

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

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

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*.

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 monoterpenos 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).

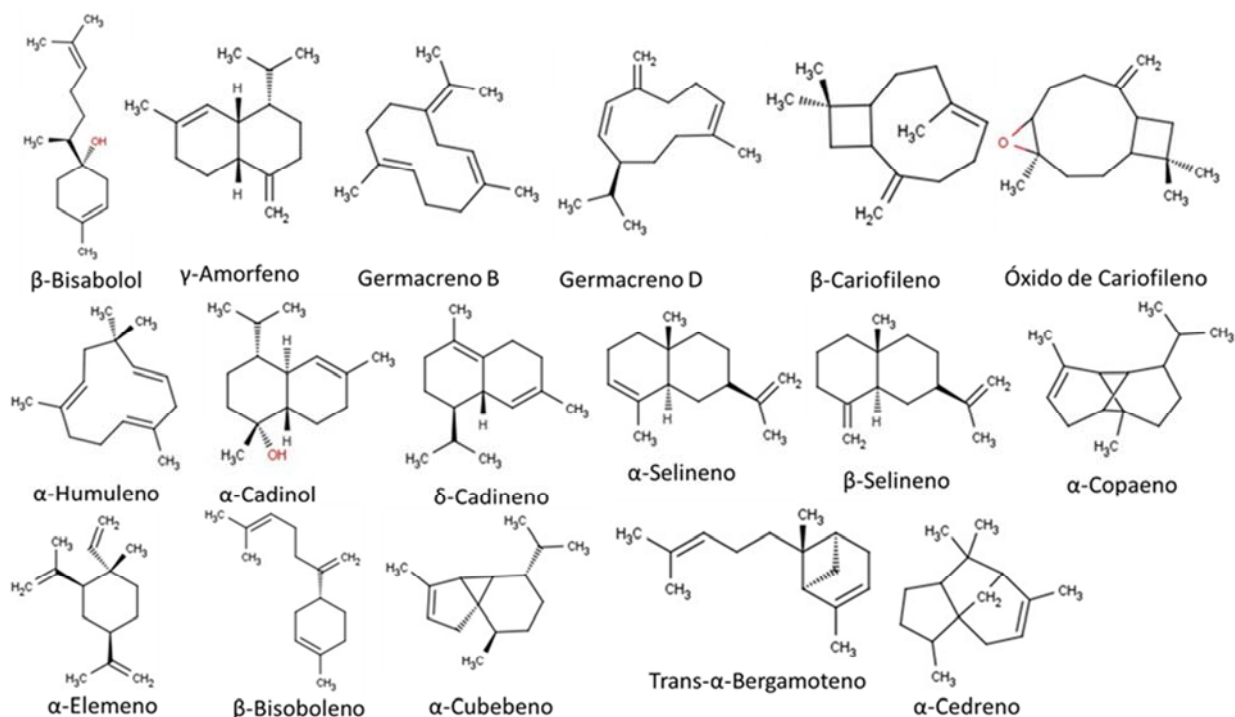


Figura 2. Principais sesquiterpenos encontrados no oleorresina de espécies de *Copaifera*.

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).

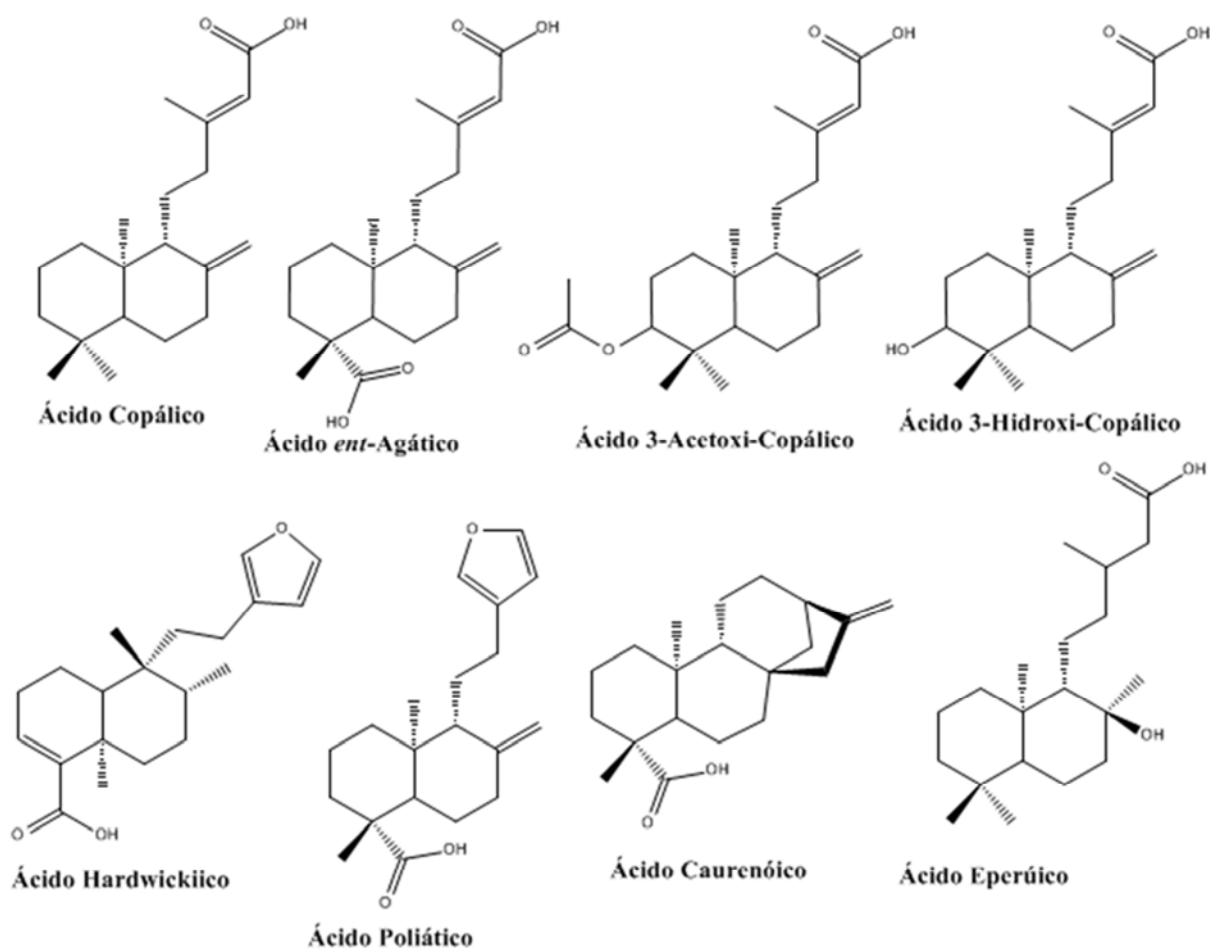


Figura 3. Principais diterpenos encontrados no oleorresina de espécies de *Copaifera*.

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).

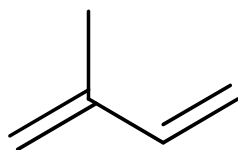


Figura 4. Unidade de isopreno

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

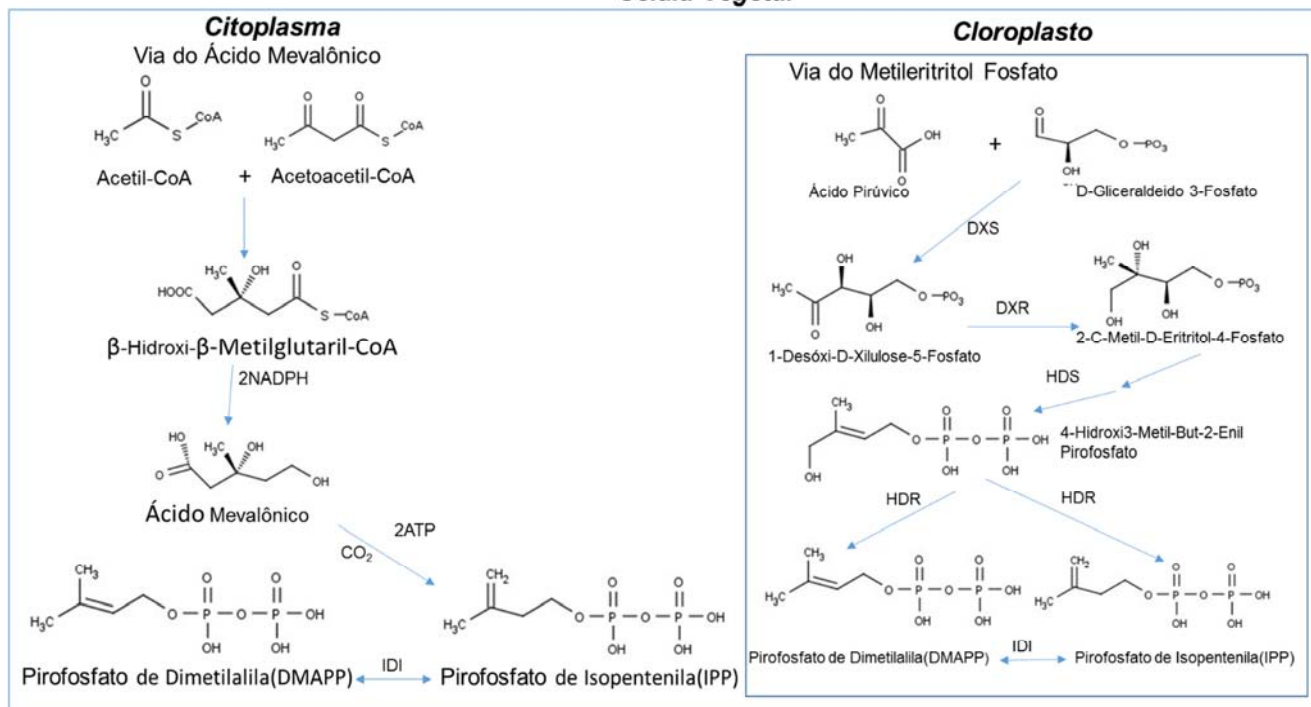


Figura 5. Esquema das rotas biossintéticas de formação das unidades de isopreno.

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.

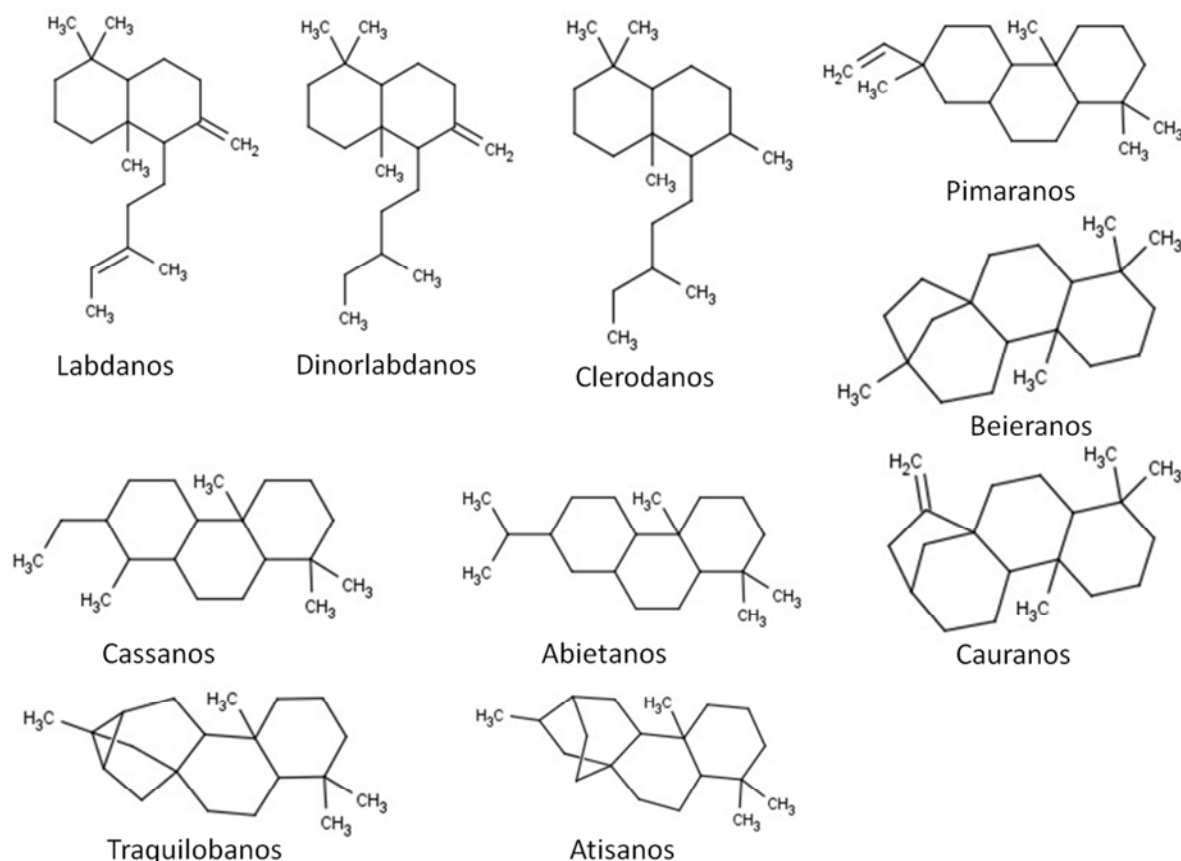


Figura 6. Esqueletos-base dos principais tipos de diterpenos.

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).

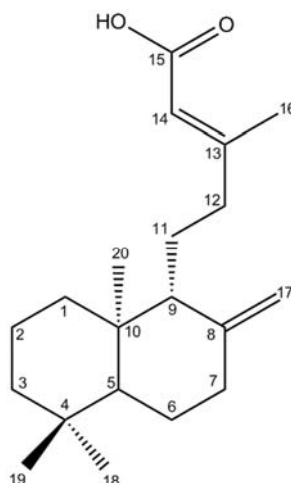


Figura 7. Estrutura química do ácido copálico.

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).

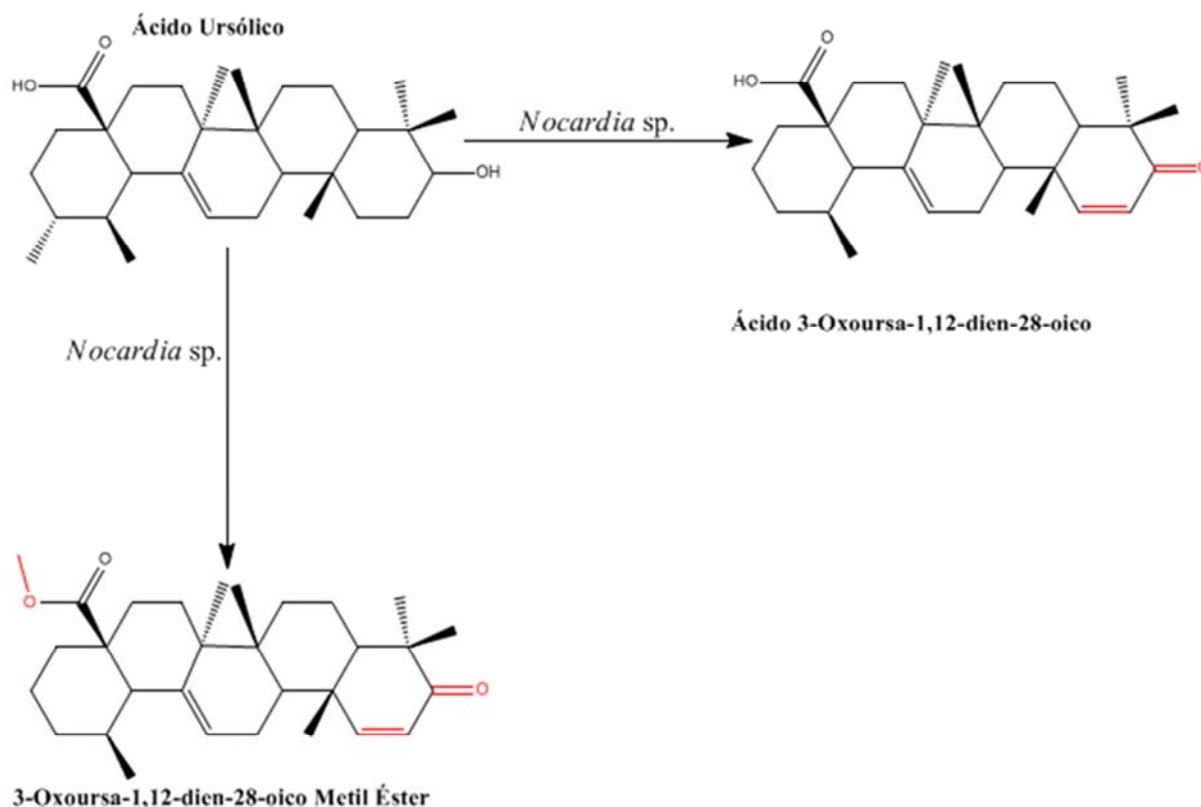


Figura 8. Biotransformação do ácido ursólico.

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).

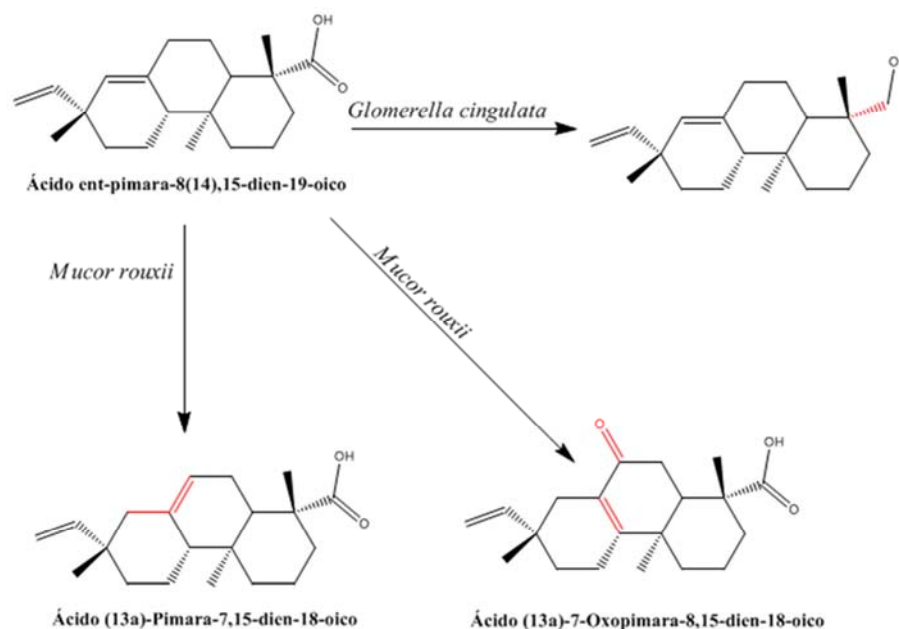


Figura 9. Biotransformação do ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien19-oico.

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).

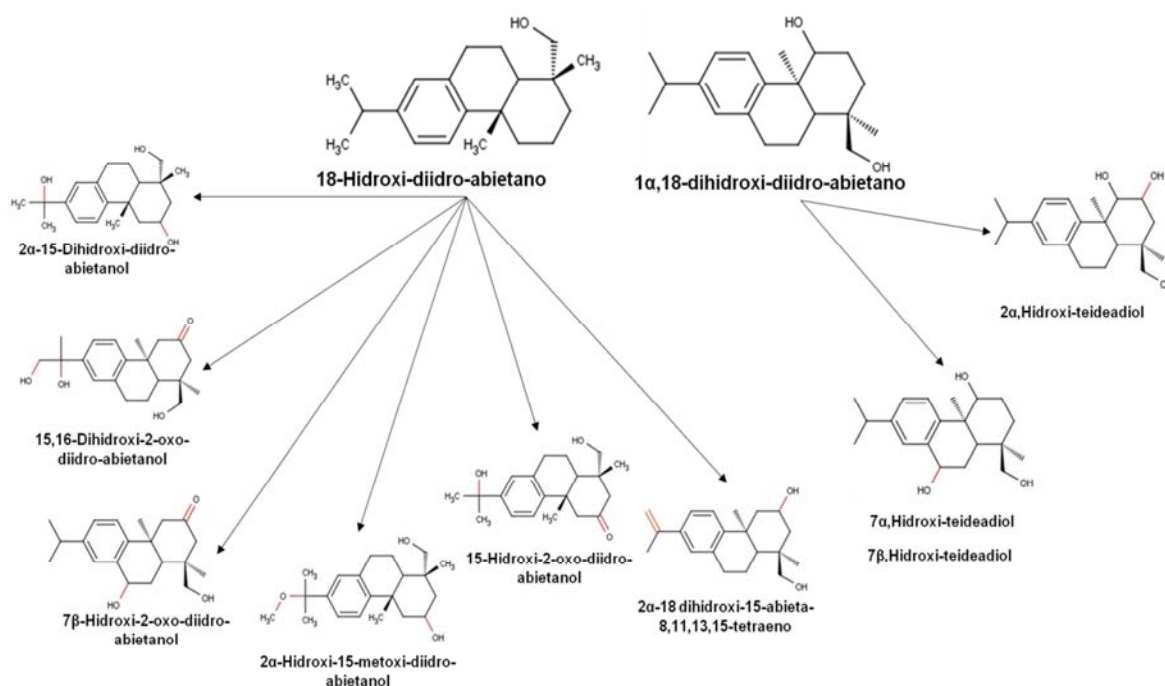


Figura 10. Biotransformação do diterpeno 18-hidroxi-diidro-abietano e do diterpeno 1α,18-dihidroxi-diidro-abietano.

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).

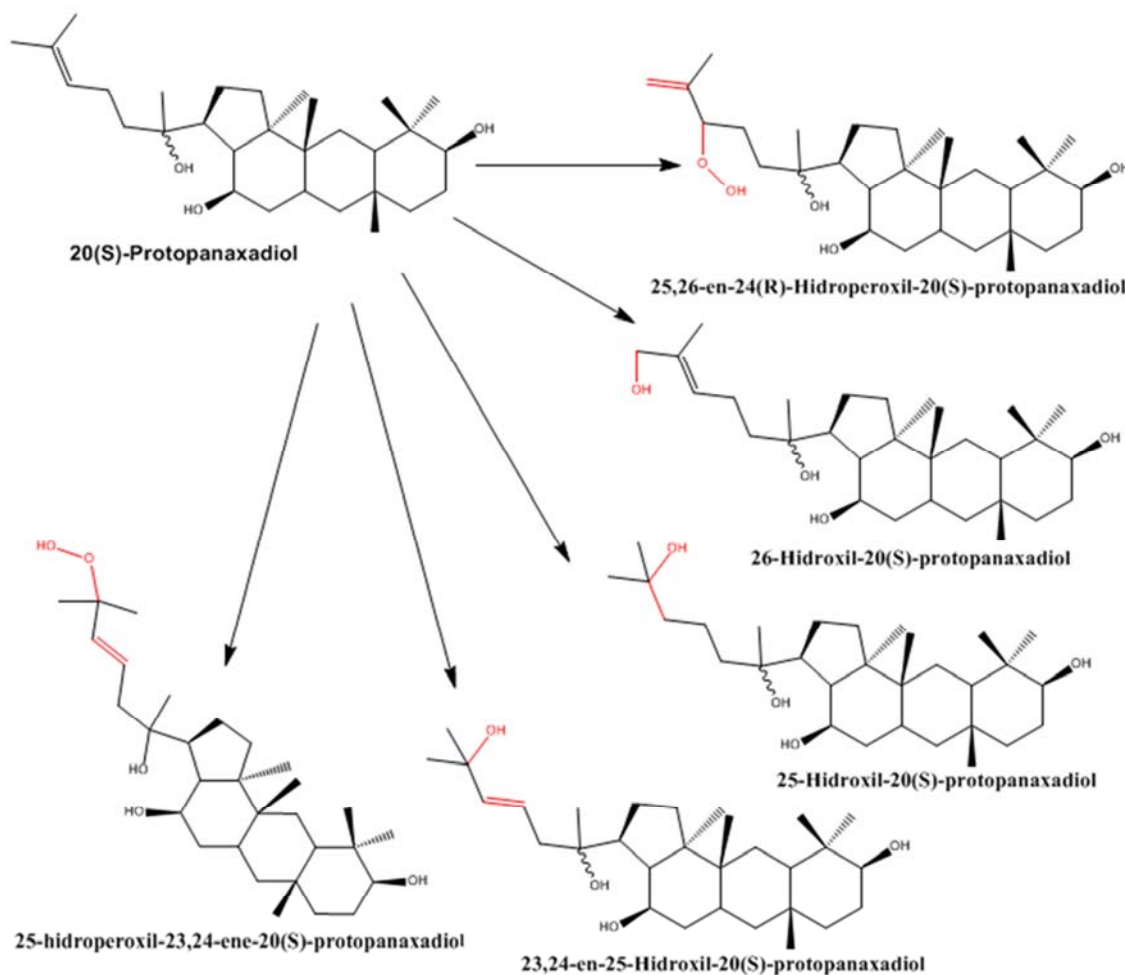


Figura 11. Biotransformação do triterpeno 20(S)-protopanaxadiol.

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).

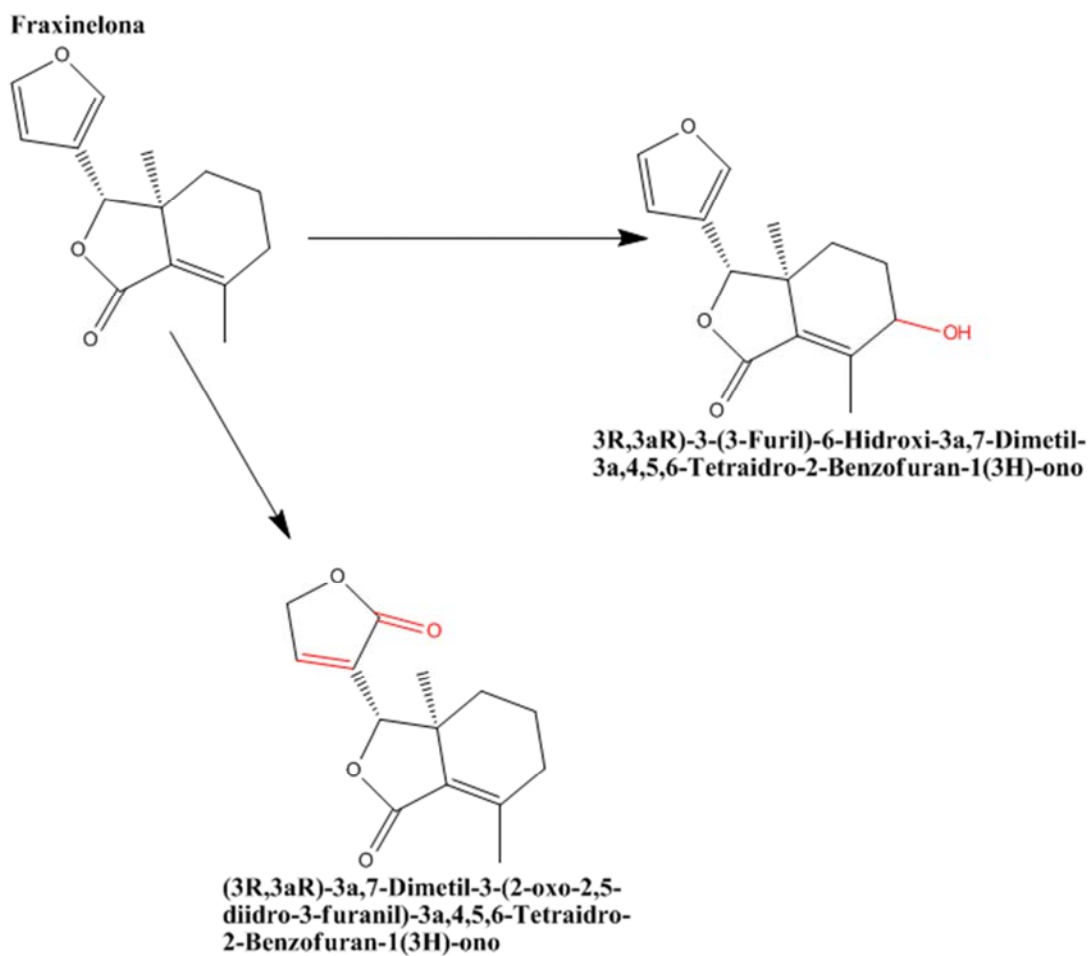


Figura 12. Biotransformação da fraxinelona.

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).

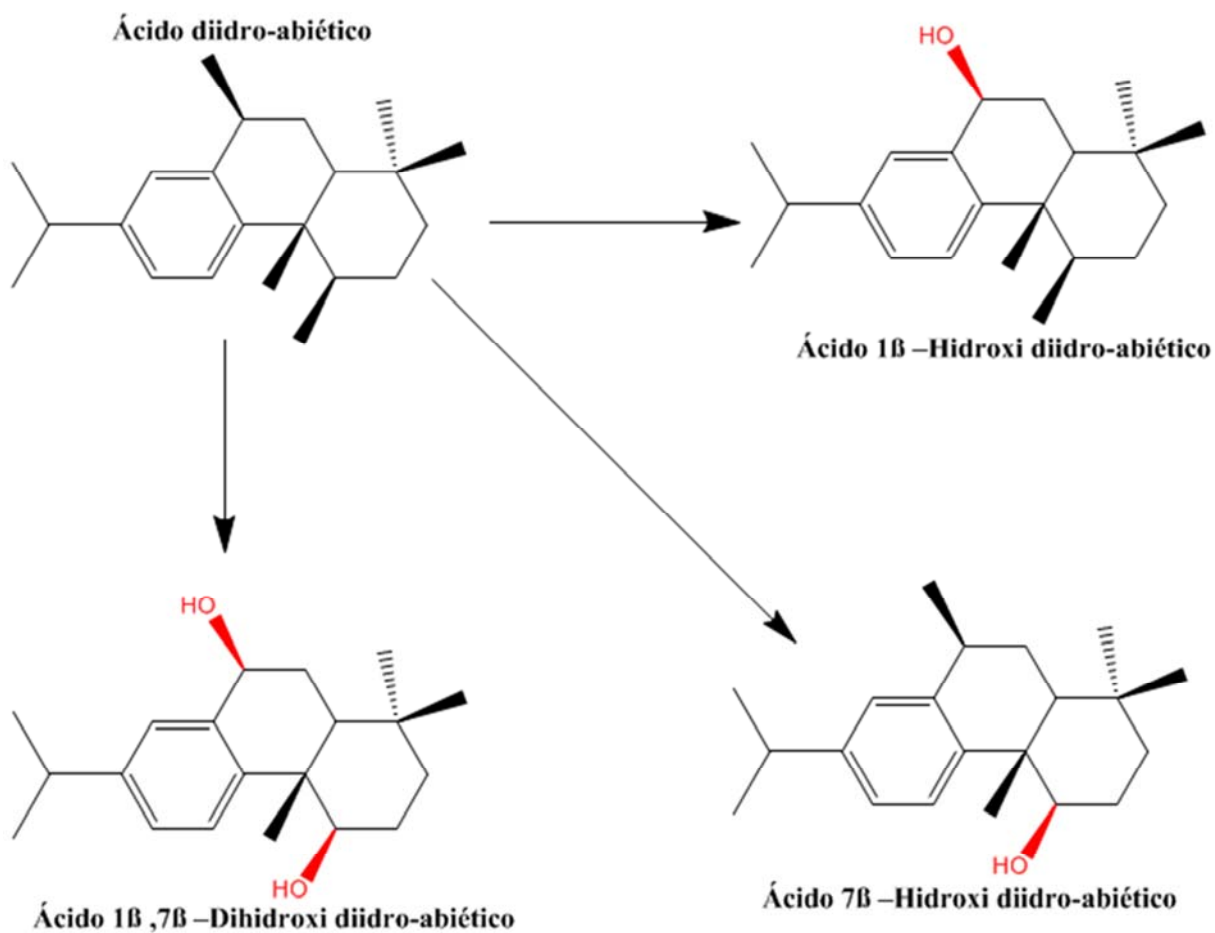


Figura 13. Biotransformação do diterpeno ácido diidro-abiético.

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).

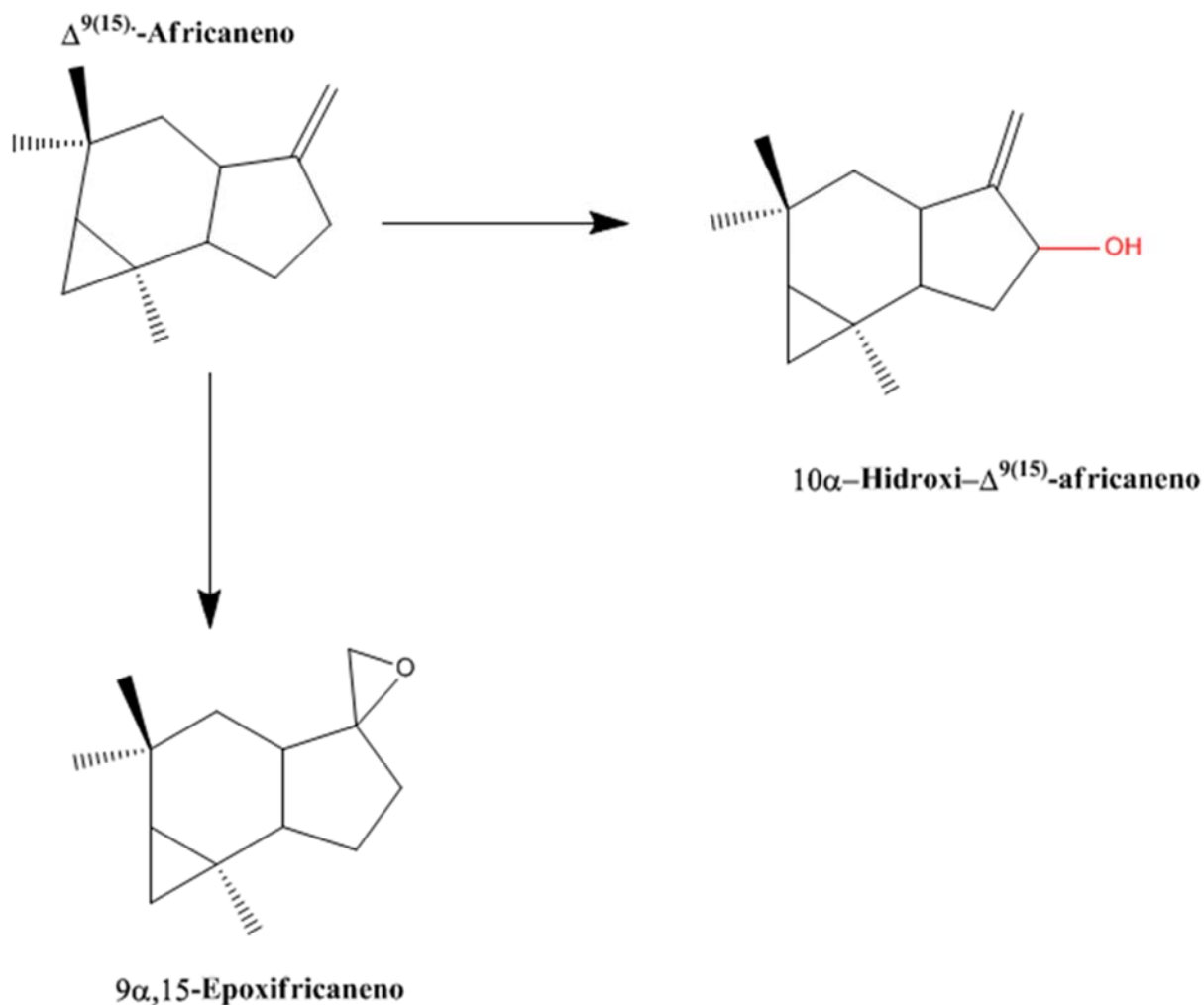


Figura 14. Biotransformação do sesquiterpeno $\Delta^{9,15}$ -africaneno.

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).

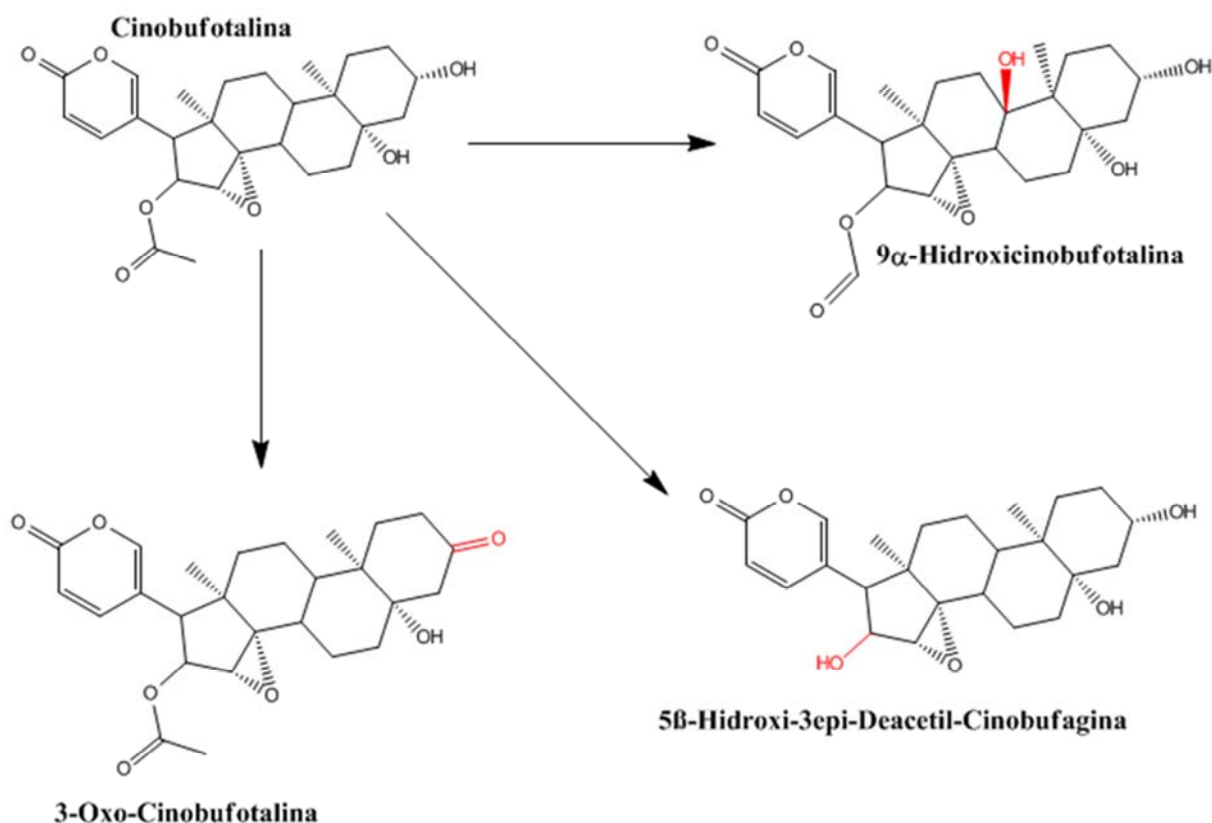


Figura 15. Biotransformação da substância cinobufotalina.

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).

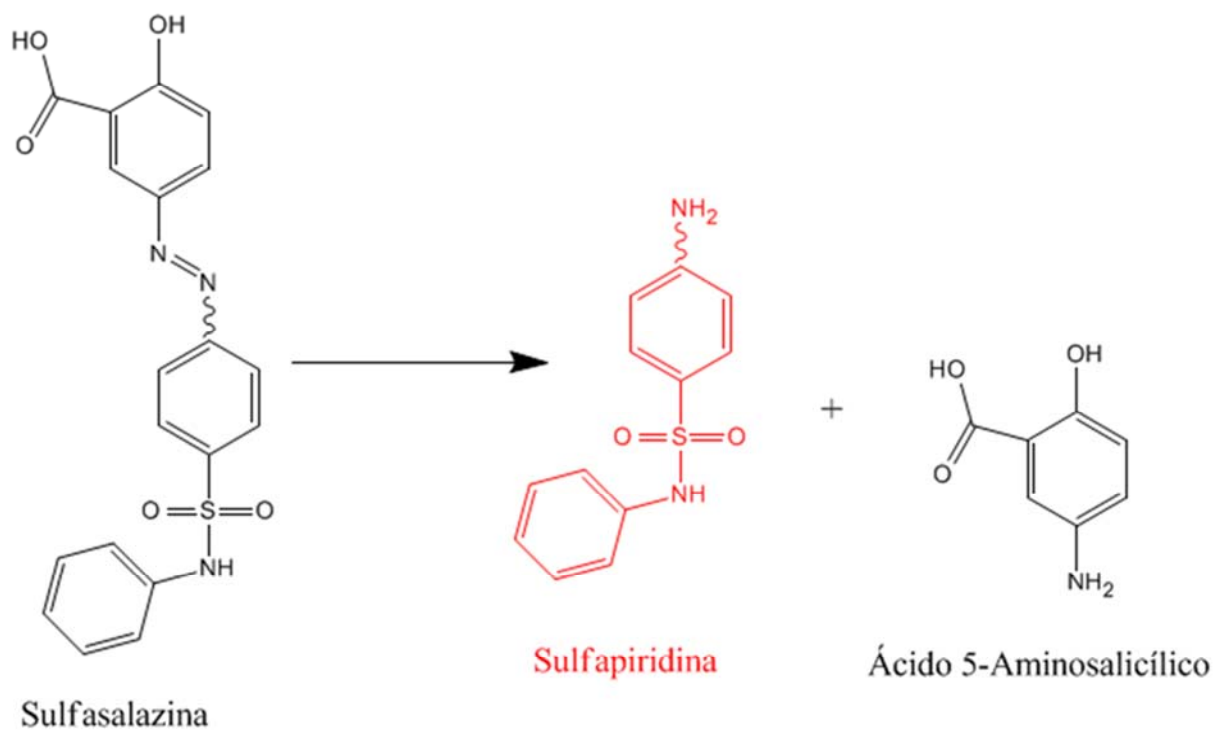


Figura 16. Biotransformação da sulfasalazina. Em vermelho está a substância que causa os efeitos colaterais.

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
Metametamina	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

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. $1\beta,7\beta$ -Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic 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 bromossesquiterpenes 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 alternate* 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 glycotecnology. **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.