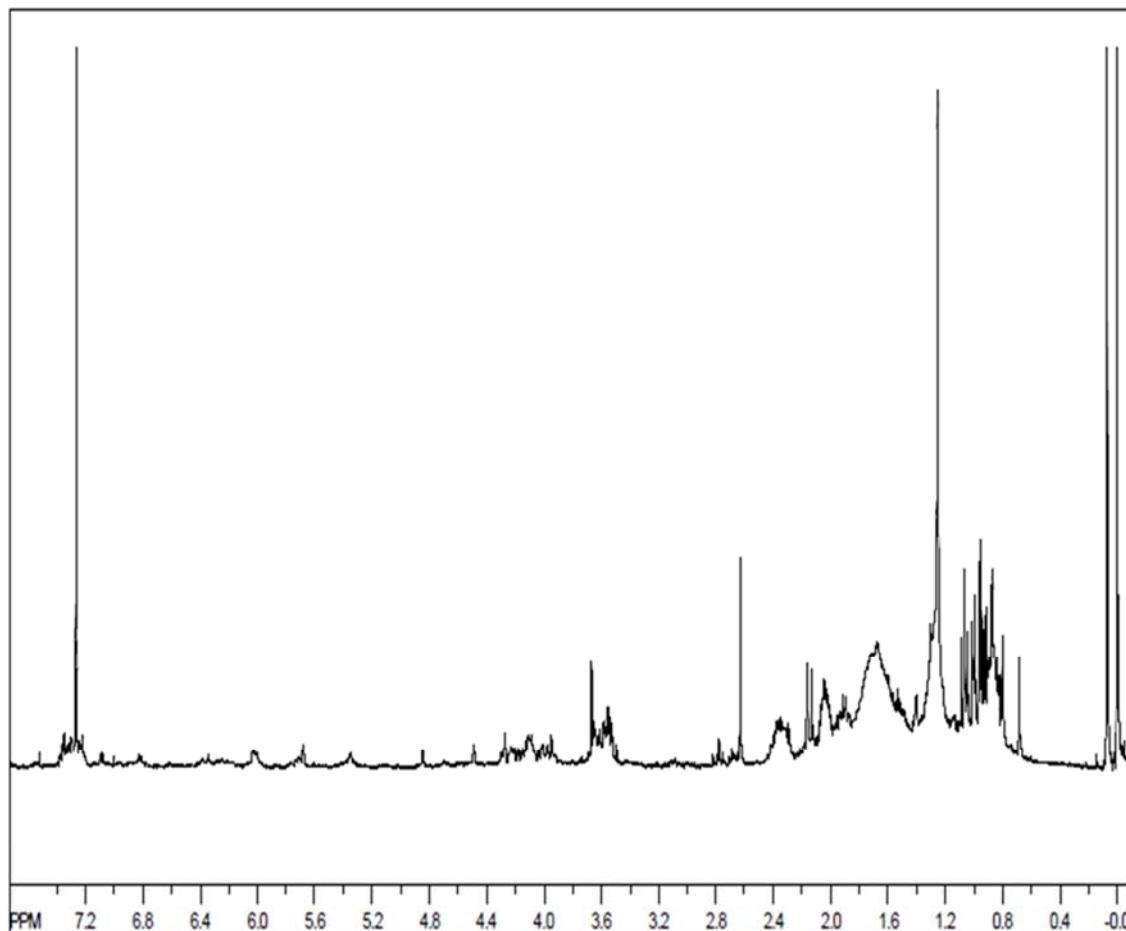


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do extrato obtido da cultura de *E. coli* desenvolvida com ácido copálico em aerobiose por 24 horas (CDCl_3 , 500 MHz).

4.7 Isolamento e identificação dos produtos de biotransformação do ácido copálico produzidos pelo fungo *Mucor rouxii*

Para isolamento dos produtos de biotransformação foi utilizada CLAE em escala semi-preparativa com detecção por UV monitorando em dois comprimentos de onda, 200 e 210 nm. A fase móvel foi alterada em comparação a análise no aparelho analítico com o intuito de otimizar o tempo e aumentar a quantidade de extrato injetado. Com as alterações efetuadas conseguiu-se obter uma melhor separação que evidenciou a presença de outros dois produtos de biotransformação, totalizando assim 6 produtos (Figura 37, página 57).

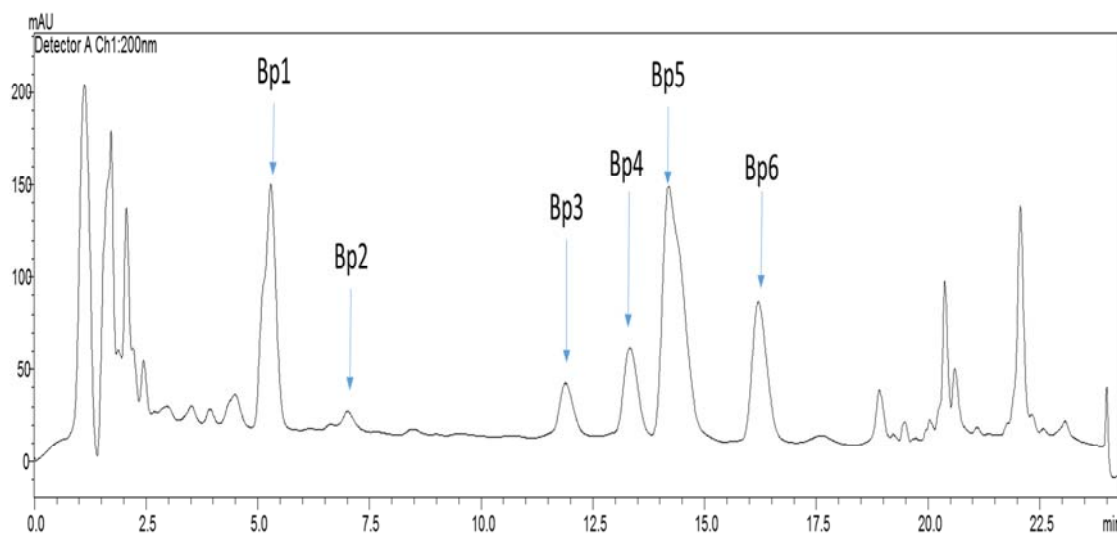


Figura 37. Cromatograma do extrato contendo os produtos de biotransformação do ácido copálico, destacando os principais produtos de biotransformação.

Espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , de ^{13}C -DEPT 135° e os mapas de contornos HMQC e HMBC de dois produtos de biotransformação, codificados Bp1 e Bp5, foram adquiridos e analisados.

Para elucidação das estruturas químicas dos dois produtos de biotransformação do ácido copálico foram consideradas as ausências de alguns sinais e o aparecimento de outros, bem como as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , de ^{13}C -DEPT 135° e os mapas de contornos HMQC e HMBC do produto codificado Bp1 estão apresentados nos anexos de A a E. Na Figura 38 (página 58) está apresentada a estrutura química sugerida para o produto de biotransformação codificado Bp1. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, páginas 58 e 59.

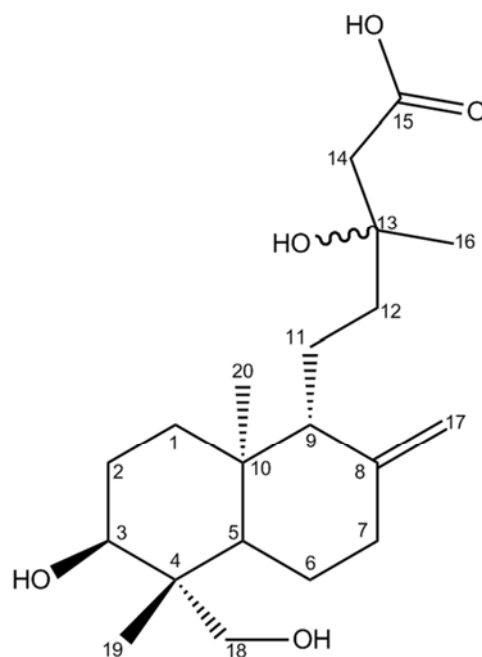


Figura 38. Estrutura química do produto de biotransformação Bp1.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H do produto de biotransformação Bp1 (400 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{H} ppm, <i>mult.</i>, (J Hz)
H-3	3,63 <i>dd</i> (8,5 e 1,2)
H-14	2,43 <i>s</i>
H-16	1,26 <i>s</i>
H-17a	4,58 <i>d</i> (8,5)
H-17b	4,82 <i>s</i>
H-18	3,26 <i>d</i> (11,1) 1H
H-18	3,50 <i>d</i> (11,1) 1H
H-19	0,66 <i>s</i>
H-20	0,74 <i>s</i>

Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação Bp1 (100 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{C} ppm
1	38,0
2	28,2
3	73,4
4	43,7
5	58,5
6	24,8
7	39,0
8	149,5
9	58,5
10	40,4
11	18,9
12	41,9
13	72,5
14	46,6
15	175,5
16	27,2
17	107,4
18	66,8
19	12,6
20	15,4

No espectro de RMN de ^1H da substância Bp1 não foi observado o sinal do H- 14 do ácido copálico em δ_{H} 5,67 o que indicou a ocorrência de modificação nesta parte da molécula. Observou-se em δ_{H} 2,43 um singleto que integrou para dois hidrogênios e que apresentou correlação com o δ_{C} 72,5, o qual por sua vez apresentou correlação também com o sinal em δ_{H} 1,26 (s) integrado para três hidrogênios. O sinal observado em δ_{H} 2,43 também apresentou correlação com o δ_{C} 175,5 atribuído ao grupo carbonílico. Este conjunto de sinais possibilitou determinar a ocorrência de hidroxilação no C-13. O sinal do grupo metílico em δ_{H} 1,26 apresentou ainda correlação com o δ_{C} 41,9 confirmando a atribuição realizada. Os sinais em δ_{H} 4,58 *d* (8,5 Hz) e em δ_{H} 4,82 (s) integrados para um hidrogênio cada no espectro RMN de ^1H e os sinais em δ_{C} 107,4 e em δ_{C} 149,5 no espectro de RMN de ^{13}C possibilitam sugerir a presença da ligação dupla entre os carbonos 8 e 17.

No espectro de RMN de ^1H observou-se também a presença de um duplo duplete em δ_{H} 3,63 (8,5 e 1,2 Hz), integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de

contornos HMQC aparece ligado ao carbono em δ_C 73,4, o que indicou a ocorrência de outra hidroxilação. As correlações observadas entre o δ_H 3,63 e os δ_C 12,6 e δ_C 66,8, bem como os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos adjacentes, possibilitaram sugerir a ocorrência de hidroxilação no C-3. A estereoquímica do grupo hidroxílico foi atribuída considerando o valor da constante de acoplamento de 8,5 Hz. Dois dupletos, integrados para um hidrogênio cada, foram observados em δ_H 3,26 (11,1 Hz) e δ_H 3,50 (11,1 Hz), os quais estão ligados ao carbono em δ_C 66,8, o que sugere novamente a ocorrência de hidroxilação. A correlação entre os sinais em δ_H 0,66 e δ_C 66,8, bem como a comparação dos sinais observados com os da literatura (JEFFERIES e RATAJCZAK, 1973; SHEN et al., 2006) possibilitaram sugerir a localização do grupo hidroxílico no C-18. A análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° confirmou o padrão de hidrogenação de cada carbono. A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo negativo (m/z 353,2324 $[\text{M}-\text{H}]^-$, correspondente a molécula desprotonada (Figura 39, página 61).

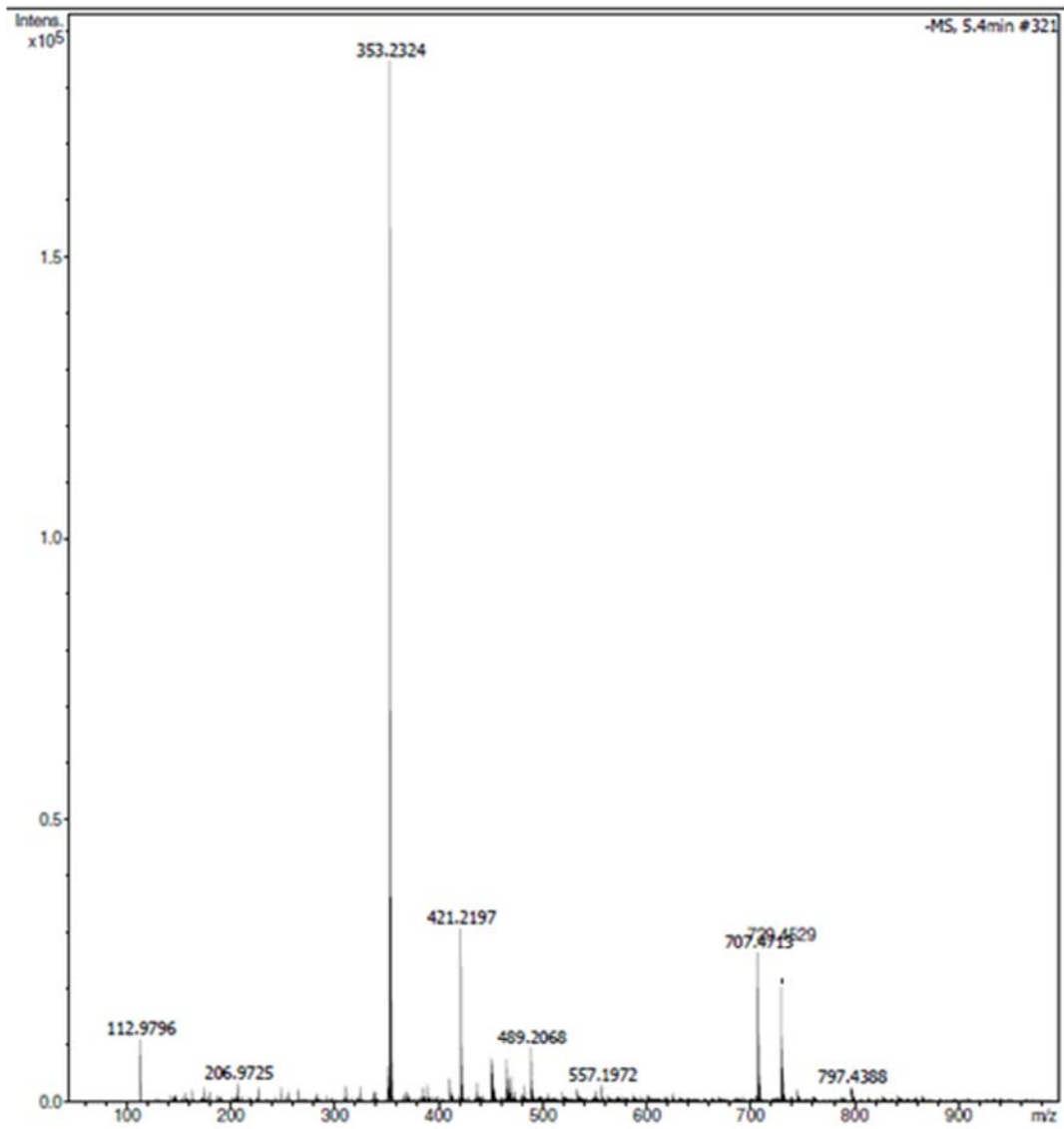


Figura 39. Espectro de massas do produto de biotransformação Bp1.

A estrutura química proposta para o produto de biotransformação Bp5 (Figura 40) é semelhante à estrutura proposta para o produto codificado Bp1. A diferença entre os produtos está no número de grupos hidroxílicos. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do produto de biotransformação codificado como Bp5 estão apresentados nas Tabelas 12 e 13 (páginas 62 e 63, respectivamente) e os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , de $^{13}\text{C-DEPT } 135^\circ$ e os mapas de contornos HMQC e HMBC do produto codificado Bp5 estão apresentados nos anexos F a J.

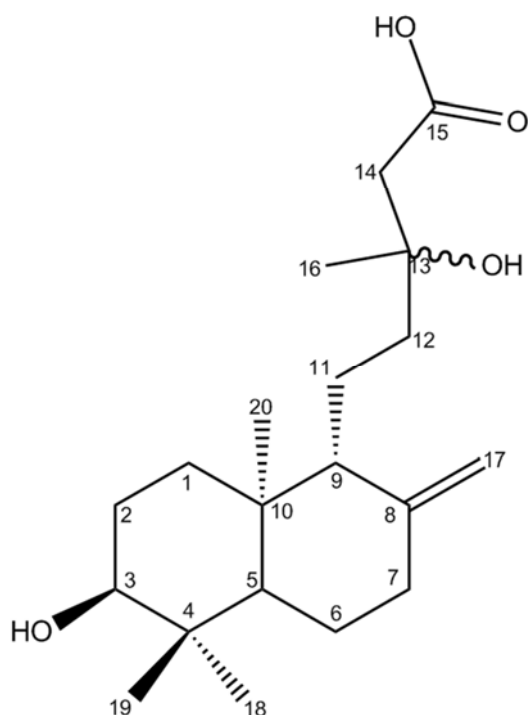


Figura 40: Estrutura química do produto de biotransformação Bp5.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H do produto de biotransformação Bp5 (400 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{H} ppm, <i>mult.</i> , (J Hz)
H-3	3,18 <i>dd</i> (8,3 e 1,7)
H-14	2,43 <i>s</i>
H-16	1,26 <i>s</i>
H-17a	4,58 <i>d</i> (8,5)
H-17b	4,82 <i>s</i>
H-18	0,76 <i>s</i>
H-19	0,97 <i>s</i>
H-20	0,72 <i>s</i>

Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação Bp5 (100 MHz, CD_3OD).

Posição	δ_{C} ppm
1	38,3
2	28,6
3	79,5
4	40,2
5	56,0
6	25,2
7	39,3
8	149,3
9	58,5
10	40,6
11	19,0
12	41,9
13	72,5
14	46,2
15	175,5
16	27,2
17	107,4
18	16,1
19	28,8
20	15,0

Nos espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C da substância Bp5, bem como nos mapas de contornos HMQC e HMBC, foram observados sinais e correlações semelhantes àqueles observados nos espectros e mapas de contornos da substância codificada Bp1, exceto pelos sinais atribuídos aos grupos metílicos em δ_{H} 0,76 e δ_{H} 0,97, o que sugere a não ocorrência de hidroxilação no C-18. A análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° confirmou também o padrão de hidrogenação de cada carbono. A fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo negativo (m/z 337,2376 $[\text{M}-\text{H}]^-$), correspondente a molécula desprotonada (Figura 41, página 64).

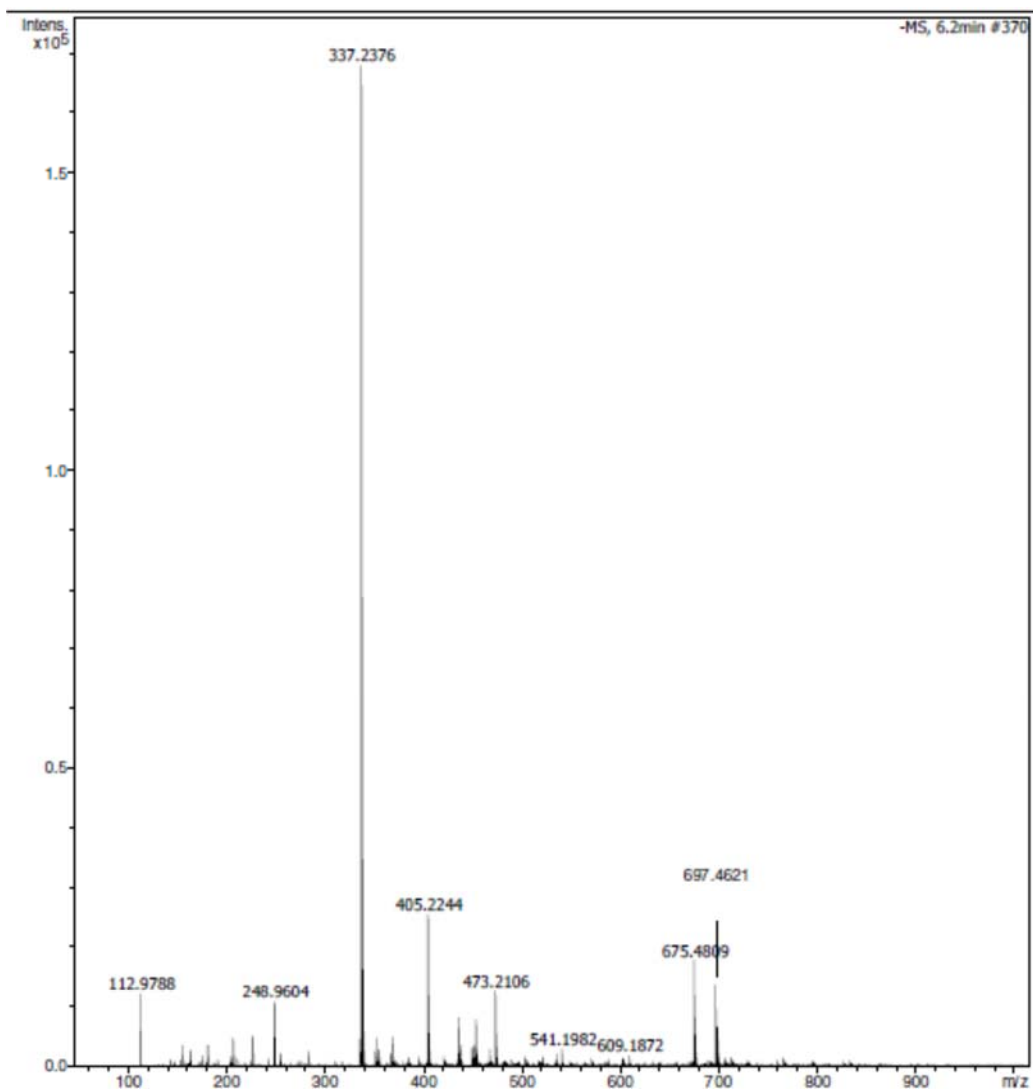


Figura 41. Espectro de massas do produto de biotransformação Bp5.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os resultados das análises dos oleorresinas de diferentes procedências sugerem que a amostra comercial analisada trata-se de uma mistura de oleorresinas de diferentes espécies.

Os processos cromatográficos utilizados na etapa de isolamento do ácido copálico a partir de oleorresina comercial propiciaram a obtenção deste diterpeno em grau de pureza adequado para a realização dos estudos de biotransformação.

Os ensaios realizados para a determinação dos valores de concentração inibitória mínima permitiram determinar o limite de concentração de ácido copálico nas culturas para evitar inibição do crescimento dos micro-organismos.

Os fungos filamentosos mostraram maior versatilidade e grande potencial para realizar biotransformações do ácido copálico quando comparados as bactérias do trato gastrointestinal nas condições utilizadas nos experimentos.

O fungo filamentoso *Mucor rouxii* pode ser considerado, dentre os micro-organismos utilizados neste trabalho, o mais promissor para obtenção de produtos de biotransformação do ácido copálico.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. **Current Medicinal Chemistry**, v.6, p.359-374, 1999.
- AKIHISA, T.; TAKAMINE, Y.; YOSHIZUMI, K.; TOKUDA, H.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; NAKAHARA, T.; YOKOCHI, T.; ICHIISHI, E.; NISHINO, H. Microbial Transformations of Two Lupane-Type Triterpenes and Anti-Tumor-Promoting Effects of the Transformation Products. **Journal of Natural Products**, v.65, p.278-282, 2002.
- AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; DA COSTA, F. B.; MARTINS, C. H. G.; DE CARVALHO, T. C.; PORTO, T. S.; VENEZIANI, R. C. S. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.63, p.326-330, 2008.
- AMUSANT, N.; MORETTI, C.; RICHARD, B.; PROST, E.; NUZILLARD, J. M.; THEVENON, M.F. Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v.65, p.23-28, 2007.
- ANDREÃO, P. S. S.; GIACOMINI, R. A.; STUMBO, A. M.; WALDMAN, W. R.; BRAZ-FILHO, R.; LIGIÉRO, C. B. P.; MIRANDA, P.C. M. L. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, v.33, p.212-215, 2010.
- ARAYA, J. E.; NEIRA, I.; DA SILVA, S.; MORTARA, R. A.; MANQUE, P.; CORDERO, E.; SAGUA, H.; LOYOLA, A.; BORQUEZ, J.; MORALES, G.; GONZÁLES J. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.413-418, 2003.
- ARECHE, C.; LOYOLA, L. A.; BORQUEZ, J.; ROVIROSA, J.; SAN-MARTIN, A. Microbial transformation of the diterpene mulin-11,13-dien-20-oic acid by *Mucor plumbeus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.46, p.765-768, 2008.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v.27, p.16-29. 2009.
- BAKIR, B.; HIM, A.; OZBEK, H.; DUZ, E.; TUTUNCU, M. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of β -caryophyllene. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v.2, p.41-44, 2008.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; FREITAS, P.C.D.; ZANINI, A.C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.101-109, 1988.

BEVAN, C. W. L.; EKONG, D. E. U.; OKOGUN, J. I. West African timbers. XXII. Diterpenes of *Oxystigma oxyphyllum*. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, v.9, p.1067-1070, 1968.

BIRKETT, M. A.; HASSANALI, A.; HOGLUND, S.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A. Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. **Phytochemistry**, v.72, p.109-114, 2011.

CAPEL, C. S.; SOUZA, A. C. D. DE; CARVALHO, T. C. DE; SOUSA, J. P. B. DE; AMBRÓSIO, S. R.; CUNHA, C. H. G. M. W. R; GALÁN. R. H.; FURTADO, N. A. J. C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens. **Journal of the Microbiology Biotechnology**, v.38, p.1493-1498, 2010.

CARVALHO, M. G. DE.; CRANCHI, D. C.; CARVALHO. A. G. DE. Chemical constituents from *Pinus strobus* var. *chiapensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.7, p.187-191, 1996.

CARVALHO, T. C.; POLIZELI, A. M.; TURATTI, I. C. C.; SEVERIANO, M. E.; DE CARVALHO, C. E.; AMBRÓSIO, S. R.; CROTTI, A. E.; DE FIGUEIREDO, U. S.; VIEIRA, P. C; FURTADO, N. A. J. C. Screening of Filamentous Fungi to Identify Biocatalysts for Lupeol Biotransformation. **Molecules**, v.15, p.6140-6151, 2010.

CAVIN, A. L.; HAY, A. E.; MARSTON, A.; STOECKLI-EVANS, H.; SCOPELLITI, R.; DIALLO, D.; HOSTETTMANN, K. Bioactive Diterpenes from the Fruits of *Detarium microcarpum*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.768-773, 2006.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v.40, p.395-400, 2005.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. **Microbiological Research**, v.164, p.347-351, 2009.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. Kinetics of *Mucor rouxii* fermentation in relation to chitosan production. **Research Journal of Microbiology**, v.1, p.90-94, 2006.

CHEN, A. R. M.; RUDDOCK, P. L. D.; LAMM, A. S.; REYNOLDS, W. F.; REESE, P. B. Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, v.66, p.1898-1902, 2005.

CHEN, G.; YANG, X.; NONG, S.; YANG, M.; XU, B.; ZHANG, W. Two novel hydroperoxylated products of 20(S)-protopanaxadiol produced by *Mucor racemosus* and their cytotoxic activities against human prostate cancer cells. **Biotechnology Letters**, v.35, p.439-443, 2013a.

CHEN, M.; CAO, F.; LI, F.; LIU, C.; TONG, H.; WU, W.; HU, M. Anaerobic Transformation of DDT Related to Iron (III) Reduction and Microbial Community Structure in Paddy Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.2224-2233, 2013b.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**. 7th ed. Approved standard M11–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2007.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 7th ed. Approved standard M7–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2006

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, p.1297-1303, 2004.

DING, W. J.; DENG, Y.; FENG, H.; LIU, W. W.; HU, R.; LI, X.; GU, Z. M.; DONG, X. P. Biotransformation of aesculin by human gut bacteria and identification of its metabolites in rat urine. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, p.1518-1523, 2009.

DOMENECH-CARBO, M. T.; DE LA CRUZ-CANIZARES, J.; OSETE-CORTINA, L.; DOMENECH-CARBO, A.; DAVID, H. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatoba resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.284, p.81-92, 2009.

DUNNE, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: Probiotics and gut disorder. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.7, p.136-145, 2001.

FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; ARTEGA, J. M.; SUAREZ, S. The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v.63, p.663-668, 2003.

FRAGA, B. M.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A. Biotransformation of two stemodane diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v.60, p.7921-7932, 2004.

FUJII, M.; ISHII, S.; SAITO, R.; AKITA, H. Enzymatic resolution of albicanol and its application to the synthesis of (-)-copalic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.59, p.254-260, 2009.

GODERSKA, K.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v.7, p.5-10, 2008.

GOMES, N. DE M.; REZENDE, C. DE M.; FONTES, S. P.; HOVELL, A. M.C.; LANDGRAF, R. G.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. DA C.; FERNANDES, P. D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.179-184, 2008.

GONZALEZ-BURGOS, E.; CARRETERO, M. E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Diterpenoids isolated from *Sideritis* species protect Astrocytes against oxidative stress via Nrf2. **Journal of Natural Products**, v.75, p.1750-1758, 2012.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.5319-5341, 2012.

GOUIRIC, S. C.; FERESIN, G. E.; TAPIA, A. A.; ROSSOMANDO, P. C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BUSTOS, D. A. 1 β ,7 β -Dihydroxydehydroabiatic acid, a new biotransformation product of dehydroabiatic acid by *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.281-284, 2004.

GUSTAFSSON, H.; JOHANSSON, E. M.; BARRABINO, A.; ODEN, M.; HOLMBERG, K. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica. The effect of varied particle size and morphology. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.100, p.22-30, 2012.

HAISER, H. J.; TURNBAUGH, P. J. Is it time for a metagenomic basis of therapeutics? **Science**, v.336, p.1253-1255, 2012.

HANDAYANI, N.; LOOS, K.; WAHYUNINGRUM, D.; BUCHARI; ZULFIKAR, M. A. Immobilization of *Mucor miehei* lipase onto macroporous aminated polyethersulfone membrane for enzymatic reactions. **Membranes**, v.2, p.198-213, 2012.

HANSON, J. R. **An introduction to biotransformations in organic chemistry**. Oxford, W. H. Freeman Spektrum, 1995, 92p.

HILÁRIO, V. C.; CARRÃO, D. B.; BARTH, T.; BORGES, K. B.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; MORAES DE OLIVEIRA, A. R. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.61, p.100-107, 2012.

HIPÓLITO, U. V.; RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S. R.; DE OLIVEIRA, A. M.; BENDHACK, L. M.; DA COSTA, F. B.; TIRAPELLI, C. R. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v.616, p.183-191, 2009.

HUNG, H.Y.; QIAN, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; HSU, C. S.; LEE, K. H. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. **Natural Product Reports**, v.29, p.580-606, 2012.

- HWANG, B.Y.; LEE, J.H.; KOO, T.H.; KIM, H.S.; HONG, Y.S.; RO, J.S.; LEE, K.S.; LEE, J.J. Kaurane diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 production and NF-kappaB activation in LPS-stimulated macrophage RAW264.7 cells. **Planta Medica**, v.67, p.406-10, 2001.
- IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA-JR., V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p.2994-3001, 2012.
- JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W.; MOHAMAD, R.; GOH, Y. M.; SHOKRYAZDAN, P.; CHIN, J. Lovastatin in *Aspergillus terreus*: fermented rice straw extracts interferes with methane production and gene expression in *Methanobrevibacter smithii*. **BioMed Research International**, v.2013, 2013.
- JEFFERIES, P.R.; RATAJCZAK, T. Isopimara-9(11), 15-Diene-3 β , 19-diol from *Newcastlia viscida* (Verbenaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v.26, p.173 – 181, 1973.
- KANG, S.; KANG, S. Y.; HUR, H. G. Identification of fungal metabolites of anticonvulsant drug carbamazepine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.663-669, 2008.
- KARIMI, K.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. **Biotechnology Advances**, v.31, p.466-481, 2013.
- KOSHIMURA, M.; UTSUKIHARA, T.; KAWAMOTO, M.; SAITO, M.; HORIUCHI, C. A.; KUNIYOSHI, M. Biotransformation of bromos sesquiterpenes by marine fungi. **Phytochemistry**, v.70, p.2023-2026, 2009.
- KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VELUW, G. J. VAN; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v.74, p.1–29, 2013.
- KUETE, V.; WABO, G. F.; NGAMENI, B.; MBAVENG, AR. T.; METUNO, R.; ETOA, F. X.; NGADJUI, B. T.; BENG, V. P.; MEYER, J. J. M.; LALL, N. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.54-60, 2007.
- KURIATA-ADAMUSIAK, R.; STRUB, D.; LOCHYNSKI, S. Application of microorganisms towards synthesis of chiral terpenoid derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p.1427-1436, 2012.
- LACROIX, I.; BITON, J.; AZERAD, R. Microbial models of drug metabolism: microbial transformations of Trimegestone (RU27987), a 3-keto- Δ^4 , 9(10))-19-norsteroid drug. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.7, p.2329-2341, 1999.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; DA SILVA, J. A.; VEIGA-JR., V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* sp.) oleoresins. **Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.

LEIPOLD, D.; WUENSCH, G.; SCHMIDT, M.; BART, H.J.; BLEY, T.; EKKEHARD N. H.; BERGMANN, H.; RICHLING, E.; MUFFLER, K.; ULBER, R. Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp. strains-Proposal of new biosynthetic pathways. **Process Biochemistry**, v.45, p.1043-1051, 2010.

LEONG, Y. H.; LATIFF, A. A.; AHMAD, N. I.; ROSMA, A. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. **Mycotoxin Research**, v.28, p.79-87, 2012.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JR., V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1048-1053, 2003.

LIU, Y.; NAIR, M. G. Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. **Food Chemistry**, v.124, p.527-532, 2011.

LOMBARD, J.; MOREIRA, D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.87-99, 2011.

LOYOLA, L. A.; BORQUEZ, J.; MORALES, G.; ARAYA, J.; GONZALEZ, J.; NEIRA, I.; SAGUA, H.; SAN-MARTIN, A. Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. **Phytochemistry**, v.56, p.177-180, 2001.

LOYOLA, L. A.; BORQUEZ, J.; MORALES, G.; SAN-MARTIN, A.; DARIAS, J.; FLORES, N.; GIMENEZ, A. Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. **Phytochemistry**, v.65, p.1931-1935, 2004.

LU, J.; DENG, S.; CHEN, H.; HOU, J.; ZHANG, B.; TIAN, Y.; WANG, C.; MA, X. Microbial transformation of cinobufotalin by *Alternaria alternata* AS 3.4578 and *Aspergillus niger* AS 3.739. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.89, p.102-107, 2013.

MAHAJAN, J.R.; FERREIRA, G.A.L. New diterpenoids from copaiba oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.43, p.611-613, 1971.

MARCHESINI, A. M.; PRADO, G. G.; MESSIANO, G. B.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Chemical constituents of *Aristolochia gibertii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, p.1598-1608, 2009.

- MOUSSA, S.; IBRAHIM, A.; OKBA, A.; HAMZA, H.; OPWIS, K.; SCHOLLMEYER, E. Antibacterial action of acetic acid soluble material isolated from *Mucor rouxii* and its application onto textile. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, p.736-741, 2011.
- MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHELLER, M.C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v.46, p.1-15, 2011.
- NAKANO, T.; DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v.26, p.167-173, 1961.
- NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; KINROSS, J.; BURCELIN, R.; GIBSON, G.; JIA, W.; PETTERSSON, S. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. **Science**, v.336, p.1262-1267, 2012.
- NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Opinion: Understanding 'Global' Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, p.668-676, 2003.
- OLDFIELD, E.; LIN, F. Y. Terpene biosynthesis: Modularity rules. **Angewandte Chemie, International Edition**, v.51, p.1124-1137, 2012.
- OSORIO-LOZADA, A.; SURAPANENI, S.; SKILES, G. L.; SUBRAMANIAN, R. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study of diclofenac metabolism by *Actinoplanes* species. **Drug Metabolism and Disposition**, v.36, p.234-240, 2008.
- PAIVA, L. A. F.; CUNHA, K. M. DE A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.737-739, 2002.
- PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p.303-307, 2003.
- PORTO, T. S.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; MARTINS, C. H. G.; DA COSTA, F. B.; SEVERIANO, M. E.; SILVA, A. N.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R. Antimicrobial *ent*-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, v.80, p.432-436, 2009a.
- PORTO, T. S.; RANGEL, R.; FURTADO, N. A. J. C.; DE CARVALHO, T. C.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; DA COSTA, F. B.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; HELENO, V. C. G.; AMBROSIO, S. R. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. **Molecules**, v.14, p.191-199, 2009b.

POSSEMIERS, S.; BOLCA, S.; VERSTRAETE, W.; HEYERICK, A. The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. **Fitoterapia**, v.82, p.53-66, 2011.

RECHNER, A. R.; SMITH, M. A.; KUHNLE, G.; GIBSON, G. R.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. S.; MOORE, K. P.; RICE-EVANS, C. A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, p.212-225, 2004.

RIJO, P.; SIMÕES, M. F.; DUARTE, A.; RODRIGUEZ, B. Isopimarane diterpenoides from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.70, p.1161-1165, 2009.

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

ROHMER, M. From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: Discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway. **Lipids**, v.43, p.1095-1107, 2008.

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, v.295, p.517-524, 1993.

RUBINSTEIN, A. Microbially controlled drug delivery to the colon. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v.11, p.465-475, 1990.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO., BENEDITO P.; VEIGA-JR., V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.204-208, 2008.

SARTORELLI, P.; CARVALHO, C. S.; REIMÃO, J. Q.; LORENZI, H.; TEMPONE, A. G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. **Planta Medica**, v.76, p.1454-1456, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.111-115, 2002.

SCHWAB, W.; FUCHS, C.; HUANG, F. C. Transformation of terpenes into fine chemicals. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.115, p.3-8, 2013.

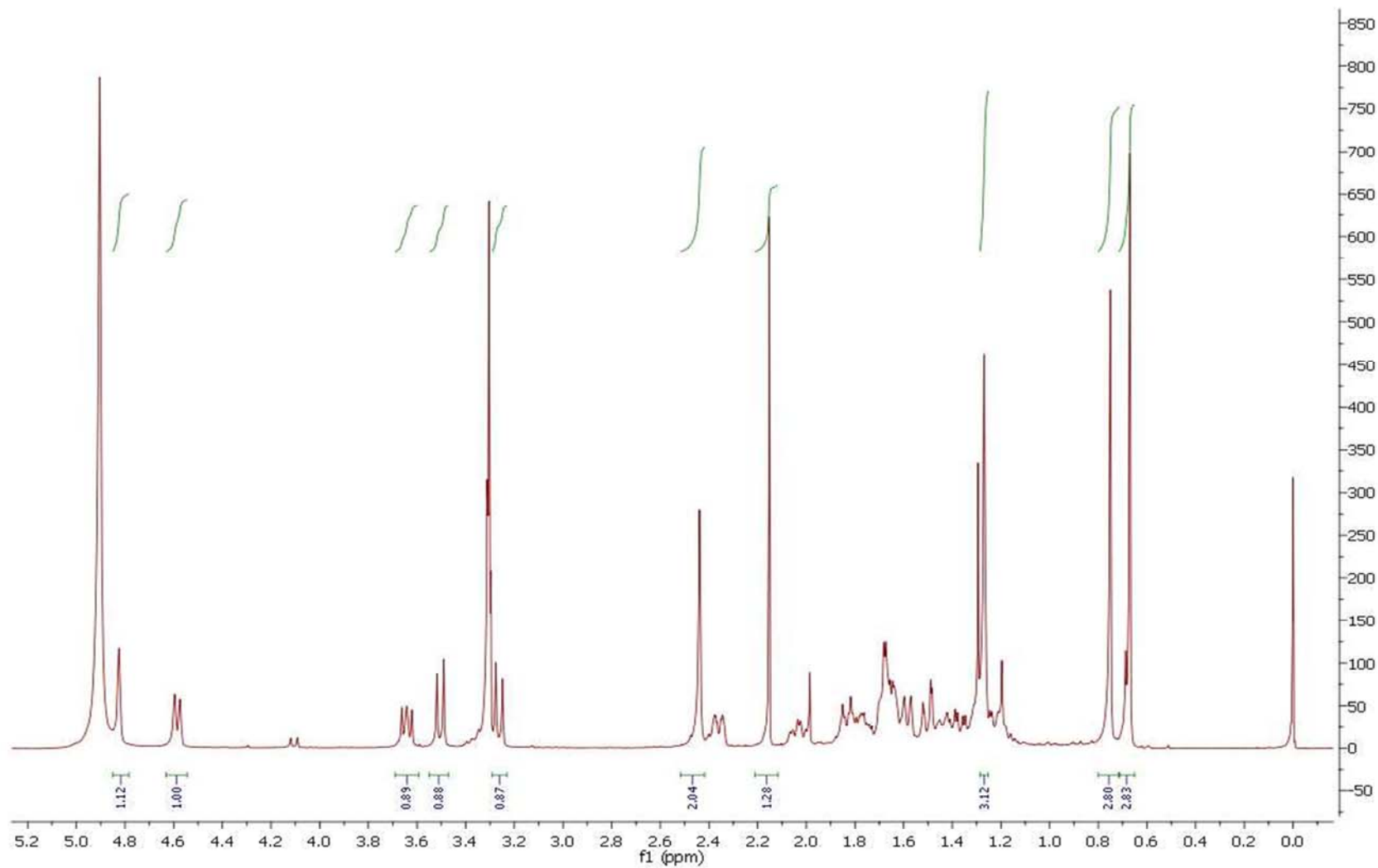
SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; PORTO, T. S.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; FURTADO, N. A. J. C.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; CUNHA, W. R.; GREGORIO, L. E.; AMBROSIO, S. R. Anticariogenic properties of *ent*-pimarane diterpenes obtained by microbial transformation. **Molecules**, v.15, p.8553-8566, 2010.

- SHEN, Y. H.; Li, R.T; XIAO, W. L.; XU, G.; LIN, Z.W.; ZHAO, Q. S.; SUN, H. D. *Ent-labdane diterpenoids from *Andrographis paniculata**. **Journal of Natural Products**. v.69, p.319–322, 2006
- SIMEO, Y.; SINISTERRA, J. V. Biotransformation of terpenoids: a green alternative for producing molecules with pharmacological activity. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.6, p.128-134, 2009.
- SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.161, p.551-558, 1974.
- SOUSA, T.; PATERSON, R.; MOORE, V.; CARLSSON, A.; ABRAHAMSSON, B.; BASIT, A. W. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, p.1-25, 2008.
- SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. M.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy**, v.25, p.215-220, 2010.
- SOUZA, A. B.; MOREIRA, M. R.; BORGES, C. H. G.; SIMÃO, M. R.; BASTOS, J. K.; SOUSA, J. P. B.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for analysis of (-)-copalic acid in copaiba oleoresin. **Biomedical Chromatography**, v. 27, p. 280-283, 2013.
- SRISAILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of valdecoxib by microbial cultures. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.809-816, 2010.
- SRISAILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of celecoxib using microbial cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.2075-2089, 2009.
- SUN, L.; HUANG, H.H.; LIU, L.; ZHONG, D. F. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2722-2727, 2004.
- TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Quantitative chemical analysis for the standardization of copaiba oil by high resolution gas chromatography. **Química Nova**. v.27, p.236-240. 2004.
- TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNANDEZ, B. V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v.68, p.808-812, 2002.
- URZÚA, A.; JARA, F.; TOJO, E.; WILKENS, M.; MENDOZA, L.; REZENDE, M. C. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudate of *Haplopappus uncinatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.297-301, 2006.

- URZÚA, A.; REZENDE, M. C.; MASCAYANO, C.; VASQUEZ, L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v.13, p.882-891, 2008.
- VASCONCELOS, K. R. F.; VEIGA-JR., V. F.; ROCHA, W. C.; BANDEIRA, M. F. C. *In vitro* assessment of antibacterial activity of a dental cement constituted of a *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.733-738, 2008.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VEIGA JR., V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, ANGELO C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.248-254, 2007.
- VENKATESWARLU, Y.; RAMESH, P.; REDDY, P. S.; JAMIL, K. Microbial transformation of $\Delta^9(15)$ -africanene. **Phytochemistry**, v.52, p.1275-1277, 1999.
- VIDYAWATHI, M.; KRISHNA, D. R.; PRASAD, K. V. S. R. G.; VIDYASAGAR, J. Studies on metabolism of losartan using microbes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v.1, p.52-59, 2008.
- XIE, Z. Y.; HUANG, H. H.; ZHONG, D. F. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Xenobiotica**, v.35, p.467-477, 2005.
- YAMAMOTO, K. Biological analysis of the microbial metabolism of hetero-oligosaccharides in application to glycotecology. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.76, p.1815-1827, 2012.
- YANG, R. L.; JIA, T. L.; ZHANG, R. Q. Microbial transformation of fraxinellone by *Aspergillus niger*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.7, p.843-845, 2005.
- YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.437-458, 2005.
- ZELINSKI, T.; HAUER, B. Industrial biotransformations with fungi. **Mycota**, v.10, p.283-301, 2002.
- ZHANG, P.; LIN, L. H.; HUANG, H. H.; XU, H. Y.; ZHONG, D. F. Biotransformation of indomethacin by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.27, p.1097-1102, 2006.
- ZHOU, G. C.; WANG, Y.; ZHAI, S.; GE, F.; LIU, Z. H.; DAI, Y. J.; YUAN, S.; HOU, J. Y. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 4065-4074, 2013.

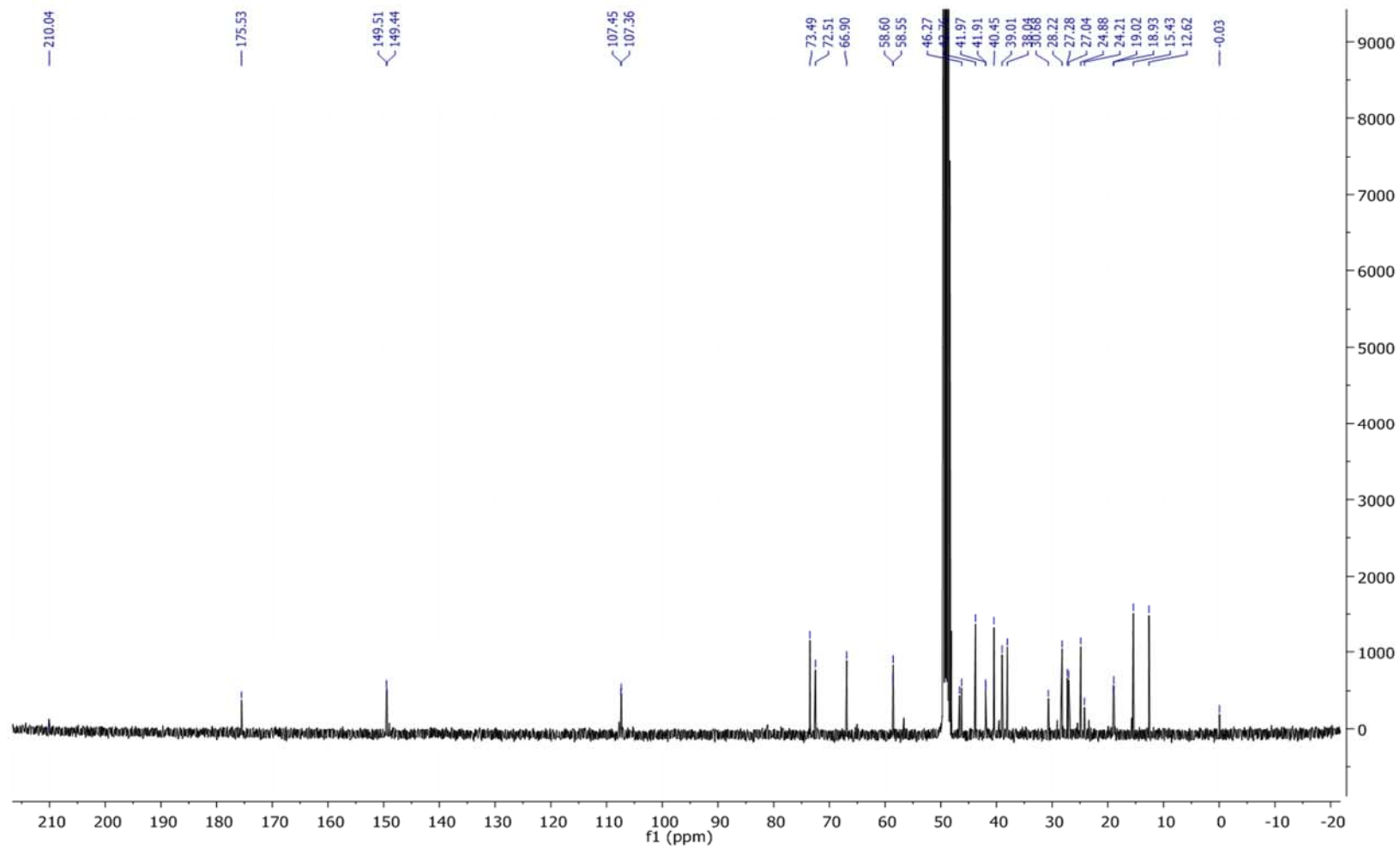
Anexos

ANEXO A



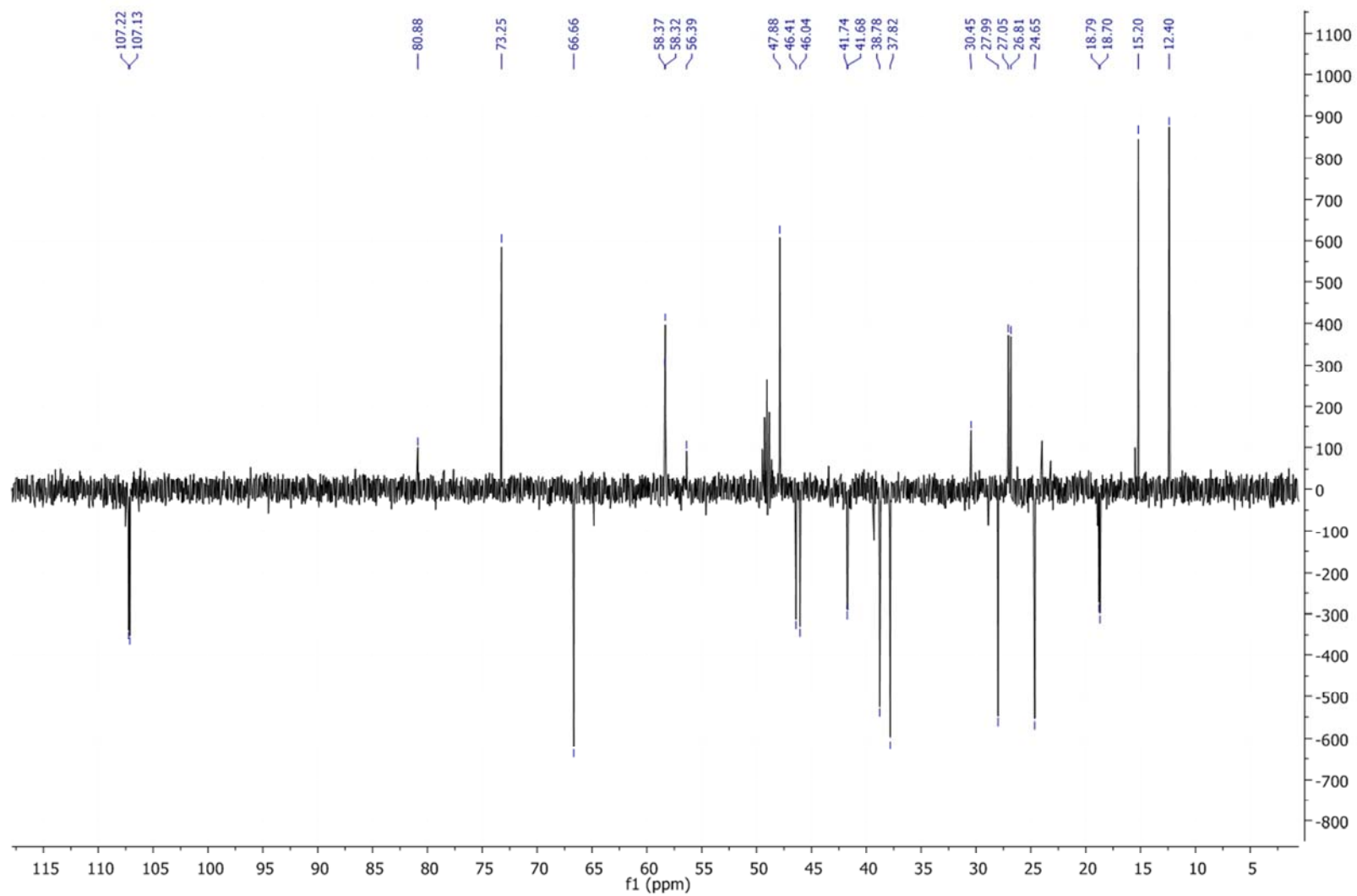
Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da substância Bp1.

ANEXO B



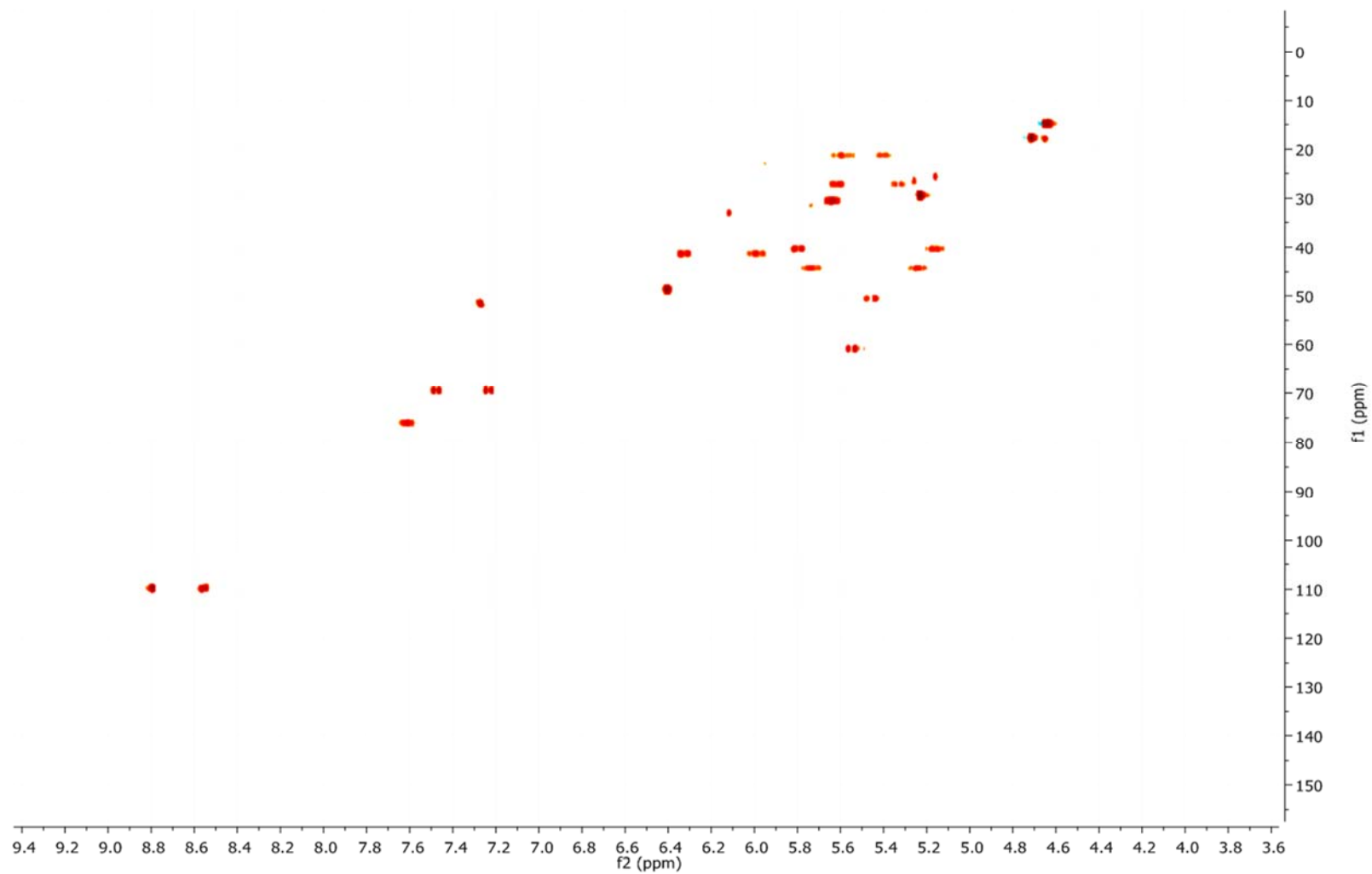
Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) da substância Bp1.

ANEXO C



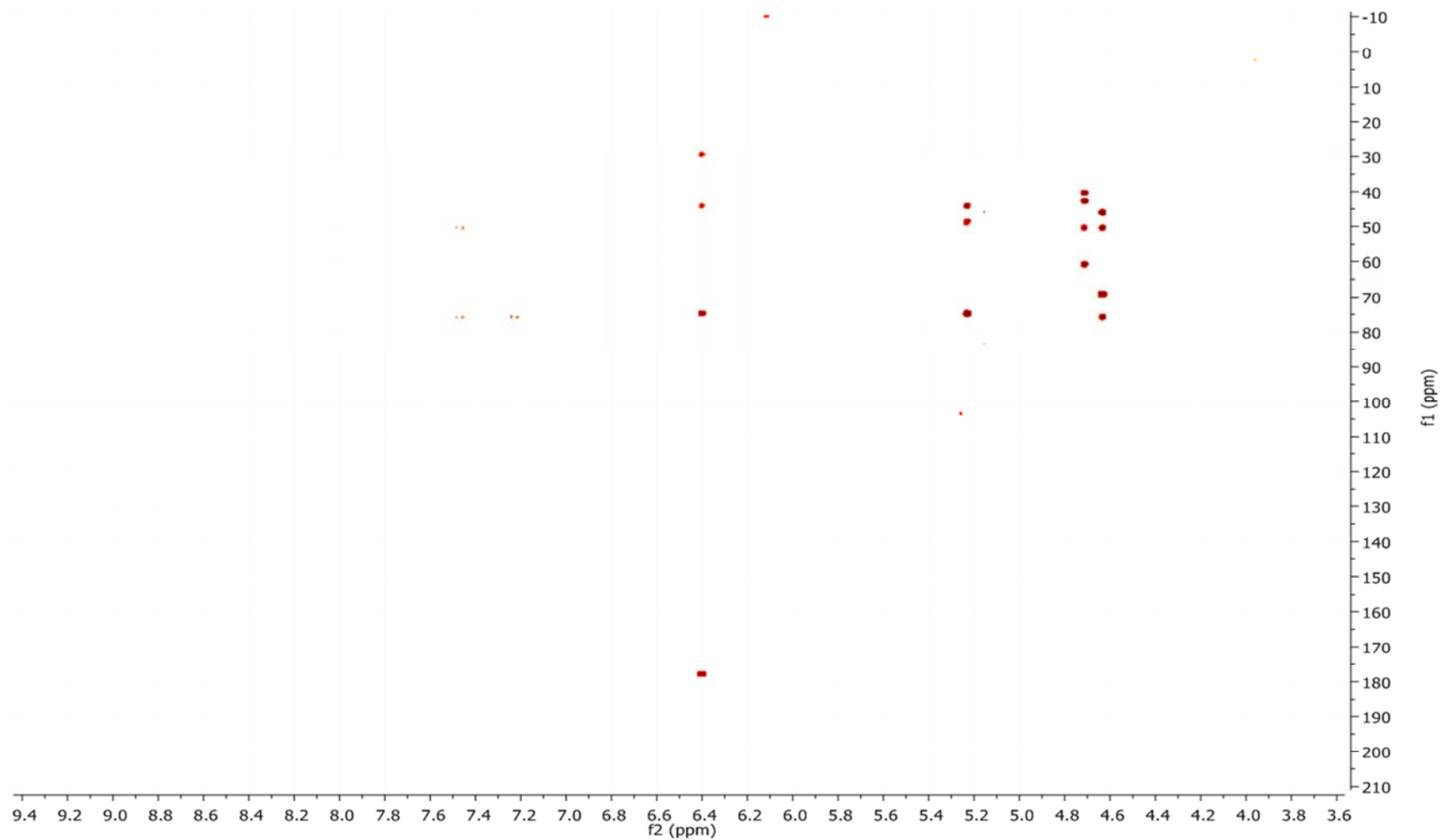
Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 100 MHz) da substância Bp1.

ANEXO D



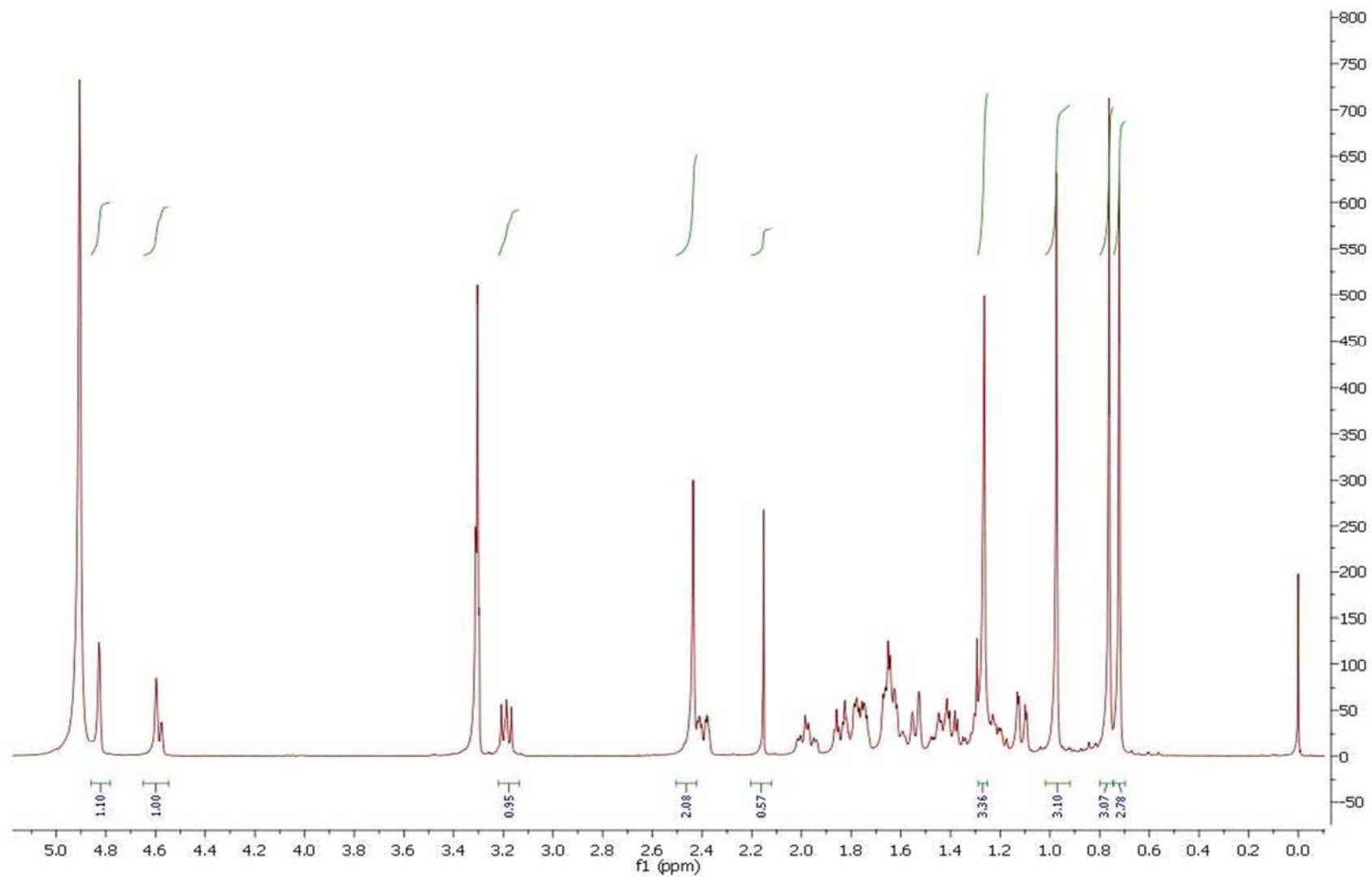
Mapa de contorno de HMQC (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H ; 100 MHz/ ^{13}C) da substância Bp1.

ANEXO E

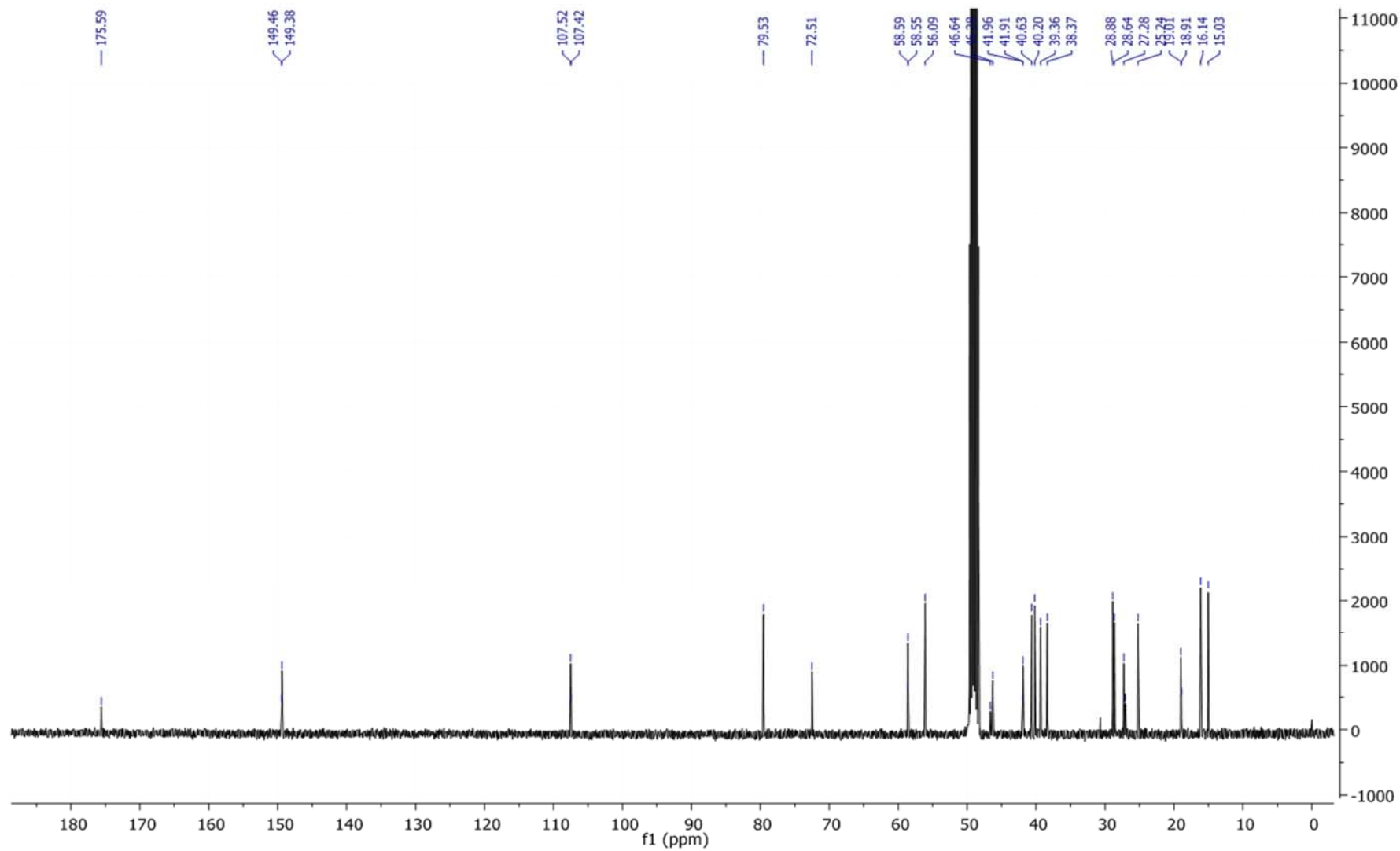


Mapa de contorno de HMBC (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H ; 100 MHz/ ^{13}C) da substância Bp1.

ANEXO F

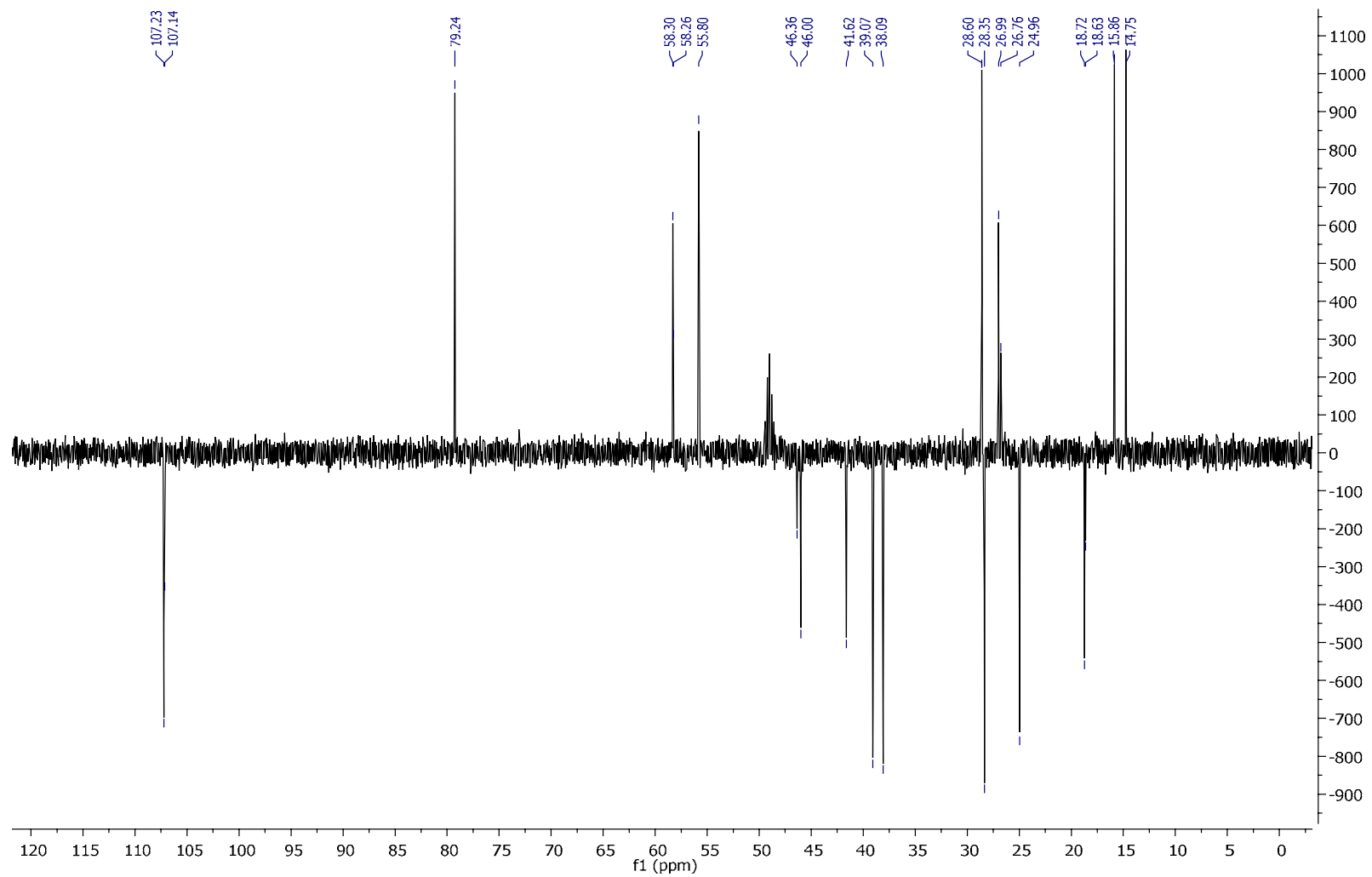
Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da substância Bp5.

ANEXO G

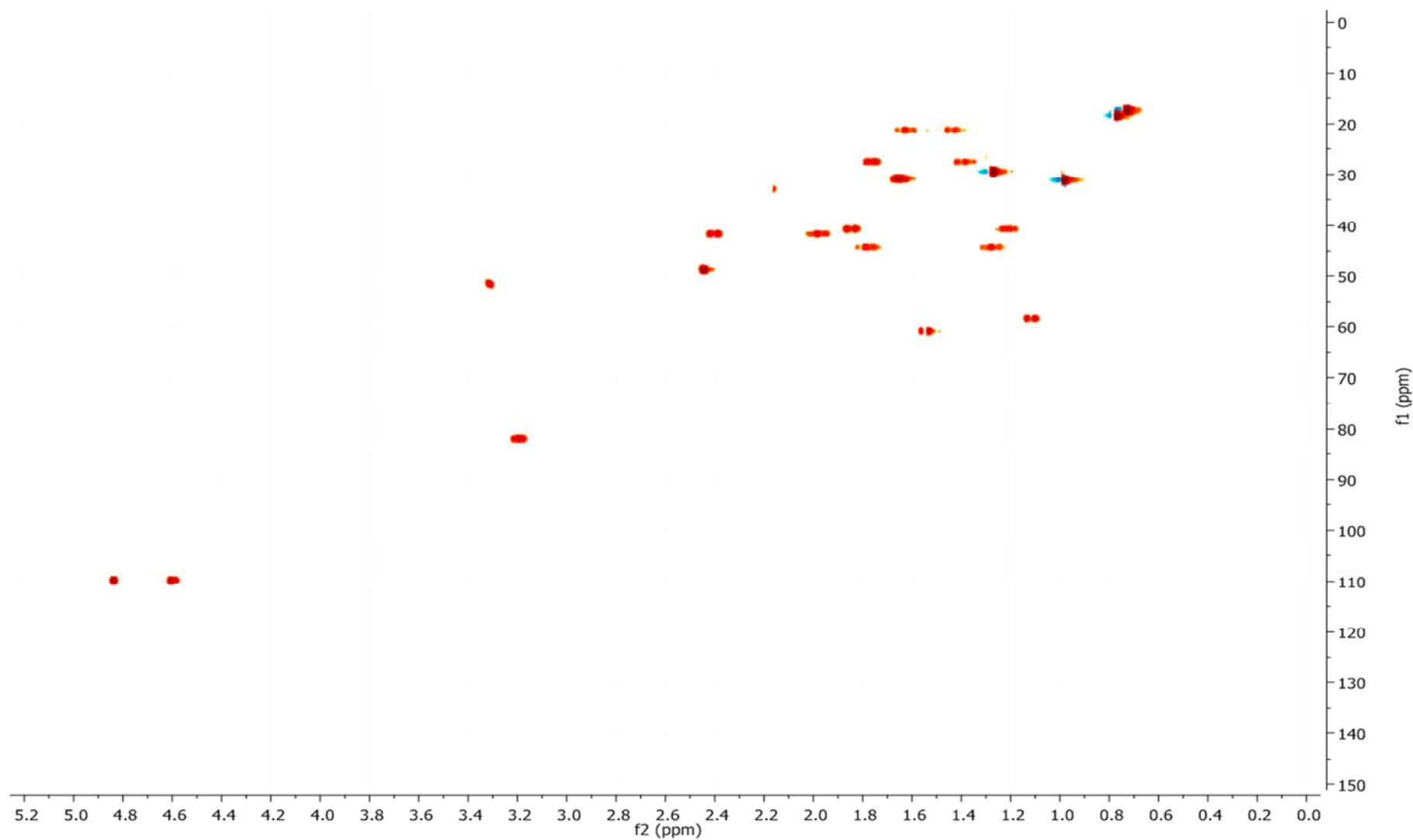


Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) da substância Bp5.

ANEXO H

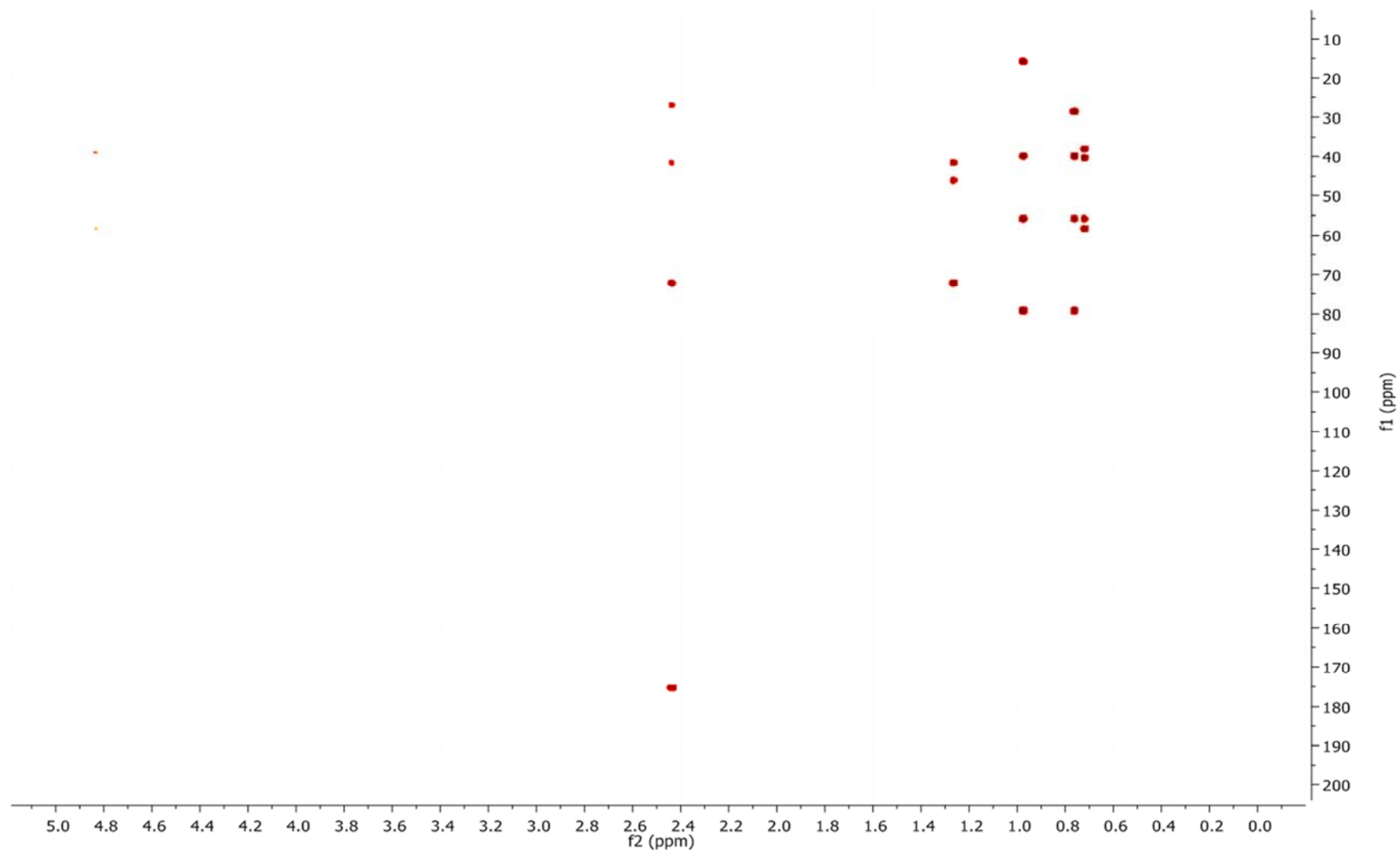
Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 135° (CD_3OD , 100 MHz) da substância Bp5.

ANEXO I



Mapa de contorno de HMQC (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H ; 100 MHz/ ^{13}C) da substância Bp5.

ANEXO J



Mapa de contorno de HMBC (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H ; 100 MHz/ ^{13}C) da substância Bp5.