UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biotransformações dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos

Tatiane Cruz de Carvalho

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biotransformações dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Tatiane Cruz de Carvalho

Orientadora: Dra. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/05/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Carvalho, Tatiane Cruz

Biotransformações dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos. Ribeirão Preto, 2016.
219 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientadora: **Furtado, Niege Araçari Jacometti Cardoso.**

1. Biotransformação. 2. β-cariofileno. 3. Ácido 3β-acetoxi-copálico. 4. Atividade citotóxica.

Tatiane Cruz de Carvalho

Biotransformações dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Dra. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho,

A minha irmã, Fabiana de Carvalho, que sempre esteve presente na minha vida de uma maneira inesquecível, minha companheira que infelizmente não está mais conosco, mas deixou cinco anjos que diminuem a dor dessa perda, meus amores Cauê, Mariana, Yuri, Maria Clara e Ariel. Tenho certeza de que ela está me protegendo e onde quer que ela esteja, está muito feliz e orgulhosa por mais esta conquista.

A minha mãe Mônica que é meu porto seguro, sempre me incentivando, acalmando, apoiando meus sonhos, ao meu irmão Marcelo que sempre está ao meu lado e ao meu pai Antônio.

Ao meu querido marido Paulo Roberto pelo apoio, companheirismo, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a vida, saúde e sabedoria e cre que com Ele sou capaz de tudo;

A minha orientadora Niege Araçari J. Furtado, por toda dedicação, incentivo e ensinamento todos esses anos. Exemplo de competência e dedicação, me ajudando no crescimento profissional e como pessoa;

Aos Professores do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, Dr. Jairo K. Bastos e Fernando B. da Costa pelo convívio diário e ensinamentos;

Ao Professor Dr. Vladmir Constantino Gomes Heleno da Universidade de Franca pelo padrão cedido;

A Profa. Dra. Raquel dos Santos, da Universidade de Franca, pela realização dos ensaios de citotoxicidade;

Aos técnicos do nosso laboratório em especial Mário e Waltinho que sempre nos ajudou prontamente em todos os momentos desse trabalho, pelas conversas, força e ensinamento sobre a vida e a técnica Angélica;

Aos técnicos dos laboratórios que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente, Vinícius e Thomaz.

Ao técnico Eduardo Crevelin que sempre esteve a disposição para me ajudar nas análises de CG e LC/MS, me ensinou muito com sua sabedoria;

Ao professor Luiz Alberto B. de Moraes, por ter me recebido muito bem em seu laboratório e sempre me ensinando, dando dicas para a melhoria desse trabalho;

Aos professores Antônio Eduardo Miller da FFCLRP, pela ajuda e ensinamento com as análises de espectrometria de massas.

A professora Dra. Priscyla Daniel Marcato do laboratório de Nanotecnologia da FCFRP-USP pelo auxilio nos experimentos da nanocápsula;

Ao professor Dr. Norberto P. Lopes pelas análises realizadas em seu laboratório;

Ao professor Dr. Sergio Ricardo Ambrósio pela disponibilidade e ajuda com as análises dos diterpeno;

Ao professor Dr. João Atílio Jorge da FFCLRP por ter cedido algumas linhagens de fungos filamentosos da sua micoteca;

A aluna Ana Paula Peti do laboratório de espectrometria de massas que sempre esteve a disposição e me ajudou nas análises no GC-MS;

A minha amiga e irmã de coração Eliane de Oliveira Silva que participou de todos os momentos desse trabalho e que sempre me deu forças para não desistir;

A todos os alunos do Laboratório de Farmacognosia, em especial aos amigos Erick, Ricardo, Tiago, Federico, Marcela, Ingrid, Federico e Gari, por todos os momentos, pelas boas conversas, trocas de experiências e favores que foram importantes na conclusão deste trabalho;

Aos amigos Rosana Casotti, Marcelo, Túlio, Jonas, Mariza, Cristiane Bernardes, Ricardo Furtado e Fabian pelo companheirismo, incentivo, vocês foram a minha família por muitos anos e foram muito especiais para minha formação, espero sempre estar com vocês;

A amiga Marília (vó) que me incentivou nos momentos finais, nos isolamentos, muito obrigada pela amizade;

A minha segunda família de Ribeirão Preto Júnya, Ana Paula, Lariça, Marcela, Nathanne e Ludmila. Minhas companheiras, vocês estiveram sempre comigo nos momentos bons e difíceis, sentindo na pele e me apoiando, caminhando de mãos dadas sempre. Nunca me esquecerei de vocês;

À Coordenação e professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local de desenvolvimento deste trabalho;

A minha família que sempre esteve comigo, minha mãe, meu irmão e sobrinhos, vocês são tudo para mim, obrigada pelo amor, carinho, dedicação sempre e incentivo para que eu não desistisse;

Ao meu marido Paulo Roberto que esteve comigo desde do início, nas provas de seleção, nos finais de semanas e madrugadas fazendo experimentos, meio de cultura, lavagem de vidraria, incentivando em todos os momentos, meu companheiro. Um amigo especial, conselheiro e muito sábio. Obrigada por estar sempre comigo em todos os momentos pela amizade, amor, críticas, torcida e apoio sempre, esse título também é seu!

Gradeço a todas as pessoas que de alguma maneira fizeram parte dessa história;

Á CAPES e à Fapesp pelo apoio financeiro concedido (Processo FAPESP 2012/01766-4).

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende".

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

CARVALHO, T. C. **Biotransformações dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos**. 2016. 197f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Oleorresinas de espécies de *Copaifera* sp são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira e estudos químicos e biológicos demonstram que diterpenos e sesquiterpenos estão entre os principais compostos bioativos das oleorresinas. Um importante fator para a avaliação da segurança e eficácia de fármacos é o conhecimento sobre o seu metabolismo, o qual pode ser adquirido por meio de estudos de biotransformação utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal. Os fungos filamentosos são organismos eucariotos e o aparato enzimático se assemelha com o dos mamíferos podendo contribuir para a elucidação de rotas metabólicas fornecendo informações sobre a formação de produtos farmacologicamente ativos, inativos ou tóxicos para o organismo. Esses estudos podem ainda contribuir para a obtenção de substâncias inéditas com potencial atividade biológica. O uso de bactérias da microbiota intestinal em estudos de metabolismo também é importante, pois os medicamentos e alimentos, quando ingeridos, podem ser metabolizados por essas bactérias que colonizam o trato gastrointestinal. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de fungos filamentosos e de bactérias do trato gastrointestinal para biotransformar o ácido 3β-acetoxi-copálico e β-cariofileno, presentes em oleorresinas de *Copaifera*, bem como isolar os produtos de biotransformação para avaliação da citotoxidade. Os experimentos de biotransformação foram realizados com 10 linhagens de fungos filamentosos e com 8 linhagens de bactérias do trato gastrointestinal. Os extratos obtidos em acetato de etila das culturas das biotransformações do diterpeno foram analisados por CLAE/DAD/CAD e CLAE-EM e os extratos obtidos em n-hexano e em acetato de etila das culturas das biotransformações do sesquiterpeno, bem como a fração volátil captada das culturas por microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace, foram analisados por CG-EM. Todos os micro-organismos testados foram capazes de biotransformar o ácido 3β-acetoxi-copálico e 9 produtos de biotransformação foram isolados, suas estruturas químicas foram identificadas, sendo seis inéditos e todos os produtos foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente às linhagens celulares de glândulas mamárias normais (MCF-10A) e de adenocarcinoma mamário (MCF-7). Todos os metabólitos do ácido 3β-acetoxi-copálico apresentaram menor citotoxidade frente as linhagens avaliadas do que o próprio ácido 3β-acetóxi-copálico. Os fungos *A. niger*, *A. brasiliensis* e as três linhagens de *Cunninghamella* foram capazes de biotransformar o β-cariofileno. Entretanto, como não foram obtidos bons rendimentos nesses processos, não foi possível isolar os produtos de biotransformação. Com os dados obtidos foi possível apenas elaborar uma proposta para a estrutura química de um dos produtos oriundos da biotransformação do β-cariofileno realizada com *C. echinulata* ATCC 9245.

Palavras-chave: Biotransformação, β-cariofileno, ácido 3β-acetoxi-copálico e atividade citotóxica

ABSTRACT

CARVALHO, T. C. **Biotransformation of the terpenes β-caryophyllene and 3β-acetoxy-copalic acid found in *Copaifera* sp oleoresins using filamentous fungi and bacteria from gastrointestinal tract and cytotoxic activity evaluation of the obtained derivatives.** 2016. 197f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Oleoresins from *Copaifera* sp species are widely used in Brazilian folk medicine and chemical and biological studies showed that diterpenes and sesquiterpenes are among the main bioactive compounds of oleoresins. An important factor for assessing the safety and efficacy of drugs is the knowledge about their metabolism, which can be acquired through biotransformation studies using filamentous fungi and human gut bacteria. Filamentous fungi are eukaryotic organisms and the enzymatic apparatus is similar to those of mammals and may contribute to the elucidation of metabolic pathways providing information on the production of pharmacologically active, inactive or toxic compounds to the organism. These studies may also contribute to provide new compounds with potential biological activity. The use of human gut bacteria in metabolism studies is also important because drugs and foods, when ingested, can be metabolized by bacteria that colonize the gastrointestinal tract. The aim of this study was to evaluate the potential of filamentous fungi and human gut bacteria to biotransform 3β-acetoxy-copalic acid and β-caryophyllene found in oleoresins from *Copaifera* as well as to isolate the biotransformation products for evaluation of their cytotoxicity. Biotransformation experiments were carried out with 10 filamentous fungi strains and 8 human gut bacteria strains. The ethyl acetate extracts obtained from the biotransformation processes of diterpene were analyzed by HPLC/DAD/CAD and HPLC-MS and n-hexane and ethyl acetate extracts obtained from the biotransformation processes of sesquiterpene, as well as the volatile fraction collected by solid phase microextraction headspace, were analyzed by GC-MS. All tested microorganisms were able to biotransform the 3β-acetoxy-copalic acid and 9 biotransformation products were isolated, their chemical structures were identified, from which six are new and all the products were evaluated for cytotoxic activity against normal mammary gland (MCF-10A) and breast adenocarcinoma (MCF-7) cell lines. All metabolites of 3β-acetoxy-copalic acid showed lower cytotoxicity against the evaluated cell lines than the 3β-acetoxy-copalic acid. The fungi *A. niger*, *A. brasiliensis* and the three *Cunninghamella* strains were able to biotransform β-caryophyllene. However, as good yields were not achieved in these processes, it was not possible to isolate the biotransformation products. The obtained data became possible to just make a proposal for the chemical structure of a product from the β-caryophyllene biotransformation process performed by *C. echinulata* ATCC 9245.

Keywords: Biotransformation, β-caryophyllene, 3β-acetoxy-copalic acid and cytotoxic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Estruturas químicas do β-cariofileno (**A**) e do ácido 3β-acetoxi-copálico (**B**)* ------ *3*

Figura 2: *Formação do β-cariofileno e óxido de cariofileno* ---------- *3*

Figura 3: *Biotransformação de Deidroepiandrosterona em testosterona* ---------- *9*

Figura 4: *Biotransformação de cortexolona por fungos filamentosos* ---------- *10*

Figura 5: *Biocatalisadores nos processos de biotransformação com terpenos* ---------- *11*

Figura 6: *Biotransformações de β-cariofileno em coelhos e biotransformações em micro-organismos* ---------- *13*

Figura 7: *Produtos de biotransformações do esclerol obtidos com os fungos filamentosos* - *14*

Figura 8: *Produtos de biotransformações de Manool com o fungo Mucor plumbeus* -------- *15*

Figura 9: *Produtos das biotransformações do ácido isocupréssico com Cunnighamella elegans, Mucor mucedo e Nocardia aurantia (Lin & Rosazza, 1998)* ---------- *16*

Figura 10*: Transformações microbianas de dois diterpeno labdanos* ---------- *17*

Figura 11: *Biotransformações do ácido imbricatolico* ---------- *18*

Figura 12*: Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas da primeira coluna realizada com a oleorresina de C. langsdorfii e ácido 3β-acetoxi-copálico* ------- *48*

Figura 13*: Perfil cromatográfico da oleorresina de C. langsdofii* ---------- *48*

Figura 14*: Cromatograma do padrão (ácido 3β-acetoxi-copálico)* ---------- *49*

Figura 15*: Cromatogramas das frações obtidas da 1° coluna cromatográfica realizada com a oleorresina de C. langsdorfii* ---------- *49*

Figura 16*: Cromatografia em camada delgada comparativa do padrão e das frações obtidas da coluna realizada com a Fração 3.* ---------- *50*

Figura 17*: Cromatogramas das frações obtidas da 2° coluna cromatográfica da Fração 3* *51*

Figura 18*: Estrutura química do ácido 3β-acetoxi-copálico (ácido ent-3β-acetoxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico) com dados de correlações observadas no HMBC* ---------- *52*

Figura 19*: Média do número de esporos/mL em diferentes meios de cultura* ---------- *54*

Figura 20*: Curvas de crescimento de Aspergillus em meio pré-fermentativo* ---------- *56*

Figura 21*: Curvas de crescimento de Cunninghamella em meio pré-fermentativo* ---------- *56*

Figura 22*: Curvas de crescimento de C. lunata, B. bassiana e M. rouxii em meio pré-fermentativo* ---------- *57*

Figura 23*: Curvas de crescimento de A. brasiliensis em meios fermentativos* ---------- *58*

Figura 24*: Curvas de crescimento do gênero Aspergillus no meio fermentativo Koch´s K1* *58*

***Figura 25**: Curvas de crescimento de C. elegans em meios fermentativos ---------- 59*

***Figura 26**: Curvas de crescimento de fungos filamentosos no meio fermentativo Koch´s K1 59*

***Figura 27:** Curvas de crescimento das bactérias do trato gastrointestinal---------- 61*

***Figura 28**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com A. brasiliensis do 1° ao 9° dia ---- 65*

***Figura 29**: Estrutura química do derivado **Ab5** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. brasiliensis---------- 66*

***Figura 30**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com C. elegans do 1° ao 6° dia --------- 70*

***Figura 31**: Estrutura química do derivado **Ce12** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo C. elegans 10028b ---------- 71*

***Figura 32**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com C. echinulata ATCC 8688A do 1° ao 2° dia ---------- 75*

***Figura 33:** Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com C. elegans ATCC 9245, 1° dia, obtidos por HPLC-CAD.. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)---------- 75*

***Figura 34**: Estrutura química do derivado **Ce9** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo C. echinulata---------- 76*

***Figura 35**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com A. niger do 1° ao 8° dia obtidos por HPLC-CAD.---------- 79*

***Figura 36**: Estrutura química do derivado **An15** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. niger ---------- 80*

***Figura 37:** Estrutura química do derivado **An16** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. niger ---------- 82*

***Figura 38**: Estrutura química do derivado **An17** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. niger ---------- 84*

***Figura 39**: Estrutura química do derivado **An18** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. niger ---------- 86*

***Figura 40**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com C. lunata do 1° ao 8° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)---------- 90*

***Figura 41**: Estrutura química do derivado **Cl24** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo C. lunata---------- 91*

***Figura 42**: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com A. phoenicis 1° e 5° dia. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®) ---------- 94*

***Figura 43**: Estrutura química do derivado **Ap23** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo A. phoenicis ---------- 95*

***Figura 44**: Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com A. phoenicis, 1° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®) ---------- 98*

***Figura 45**: Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com B. bassiana, 1º, 5º e 10º dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)---------- 99*

***Figura 46**: Estrutura química dos metabólitos isolados da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelos fungos filamentosos ---------- 102*

***Figura 47**: Cromatogramas dos extratos da biotransformação com L. acidophilus no meio de cultivo MRS suplementado com glicose e Inulina, após 1 hora da adição do substrato, obtidos por HPLC-CAD; **A)** Cromatograma do extrato controle; **B)** Cromatograma do extrato da biotransformação. ---------- 104*

***Figura 48**: Cromatogramas dos extratos da biotransformação com Bifidobacterium sp no caldo MRS suplementado com inulina, após 3 horas da adição do substrato, obtidos por HPLC-CAD; **A)** Cromatograma do extrato controle; **B)** Cromatograma do extrato da biotransformação ---------- 104*

***Figura 49**: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 24 horas obtidos por LC-MS, Tic; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com B. longum ---------- 106*

***Figura 50**: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 6 horas obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com Bifidobacterium sp ---------- 106*

***Figura 51**: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 24 horas obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com E. coli---------- 107*

***Figura 52**: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas, obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com L. rhamnosus. ---------- 107*

***Figura 53**: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 1 hora, obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com L. acidophilus. ---------- 108*

Figura 54: *Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas, obtidos por LC-MS;* ***A)*** *Controle com DMSO;* ***B)*** *Biotransformação com L. acidophilus ATCC 53544----------109*

Figura 55: *Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas; obtidos por LC-MS;* ***A)*** *Controle com DMSO;* ***B)*** *Biotransformação com L. johnsonii. ----------109*

Figura 56*: Correlações estrutura-fragmentação utilizadas para a identificação de alguns grupos funcionais das estruturas dos produtos de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico promovida por L. johnsonii. ----------110*

Figura 57*: Espectros de massas obtidos com ionização por electrospray no modo negativo dos íons precursores de* ***A)*** *m/z 335 (27eV),* ***B)*** *m/z 333 (29eV),* ***C)*** *m/z 377 (40eV),* ***D)*** *m/z 319 (35eV),* ***E)*** *m/z 317 (35eV),* ***F)*** *m/z 317 (33eV),* ***G*** *m/z 363 (35eV),* ***H*** *m/z 421 (35eV).---111*

Figura 58*: Proposta para a formação dos íons produtos de (m/z 219) e de (m/z 99)--------112*

Figura 59*: Proposta para a formação do íon produto de m/z 111----------113*

Figura 60*: Proposta para a formação dos íons produtos de m/z 319 e de m/z 97----------113*

Figura 61*: Proposta para a formação do íon produto de m/z 217----------114*

Figura 62*: Cromatograma do extrato dos micélios, após 5 dias de biotransformação do* ***β cariofileno*** *obtido por GC-MS ----------121*

Figura 63*: Cromatogramas dos extratos n-hexânicos, obtidos por GC-MS após 5 dias da adição do substrato;* ***A)*** *Cromatograma do extrato controle (etanol);* ***B)*** *Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno. ----------122*

Figura 64*: Cromatograma da fração volátil no 5° dia da biotransformação obtido por GC-MS ----------122*

Figura 65*: Cromatogramas dos extratos n-hexânicos obtidos por GC-MS após 3 dias da adição do substrato;* ***A)*** *Cromatograma do extrato controle (etanol);* ***B)*** *Cromatograma do extrato do controle do β-cariofileno com o meio de cultura (Koch's 1);* ***C)*** *Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno ----------123*

Figura 66*: Espectros de massas das substâncias majoritárias da figura 65C. A) T_R=14,4; B) T_R=19,4; C) T_R= 25,6; D) T_R= 27,2; E) T_R= 28,1; F) T_R= 29,1; G) T_R= 31,5; H) T_R= 32,7 minutos. ----------124*

Figura 67*: Substância proposta do metabólito majoritário da biotransformação com β-cariofileno ----------125*

Figura 68*: Proposta para a formação dos íons de m/z 109, m/z 81, m/z 95 a partir do íon molecular de m/z 218 (T_R 25,6 minutos) ----------125*

Figura 69: *Cromatogramas dos extratos n-hexânicos obtidos por GC-MS após 4 dias da adição do substrato;* ***A)*** *Cromatograma do extrato do controle do β-cariofileno com o meio de cultura (Koch's K1);* ***B)*** *Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno.* ---------- *126*

Figura 70*: Espectros de massas.* ***A)*** *T_R de 18,4 minutos;* ***B)*** *T_R de 26,7 minutos.* ---------- *126*

Figura 71*: Cromatograma da fração volátil no 2° dia da biotransformação obtido por GC-MS* ---------- *127*

Figura 72*: Cromatograma do extrato n-hexânico da biotransformação do β-cariofileno, após 5 dias da adição do substrato, obtido por GC-MS.* ---------- *128*

Figura 73*: Espectro de massas do produtos de biotransformação com tempo de retenção de 16,6 minutos.* ---------- *128*

Figura 74*: Cromatogramas das frações voláteis da biotransformação do β-cariofileno por C. echinulata .* ***A)*** *1° dia,* ***B)*** *2° dia* ---------- *128*

Figura 75*: Cromatograma do extrato em acetato de etila da biotransformação do β-cariofileno, no 1° dia do processo, obtido por GC-MS* ---------- *129*

Figura 76*: Cromatograma da fração volátil da biotransformação do β-cariofileno no 5° dia, obtido por GC-MS.* ***A)*** *Cromatograma completo;* ***B)*** *Ampliação do cromatograma nos picos majoritários* ---------- *129*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 *- Cromatografia Líquida sob pressão reduzida da oleorresina de C. langsdorffii - 27*

Tabela 2 *- Cromatografia líquida sob pressão reduzida da* ***Fração 3*** *---------- 28*

Tabela 3 *– Fungos filamentosos utilizados nas biotransformações, origem, fonte do isolamento e aplicações ---------- 30*

Tabela 4 *– Bactérias utilizadas nas biotransformações, origem, fonte do isolamento e aplicações ---------- 31*

Tabela 5*: Bactérias, meios de cultura, tempo de crescimento e atmosfera utilizados nos ensaios ---------- 37*

Tabela 6*: Gradiente de eluição utilizado para as análises dos extratos obtidos das biotransformações do ácido 3β-acetóxi-copálico ---------- 43*

Tabela 7: *Frações obtidas na cromatografia líquida sob pressão reduzida da oleorresina de Copaifera langsdorfii ---------- 47*

Tabela 8*: Frações obtidas na cromatografia líquida sob pressão reduzida da* ***Fração 3*** *---- 50*

Tabela 9*: Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz), HMQC e HMBC obtidos em $CDCl_3$ referentes à substância* ***3.2 A*** *(δ=ppm)---------- 53*

Tabela 10*: Valores de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do ácido 3β-acetóxi-copálico e β-cariofileno ---------- 62*

Tabela 11*: Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz), HMQC e HMBC obtidos em $CDCl_3$ referentes à substância* ***Ab5*** *(δ=ppm) ---------- 67*

Tabela 12*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***Ce12*** *(δ=ppm) ---------- 71*

Tabela 13*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***Ce9*** *(δ=ppm)---------- 76*

Tabela 14*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***An15*** *(δ=ppm) ---------- 81*

Tabela 15*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***An16*** *(δ=ppm) ---------- 83*

Tabela 16*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***An17*** *(δ=ppm) ---------- 85*

Tabela 17*: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância* ***An18*** *(δ=ppm) ---------- 88*

***Tabela 18**: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Cl24** (δ=ppm)* ---------- *92*

***Tabela 19**: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Ap23** (δ=ppm)* ---------- *96*

***Tabela 20**: Íons produtos obtidos na fragmentação dos produtos de biotransformação detectados nos extratos dos processos realizados com bactérias do trato gastrointestinal e estruturas químicas propostas.* ---------- *115*

***Tabela 21**: Valores de CI_{50} e I.S. obtidos para o ácido 3β-acetoxi-copálico e seus metabólitos frente as linhagens celulares normais e tumorais* ---------- *119*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	*American Type Culture Collection*
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
*d**	Dupleto
D.B.O.	Demanda bioquímica de oxigênio
*dd**	Duplo dupleto
Dept	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	(*do inglês Electrospray Ionization*) - Ionização por Eletrospray
ESI-TOF	Espectros de massas obtidos em equipamento com fonte de Ionização por Eletrospray e analisador de massas Tempo de Vôo
EtOH	Etanol
HMBC	*Heteronuclear multiple bond coherence*
HMQC	*Heteronuclear multiple quantum coherence*
HPLC	(*do inglês High Performance Liquid Chromatography*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-Corona CAD	(*do inglês High Performance Chromatography-Charged Aerosol Detector*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector Corona CAD®

* Os termos traduzidos (Simpleto, Dupleto, Tripleto, multipleto, RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C) foram estabelecidos de acordo com a Comissão de Nomenclatura e Tradução em RMN da AUREMN (Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear)

HPLC-DAD	(*do inglês High Performance Chromatography-Diode Array Detector*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diôdos
HPLC-MS	(*do inglês High Performance Chromatography-Mass Spectrometry*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
HPLC-MS/MS	(*do inglês High Performance Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
Hz	Hertz
IC_{50}	Concentração Inibitória para 50% da população
J	Constante de Acoplamento em Hz
L-cisteína/HCl	Cloridrato de L-cisteína
*m**	Multipleto
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MS	(*do inglês Mass Spectrometry*) - Espectrometria de Massas
MS/MS	(*do inglês Tandem Mass Spectrometry*) - Espectrometria de Massas Sequencial
m/z	Razão entre a massa atômica de um íon pelo seu número de cargas
NRRL	*National Regional Research Laboratory*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
*s**	Simpleto
SPE	Extração de fase sólida
SPME	Microextração de fase sólida

*t**	Tripleto
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volt
W	Watt
XTT	Sal tetrazólio (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio)

LISTA DE SIMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico (ppm)
λ	Comprimento de onda
®	Marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO ---------- i
ABSTRACT ---------- ii
LISTA DE FIGURAS ---------- iii
LISTA DE TABELAS ---------- viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ---------- x
LISTA DE SIMBOLOS ---------- xiii
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA ---------- 1
1.1 Oleorresina de *Copaifera* sp: Composição química, atividades biológicas e uso popular ---------- 1
1.2 Biotransformação e sua importância ---------- 4
1.3 Biotransformação de terpenos ---------- 11
1.4 Potencial citotóxico ---------- 18
2 OBJETIVOS ---------- 22
2.1 Objetivo geral ---------- 22
2.2 Objetivos específicos ---------- 22
3 MATERIAIS E MÉTODOS ---------- 23
3.1 Equipamentos utilizados ---------- 23
3.2 Materiais, reagentes, solventes e antibióticos utilizados ---------- 24
3.3 Meios de cultura utilizados ---------- 25
3.3.1 Meios sólidos ---------- 25
3.3.2 Meios líquidos ---------- 25
3.4 Aquisição do β-cariofileno ---------- 26
3.5 Obtenção do ácido 3β-acetoxi-copálico ---------- 26
3.6 Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação ---------- 29
3.7 Fungos filamentosos ---------- 32
3.7.1 Preservação ---------- 32
3.7.2 Produção de esporos ---------- 32

3.7.3 Curva de crescimento dos fungos filamentosos ---------- 32

a) Meio Pré-fermentativo ---------- 32

b) Meios fermentativos ---------- 33

3.7.4 Determinação dos valores de concentração inibitória mínima do β-cariofileno e do ácido 3β-acetoxi-copálico frente aos fungos filamentosos ---------- 33

3.7.5 Processos de biotransformação com os fungos filamentosos ---------- 35

3.8 Bactérias ---------- 36

3.8.1 Preservação e ativação ---------- 36

3.8.2 Padronização do inóculo e curvas de crescimento bacteriano ---------- 38

3.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima dos substratos frente as bactérias do trato gastrointestinal ---------- 38

3.8.4 Processos de biotransformação com bactérias do trato gastrointestinal ---------- 40

3.9 Obtenção dos extratos brutos e microextração em fase sólida das biotransformações e controles ---------- 41

3.10 Avaliação dos perfis químicos dos extratos obtidos ---------- 42

3.11 Biotransformações em escala ampliada, isolamento e determinação estrutural dos metabólitos obtidos ---------- 44

3.12 Ensaios citotóxicos ---------- 46

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES ---------- 47

4.1 Isolamento do ácido 3β-acetoxi-copálico ---------- 47

4.2 Condições de cultivo dos micro-organismos avaliados ---------- 54

4.2.1 Produção de esporos dos fungos filamentosos ---------- 54

4.2.2 Produção de biomassa dos fungos filamentosos em meio pré-fermentativo -------- 55

4.2.3 Produção de biomassa dos fungos filamentosos em meio fermentativo ---------- 57

4.2.4 Padronização da absorbância do inóculo das bactérias do trato gastrointestinal --- 60

4.2.5 Curvas de crescimento das bactérias do trato gastrointestinal ---------- 60

4.3 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima ---------- 61

4.4 Avaliação dos processos de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico e elucidação dos metabólitos obtidos---------- 63

4.4.1 Biotransformação pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*---------- 63

4.4.2 Biotransformação pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b---------- 68

4.4.3 Biotransformação pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e 9245 ---------- 73

4.4.4 Biotransformação pelo fungo *Aspergillus niger* VKMF 119---------- 79

4.4.5 Biotransformação pelo fungo *Curvularia lunata* ATCC 12017 ---------- 89

4.4.6 Biotransformação pelo fungo *A. phoenicis* ---------- 94

4.4.7 Biotransformação pelo fungo *A. alliaceus* ATCC 10060---------- 97

4.4.9 Biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelas bactérias do trato gastrointestinal ---------- 103

4.5 Avaliação do potencial citotóxico do ácido 3β-acetoxi-copálico e dos metabólitos obtidos nos processos de biotransformação ---------- 116

4.6 Avaliação dos processos de biotransformação do β cariofileno ---------- 120

4.6.1 Biotransformação do β cariofileno pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*---------- 120

4.6.2 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 9245)---------- 122

4.6.3 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella elegans* (ATCC 10028b) ---------- 125

4.6.4 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 8688A) ---------- 127

4.6.5 Biotransformação por *Aspergillus niger* ---------- 129

5 CONCLUSÕES---------- 130

6 REFERÊNCIAS ---------- 132

7 APÊNDICES ---------- 145

Introdução

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Oleorresina de *Copaifera*: Composição química, atividades biológicas e uso popular

Os produtos de origem natural desempenham papéis importantes na medicina (Montanari & Bolzani, 2001; Balunas & Kinghorn, 2005), fornecendo medicamentos cuja produção sintética é muito complexa, substâncias que são ligeiramente modificadas para tornarem-se mais eficazes, protótipos para novos fármacos, entre outras contribuições. Além disso, a população utiliza plantas medicinais para prevenção e cura de uma gama de enfermidades.

Dentre todas as plantas medicinais comumente utilizadas pela população brasileira, temos as árvores do gênero *Copaifera* pertencente à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinioideae Kunth., a qual possui 72 espécies, sendo que um grande número destas se encontram no Brasil (Veiga Jr & Pinto, 2002; Lima Neto *et al*., 2008), se destaca em função de suas ações farmacológicas (Veiga Jr *et al*., 1997; Veiga Jr *et al*., 2007; Almeida *et al*., 2012).

As propriedades biológicas relacionadas às copaibeiras estão em sua grande maioria associadas ao uso de seu material balsâmico, que é obtido por extração dos troncos das árvores, sendo também encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Este bálsamo, também conhecido como oleorresina, é um produto do metabolismo secundário destas espécies vegetais, que funciona como defesa contra animais, fungos e bactérias (Veiga Jr *et al.*, 2002; Tappin *et al*., 2004).

A oleorresina foi bastante difundida entre os índios latino-americanos, sendo no Brasil utilizada desde o século 16, pelos indígenas do norte e do nordeste brasileiro (Almeida *et al*., 2012). As propriedades biológicas desse bálsamo tão apreciado pelos índios no século passado, ainda continuam sendo exploradas na medicina popular para diversas enfermidades.

A oleorresina pode ser administrada oralmente ou por meio de aplicações tópicas *in natura* ou associadas a formulações farmacêuticas como as pomadas (Paiva *et al.*, 1998; Tappin *et al.*, 2004; Romero, 2007) para uso como cicatrizantes, diuréticos, expectorantes, antitumoral, antimicrobiano, anti-inflamatório, afrodisíaco, antisséptico, antitetânico, principalmente sobre o umbigo de crianças recém nascidas, entre outros (Pio Corrêa, 1984; Basile *et al*., 1988; Veiga Jr *et al*., 1997; Veiga Jr *et al.*, 2002; Maciel *et al*., 2002, Almeida *et al*., 2012).

Os constituintes da oleorresina de *Copaifera langsdorfii* são em sua maioria sesquiterpenos e diterpenos com esqueletos do tipo labdano e caurano (Ferrari, *et al*., 1971; Veiga *Jr*& Pinto, 2002; Tappin *et al*., 2004; Veiga Jr *et al*., 2007; Lima Neto *et al*., 2008). Já foram isoladas e caracterizadas diferentes amostras e reportadas na literatura aproximadamente 30 diferentes estruturas químicas de diterpenos e identificados mais de 70 hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Veiga Jr & Pinto, 2002; Veiga Jr. *et al*., 2007).

Dentre as substâncias identificadas estão: β-cariofileno, α-copaeno, β-bisaboleno, δ-bourbouneno, cipereno, α-humuleno e γ-cadineno, ácido *ent*-16-β-caurano-19-óico, ácido *ent*-caura-16-en-19-óico, ácido hardwíckiico, colavenol, *cis*-colavenol, ácido *ent*-agático, ácido poliáltico, ácido copálico e ácido 11-acetóxi-copalico, os quais foram descritos, na literatura, em grande parte das oleorresinas de diferentes espécies de *Copaifera* estudadas (Ferrari, *et al*., 1971; Ohsaki, *et al*., 1994; Veiga Jr & Pinto ., 2002; Souza *et al*., 2011).

Dentre esses sesquiterpenos, pode-se destacar o β-cariofileno (**Figura 1a**), que é um dos compostos majoritários da oleorresina de algumas espécies *Copaifera* e também de óleos essenciais de diversos gêneros de plantas provenientes de diferentes regiões (Siani *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2000; Limberger *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2006). Várias atividades biológicas foram atribuídas a este sesquiterpeno, tais como: antiedematogênica, fagorrepelente, anti-inflamatória, antitumoral, bactericida, insetífuga, espasmolítica e protetora contra danos no DNA (Shimizu, 1990; Jacobson *et al*., 1990; Keeler *et al*., 1991; Zheng *et al*., 1992; Kang *et al*., 1992; Duke, 1992; Veiga Junior *et al*., 2007; Di Sotto *et al*., 2010).

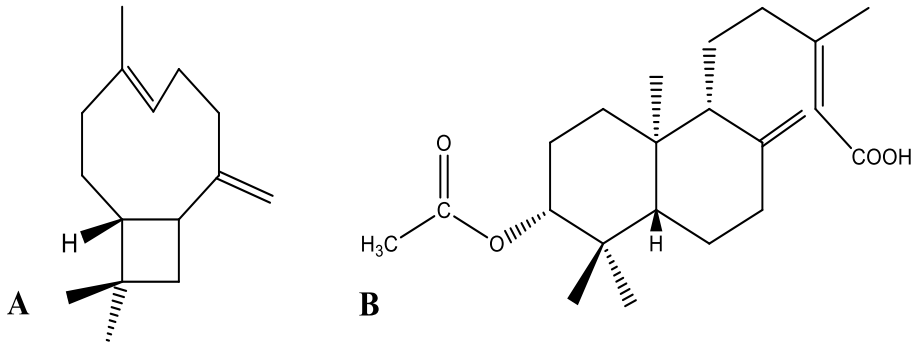


Figura 1: Estruturas químicas do β-cariofileno (**A**) e do ácido 3β-acetoxi-copálico (**B**)

A biossíntese do β-cariofileno (**Figura 2**) envolve a ciclização do pirofosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos, iniciada pelo ataque da nuvem π ao carbono eletrofílico, com consequente expulsão do grupo difosfato, outra ciclização e posterior protonação, quando ocorre a oxidação da ligação dupla e formação do óxido de cariofileno (Dewick, 2002). O óxido de cariofileno é encontrado nos padrões de β-cariofileno devido a fácil formação do mesmo.

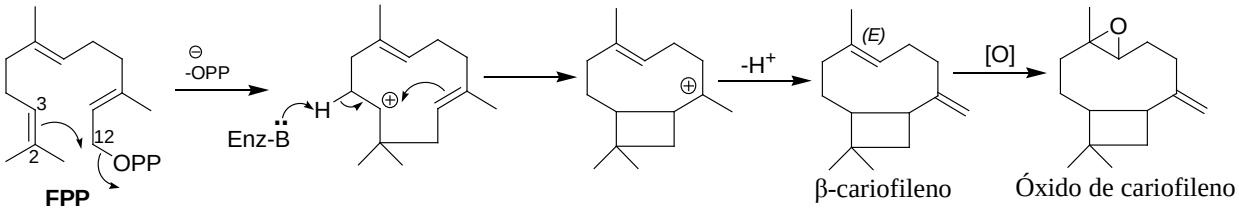


Figura 2: Formação do β-cariofileno e óxido de cariofileno

Os diterpenos são biossintetizados a partir do ácido mevalônico, através do pirofosfato de 2*E*, 6*E*, 10*E*-geranilgeranila (GGPP). De acordo com o número de anéis e o padrão de ciclização de suas estruturas químicas, os diterpenos são divididos em acíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, macrocíclicos e mistos (Hanson, 2004).

Entre os diterpenos encontrados em oleorresinas de *Copaifera* podemos destacar também, devido suas propriedades biológicas, o ácido 3β-acetoxi-copálico (**Figura 1b**) o qual é um diterpeno de esqueleto do tipo labdano (bicíclico).

Vários artigos científicos reportam a um grande número de atividades biológicas que são atribuídas aos diterpenos, tais como inseticida, anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante e antimicrobiana, as quais estão associadas ao esqueleto hidrofóbico e a uma porção hidrofílica oxigenada (Costa *et al.*, 1996; Porto *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Zheng *et al*., 2010; Aguiar *et al*., 2010; Kim *et al*., 2010; Kihampa *et al*., 2010; Vallim *et al*., 2010; Valotto *et al*., 2011).

Com todas essas atividades relatadas e considerando que a oleorresina de *Copaifera* sp. é a matéria-prima vegetal mais utilizada na medicina popular no Brasil (Sousa *et al*., 2012), ressalta-se a importância do estudo das possíveis transformações dessas substâncias que podem ocorrer no metabolismo humano.

1.2 Biotransformação e sua importância

Biotransformação se define como o uso de sistemas biológicos para a realização de modificações químicas em substâncias que não constituem os substratos naturais, ou seja, compreende a metabolização de xenobióticos (Hanson *et al*., 1995; Barreiro *et al*., 1996).

As biotransformações podem ser realizadas utilizando suspensões de células vegetais, células íntegras de micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos, microalgas, cianobactérias e leveduras) e microssomas hepáticos. Enzimas isoladas de diferentes fontes podem ser utilizadas em processos denominados biocatálises que visam também promover a modificação das estruturas químicas das substâncias de interesse (Faber, 1997; Giri *et al*., 2001; Carvalho & Fonseca, 2006).

O uso de micro-organismos para mimetizar o metabolismo de fármacos em mamíferos é de importância farmacêutica e bastante relatada, constituindo uma etapa importante e necessária na avaliação da eficácia e segurança dos mesmos (Asha & Vidyavathi, 2009).

As reações que ocorrem no metabolismo dos mamíferos após ingestão de fármacos não ocorrem apenas quando a administração é realizada via oral, mas também quando os fármacos são administrados por via intravenosa e via retal (Sousa *et al*., 2008).

A utilização de fungos filamentosos é importante para esses estudos e segue o conceito de que os fungos são organismos eucariotos e o aparato enzimático se assemelha com o metabolismo 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 elucidação da rota metabólica de compostos exógenos que podem ser transformados em substâncias benéficas como no caso dos fitoestrógenos (Raimondi *et al*., 2009) ou prejudiciais (derivados tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos) como no caso do metronidazol (Faigle *et al*., 1993; Abourashed *et al*., 1999; Raimondi *et al*., 2009).

Na literatura há estudos de biotransformações *in vitro* conduzidos com fungos filamentosos que foram capazes de fornecer os mesmos metabólitos obtidos em reações de fase I e fase II, detectados nos estudos de metabolismo em humanos de vários fármacos, demonstrando assim a semelhança entre o metabolismo de xenobióticos realizados por mamíferos e por fungos filamentosos. (Venisetty & Ciddi, 2003, Kutrzeba *et al*., 2009; Asha & Vidyavathi, 2009).

Pode-se mencionar como exemplo a biotransformação da camptotecina por *Aspergillus* sp que gerou a 10-hidroxicamptotecina, substância também detectada em mamíferos (Venisetty & Ciddi, 2003). Outro exemplo é o da biotransformação do antimalárico artemisinina por *Penicillium chrysogenum* e *Nocardia corallina* que resultou nos metabólitos desoxiartemisinina e 3α-hidroxi-desoxiartemisinina, também detectados em mamíferos (Venisetty & Ciddi, 2003). A biotransformação do antitumoral taxol (Paclitaxel) por *Nocardia albus* resultou na produção de vários metabólitos e entre estes o 13-deacilpaclitaxel, também detectado em mamíferos.

Outros micro-organismos também foram utilizados com sucesso em processos de biotransformação para reproduzir o metabolismo de fármacos em mamíferos, entre estes: *Aspergillus alliaceus*, *Curvularia lunata*, *Beauveria bassiana*, espécies de *Cunninghamella*, *Streptomyces* e do gênero *Pseudomonas* (Venisetty & Ciddi, 2003).

O uso de bactérias pertencente a microbiota intestinal também são importantes em estudos de metabolismo *in vitro*, pois os medicamentos e alimentos, quando ingeridos, podem ser metabolizados por essas bactérias que colonizam o trato gastrointestinal (Raimondi *et al.*, 2009) na ordem de 10^{11} a 10^{13} UFC por grama de conteúdo do intestino grosso (Sousa *et al*., 2008). Já foram identificadas 500 ou mais espécies diferentes anaeróbias e anaeróbias facultativas (Kaper *et al*., 2005; Rubinstein, 1990; Dunne, 2001; Ding *et al*., 2009) no intestino humano.

Sousa e colaboradoes em 2008 descrevem diversos fármacos metabolizados pela microbiota intestinal e demonstram a importância da realização desses estudos no desenvolvimento de novos medicamentos, pois essas modificações realizadas por bactérias do trato gastrointestinal podem tornar algumas substâncias mais potentes ou mais tóxicas após a biotransformação, como também podem inativar seu efeito, sendo assim uma importante ferramenta nos estudos de metabolismo.

Um relevante exemplo da importância desses estudos foi relatado por Zheng e colaboradores em 2013 sobre a biotransformação de melamina pela microbiota intestinal. Esse estudo demonstrou que a melamina (1,3,5-triazina-2,4,6-triamina) que é um pó branco e cristalino, considerado nocivo se ingerido, inalado ou absorvido através da pele, bastante utilizado na fabricação de plásticos, resinas, copos e pratos, empregado também para adulterar testes de dosagem de proteínas em produtos alimentícios como leite, ao ser biotransformado é parcialmente convertido em ácido cianúrico.

Esse produto (ácido cianúrico) formado pode causar intoxicação e danos renais, na China em 2008 ocorreu uma alta incidência de lesões renais em lactantes e crianças expostas

ao leite contaminado, porém algumas crianças não apresentavam sintomas de intoxicação, pois apenas alguns indivíduos apresentavam a bactéria *Klebsiella terrígena* presente em sua microbiota, a qual é responsável por essa biotransformação (Zheng *et al*. 2013).

Estes micro-organismos pertencentes a microbiota gastrointestinal desenvolvem funções importantes no local em que colonizam. Evidências indicam que a microbiota intestinal regula a nossa fisiologia e metabolismo (Lahti *et al.* 2013) e dentre estas funções destacam-se: a capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de micro-organismos exógenos que eventualmente penetrem no ecossistema digestivo; capacidade de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal; capacidade de oferecer diversas fontes energéticas e de vitaminas; capacidade de realizar reações metabólicas de redução, hidrólise e ruptura de anéis heterocíclicos, produzindo substâncias menos polares de baixo peso molecular (Sekirov *et al*., 2010).

Em condições fisiológicas normais, as bactérias não se encontram no estômago, dadas as suas condições de acidez, encontrando-se em baixa extensão ao longo do intestino delgado. O número de micro-organismos aumenta gradualmente ao longo do intestino delgado e encontra a sua expressão máxima em torno da válvula ileocecal (Faigle,1993). No próprio cólon, a velocidade de crescimento dos micro-organismos é máxima nas suas regiões proximais, na medida em que a concentração de fontes energéticas é superior (Vandamme *et al.*, 2001).

A via de administração oral é a preferida para administração de fármacos, sendo que 84% dos cinquenta medicamentos mais vendidos na Europa e Estados Unidos são administrados por esta via (Lennernas *et al.*, 2005). Todos os fármacos administrados por via oral passam pelo metabolismo hepático e pelo metabolismo bacteriano, este último ocorrendo principalmente no trato gastrointestinal inferior, se não forem totalmente absorvidos no trato gastrointestinal superior.

Fármacos administrados por via intravenosa ou os que são totalmente absorvidos no trato gastrointestinal superior podem ainda alcançar o trato gastrointestinal inferior, por

secreção ou difusão, a partir da circulação sistêmica para o lúmen intestinal, ou por terem sido excretados na bile, possivelmente como conjugados, seguindo por um processo conhecido como recirculação entero-hepática. Fármacos também podem entrar em contato direto com a microbiota intestinal quando administrados pela via retal na forma de supositórios ou enemas (Sousa *et al*., 2008).

Sabe-se que mais de 30 fármacos disponíveis no mercado são modificados pelas bactérias intestinais (Sousa *et al*., 2008). É necessário conhecer a influência que tal microbiota exerce no metabolismo de todas as classes de fármacos a fim de não somente revolucionar as estratégias terapêuticas para muitas doenças, mas também para garantir a eficácia dos medicamentos. A ação da microbiota sobre fármacos deveria integrar os procedimentos para desenvolvimento de novos medicamentos (Sousa *et al*., 2008).

Os micro-organismos estão em muitos compostos lácteos utilizados para regulação da microbiota intestinal, sendo comercializados como probióticos, pois conferem benefícios à saúde que podem surgir a partir da capacidade de afetar a microbiota residente (Lahti *et al.* 2013). Dentre estes micro-organismos que são fornecidos para as indústrias alimentícias para a produção de alimentos funcionais probióticos, estão os gêneros *Lactobacillus, Bifidobacterium* e *Streptococcus*.

Os estudos de biotransformação com micro-organismos também são utilizados com o objetivo de obter derivados com maior potência intrínseca e que ocasionem menos efeitos colaterais, diminuindo, por exemplo, a toxicidade (Asakawa, 2007).

Outra aplicação importante é na síntese para produção de determinadas substâncias opticamente ativas, pois as reações são altamente regiosseletiva e enatiosseletiva propiciando a obtenção de produtos quirais a partir de misturas racêmicas. Além disso, podem propiciar a ocorrência de reações em regiões totalmente inacessíveis que dificilmente seriam alcançadas síntese química, ou seja, podem ser úteis na funcionalização de posições não ativadas em

moléculas orgânicas (Hanson, 1995; Faber, 1997; Asha & Vidyavathi, 2009; Qi-He *et al*., 2009).

O uso de processos de biotransformação para modificação de compostos exógenos tem antecedentes que datam dos trabalhos de Pasteur que foram investigados por diversos químicos no século XIX. Pasteur em 1958 utilizou *Penicillium glaucum* obtendo L-tartarato de amônio a partir de DL-tartarato de amônio (Hanson, 1995).

No século XX as biotransformações começaram a receber maiores atenções após as reações de hidroxilações microbianas em esteroides bioativos e em produtos intermediários utilizados na síntese de corticosteroides (Peterson *et al*., 1952).

A produção de corticosterona que possui ação anti-inflamatória era produzida a partir de ácido desoxicólico em 31 etapas, sendo uma das etapas a introdução de uma hidroxila na posição 11 do esqueleto esteroidal. Hench e colaboradores (1949) conseguiram produzir corticosterona por meio de transformações microbianas de forma mais simples que os métodos sintéticos. Esse método foi reestruturado para produção em escala industrial e passou a ser utilizado pelas empresas Merck e Schering (Charney & Herzog, 1967).

Outro exemplo importante na síntese de hormônios adrenocorticóides de forma economicamente viável foi o da utilização do fungo *Rhizopus nigricans* para catalisar a hidroxilação na posição 11α formando 11α-hidroxiprogesterona a partir da progesterona (Peterson & Murray, 1952) e a produção de testosterona (**Figura 3**) (Hench *et al*., 1949; Stoudt, 1960; Takahashi, 1994).

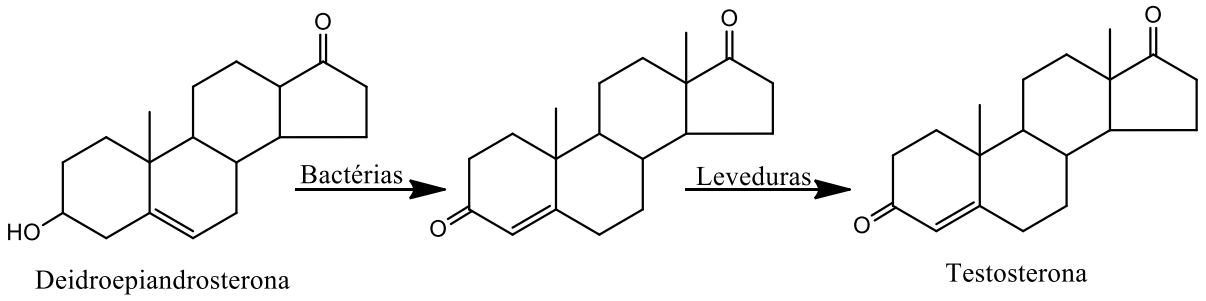


Figura 3: Biotransformação de Deidroepiandrosterona em testosterona

Em 1953 foi também descrita a hidroxilação na posição 11β por meio da transformação por fungos filamentosos de Cortexolona produzindo hidrocortisona (**Figura 4**) com rendimento de até 70% (Vézina, 1987; Silva *et al*., 1999; Rocha, 2010).

Outro exemplo que ocorreu na antiga Babilônia, atual Iraque, foi a transformação de etanol em ácido acético utilizando como catalisador *Acetobacter* (Leresche & Meyer *et al*., 2006).

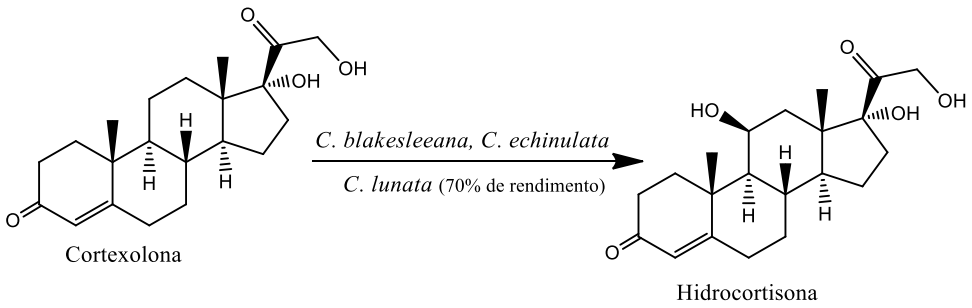


Figura 4: Biotransformação de cortexolona por fungos filamentosos

Straathof e colaboradores (2002) relataram o uso de processos de biotransformação em diferentes indústrias. O número de processos iniciados em escala industrial aumentou consideravelmente de menos de 10 processos em 1960 para 140 em 2002, demonstrando também a crescente utilização na indústria farmacêutica e química que também foi reportado por Hegazy e colaboradores (2015) no qual esses autores enfatizaram que esses processos respeitam as estratégias da química verde.

Os bioprocessos são mais vantajosos pelo fato de utilizarem baixas temperaturas, baixas pressões, diminuição na utilização de produtos químicos e não utilização de catalisadores químicos tóxicos, evitando assim, desperdícios para a realização de reações, geração de resíduos tóxicos e alto consumo de energia (Farias & Fávaro, 2011; Adamusiak *et al*., 2012; Jegannathan & Nielsen, 2013; Gonçalves & Marsaioli, 2013).

Dentre os setores industriais que utilizam o processo de biotransformação o setor farmacêutico destaca-se com mais de 50% e a maior parte dos produtos enatiomericamente

puros eram advindos de processos de biotransformação. Dentre as enzimas isoladas, as hidrolases são as mais utilizadas nos processos de biocatálise (Straathof *et al*., 2002).

1.3 Biotransformação de terpenos

Os terpenóides representam uma grande classe de metabólitos secundários que desempenham uma variedade de papéis em diferentes plantas e apresentam amplas atividades biológicas (Simeó & Sinisterra, 2009; Bhatti & Khera, 2014). Devido as várias funções dos constituintes dessa classe de compostos, surge o interesse na busca de novas substâncias com aplicações na indústria farmacêutica, de perfumes, de alimentos, na agricultura e em outros setores, e também no conhecimento do metabolismo *in vitro* e *in vivo* dos terpenos bioativos.

Nos processos de biotransformação descritos no período de 1996 a 2006 os principais biocatalizadores utilizados (**Figura 5**) nas transformações de terpenos foram bactérias (41%) e fungos (33%), sendo os demais realizados por plantas (11%), enzimas isoladas (7%), microalgas (4%), cianobactérias (2%) e leveduras (2%). O fato da utilização em sua maioria ser de células pode ocorrer devido ao baixo custo e simples obtenção comparando com enzimas isoladas (Carvalho & Fonseca, 2006)

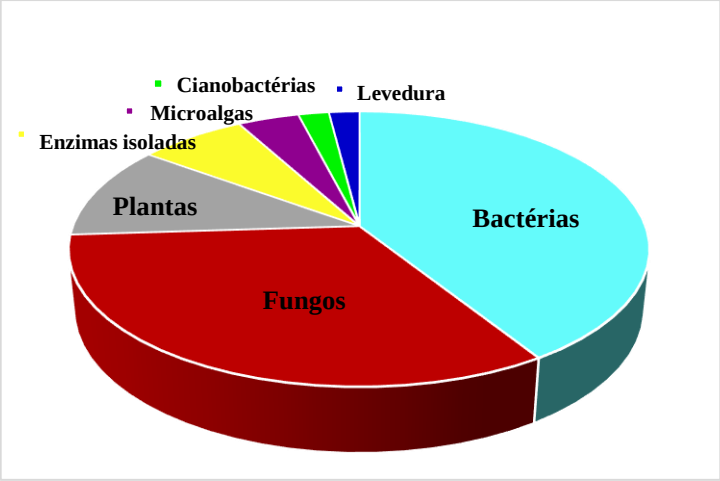


Figura 5: Biocatalisadores nos processos de biotransformação com terpenos

Micro-organismos tais como *Mucor plumbeus*, *Mucor spinosus*, *Mucor ramannianus*, *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella blakesleana*, *C. echinulata*, *Aspergillus niger*,

Fusarium oxysporum, *Fusarium moniliforme*, Cephalosporium *aphidicola*, *Microsphaeropsis onychiuri*, *Curvularia luneta*, *Rhizopus arrhizus*, *R. oryzae*, *Alternaria alternata*, *Polyangium cellulosum*, *Gibberella fujikuroi*, *Beauveria bassiana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Nocardia aurantia*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas cruciviae* e *Pseudomonas* sp foram relatados com a habilidade de modificar as estruturas químicas de terpenos em geral (Aranda, *et al*., 1991; Kouzi & Mcchesney, 1991; Mahato & Majumdar, 1993; Carvalho & Fonseca, 2006; Asha & Vidyavathi, 2009; Bhatti, *et al*., 2014).

Reações de hidroxilação e epoxidação na estrutura química do β-cariofileno foram realizadas por diferentes micro-organismos e também foram descritas em estudos *in vivo* utilizando coelhos como apresentado na **Figura 6** (Asakawa *et al*., 1986; Abraham *et al*., 1990a; Abraham *et al*., 1990b; Ishida, 2005).

Segundo Abraham e colaboradores (1990a,b), processos de biotransformação do β-cariofileno realizados com *Chaetomium cochliodes* e *Diplodia gossypina* produziram nove e 14 diferentes produtos, respectivamente, tendo ocorrido reações também de epoxidação e hidroxilação.

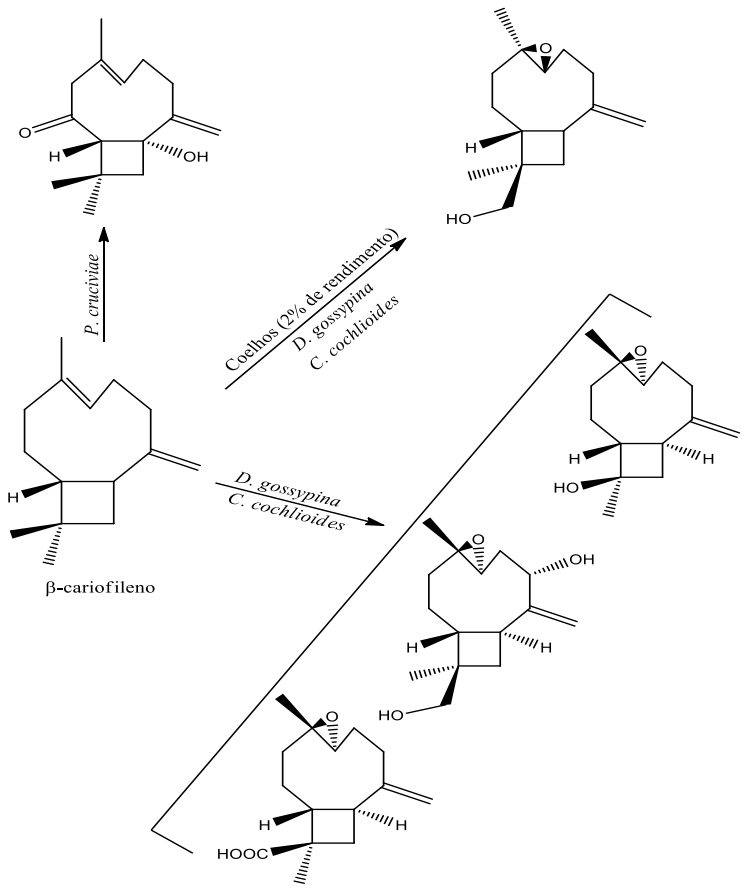


Figura 6: Biotransformações de β-cariofileno em coelhos e biotransformações em micro-organismos

Nos processos de biotransformação com diversas espécies de micro-organismos em terpenos do tipo labdano foram descritas reações de hidroxilação e oxidação em diferentes posições (Aranda *et al.*, 1991; Kouzi & Mcchesney,1991; Lin & Rosazza, 1998). Segundo Hirschmanm e colaboradores (2004), *A. niger* é capaz de catalisar a hidroxilação de terpenos no carbono 3 assim como *A. brasiliensis* nas posições 3 e 19. Severiano e colaboradores (2013) detectaram produtos de biotransformação do ácido *ent*-pimaradienóico utilizando *A. niger* mediante reações de desidrogenações, migração de insaturação e hidroxilações nos carbonos 1, 6, 7, 11 e 14, demonstrando assim a versatilidade desse micro-organismo para catalisar diferentes reações.

Nas **Figuras 7**, **8** e **9** estão apresentados exemplos de metabólitos obtidos por transformações de diterpenos bicíclicos da classe dos lábdanos (Aranda, *et al.*, 1991; Kouzi & Mcchesney, 1991).

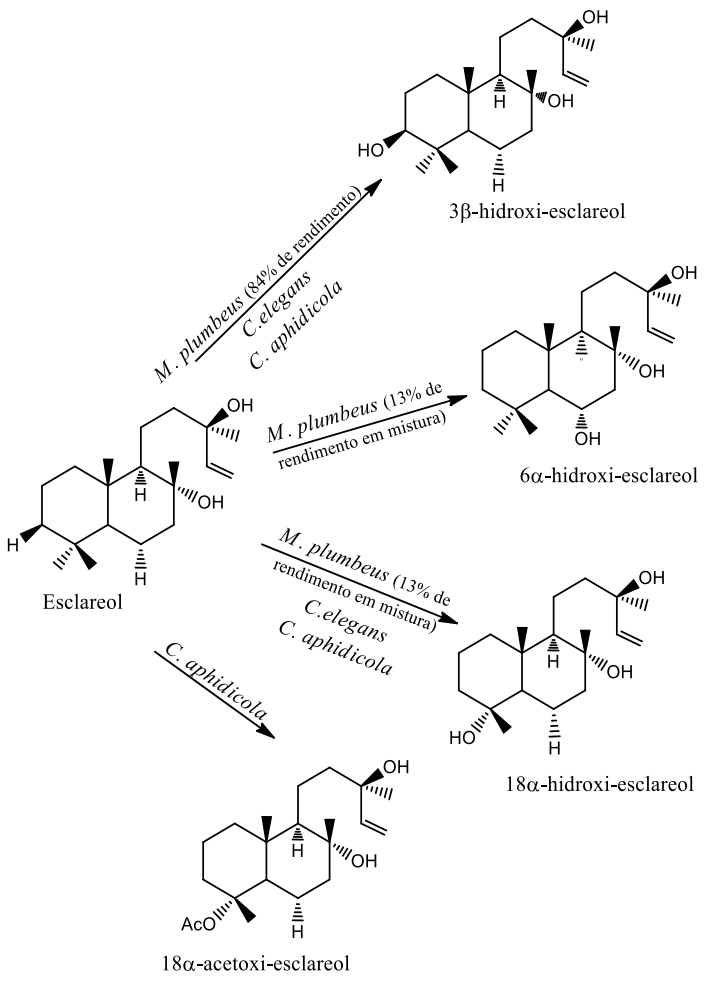


Figura 7: Produtos de biotransformações do esclerol obtidos com os fungos filamentosos

Na **Figura 8** é possível observar que na biotransformação do terpeno do tipo labdano apenas um micro-organismo produziu 4 metabólitos, ocorrendo reações de hidroxilação e oxidação (Aranda *et al*., 1991).

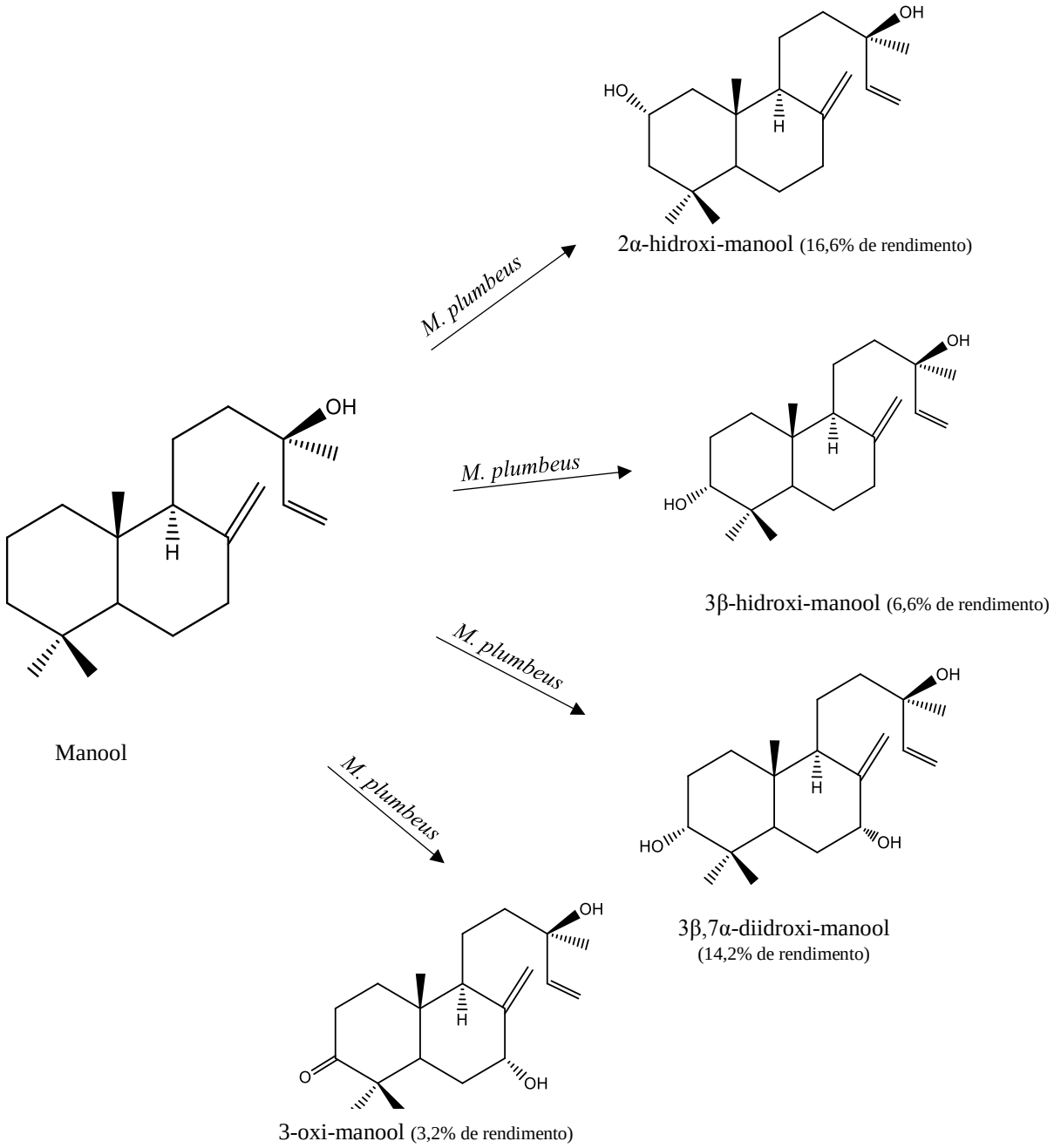


Figura 8: Produtos de biotransformações de Manool com o fungo *Mucor plumbeus*

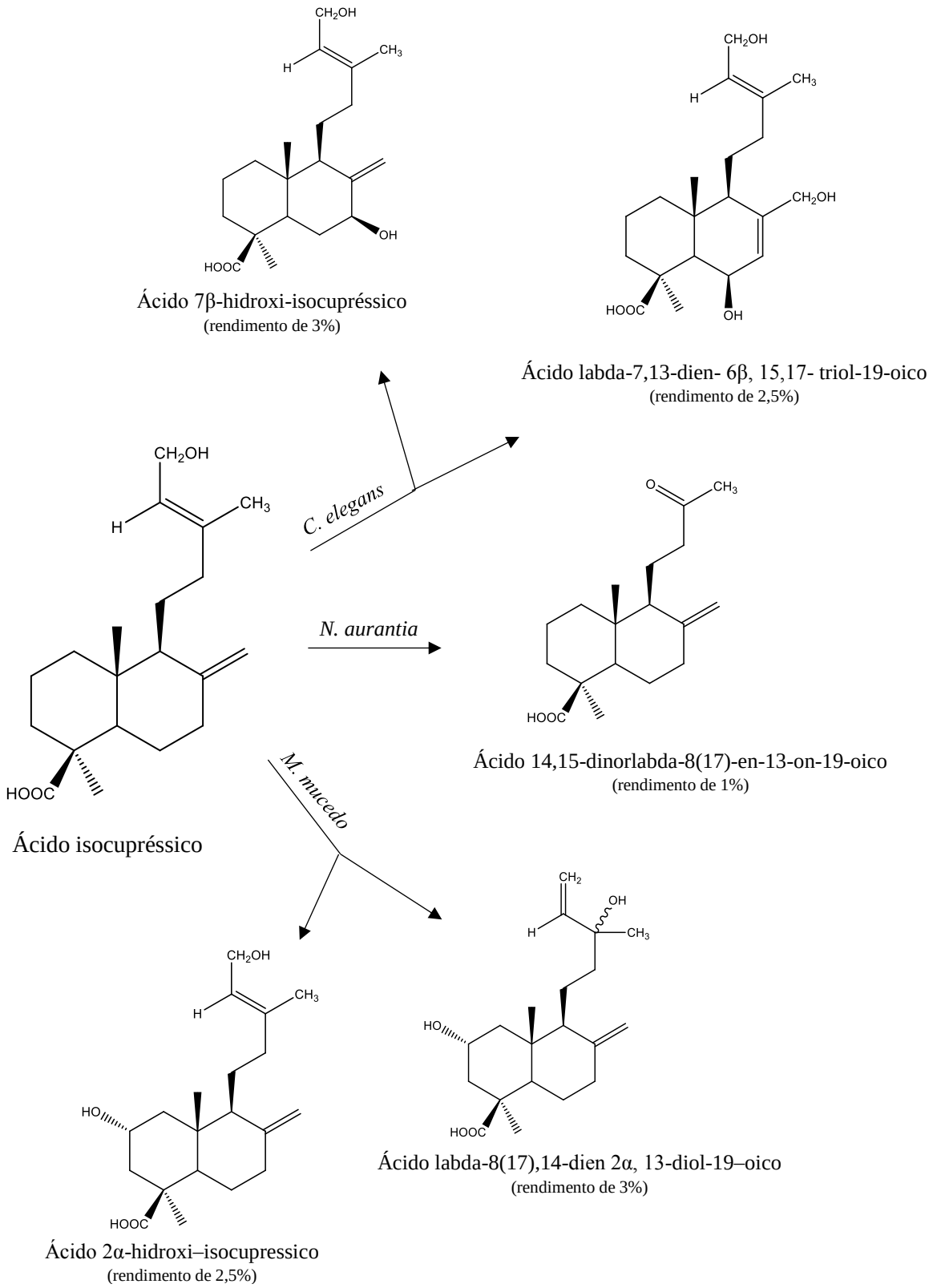


Figura 9: Produtos das biotransformações do ácido isocupréssico com *Cunnighamella elegans*, *Mucor mucedo* e *Nocardia aurantia* (Lin & Rosazza, 1998)

Haridy e colaboradores (2006) realizaram transformações microbianas de dois diterpenos labdanos constituintes majoritários de espécies *Madia* e isolaram quatro metabólitos

(**Figura 10**) dos processos realizados com os fungos *D. hansenii* e *A. niger*. Nesses processos ocorreram reações de oxidação e adição de grupo hidroxílico. A atividade antimicrobiana de todas as substâncias foram avaliadas e apenas o produto 7α,13R,14R,15-tetrahidroxilabd-8(17)-eno produzido por ambos micro-organismos apresentou atividade antibacteriana superior ao substrato (Haridy *et* al., 2006).

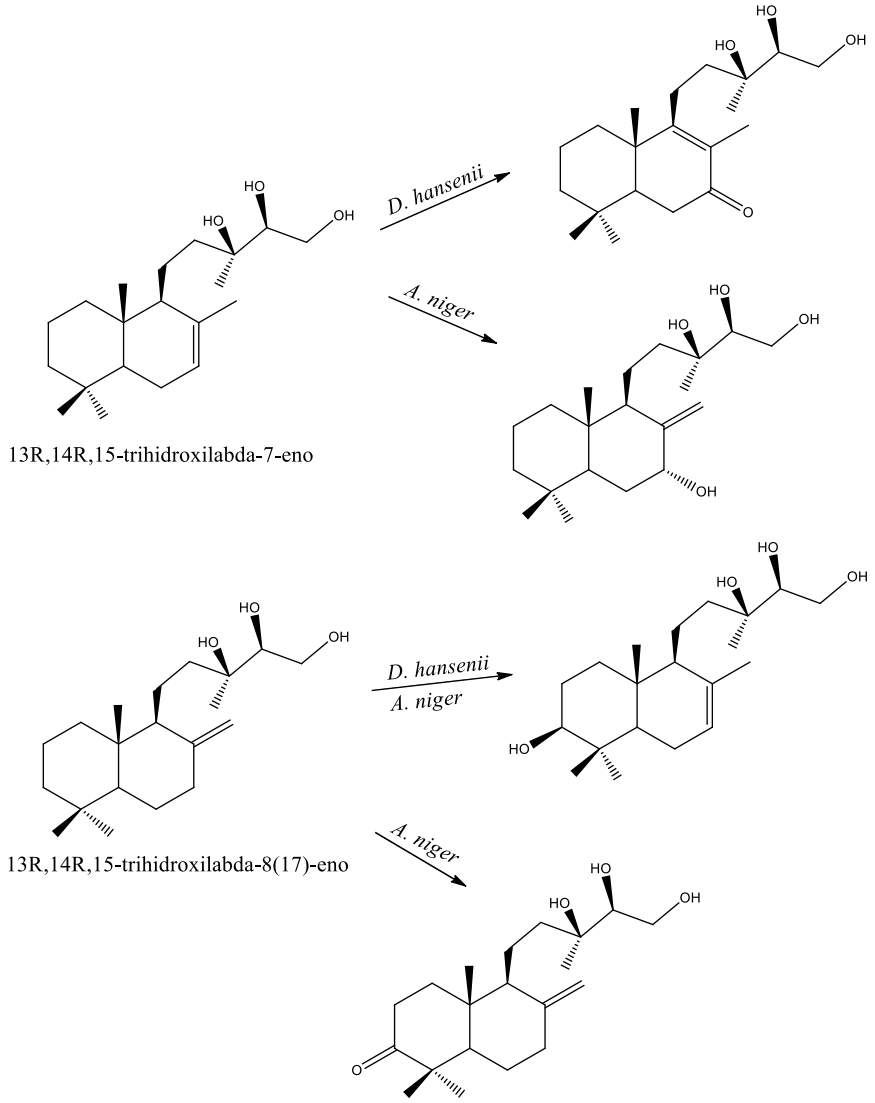


Figura 10: Transformações microbianas de dois diterpeno labdanos

Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2007) realizaram biotransformação com o diterpeno labdano ácido imbricatolico (**Figura 11**) com o objetivo de obter derivados hidroxilados do mesmo utilizando as linhagens *A. brasiliensis* ATCC16404 e *C. echinulata* ATCC 8688a que também foram utilizadas nesse trabalho. Com os produtos advindos dos processos verificou-se o efeito citotóxico frente as linhagens MRC-5 (células normais de

fibroblastos de pulmão humano) e AGS (adenocarcinoma gástrico). Todos os metabólitos produzidos apresentaram efeito citotóxico inferior ao substrato frente as duas linhagens avaliadas.

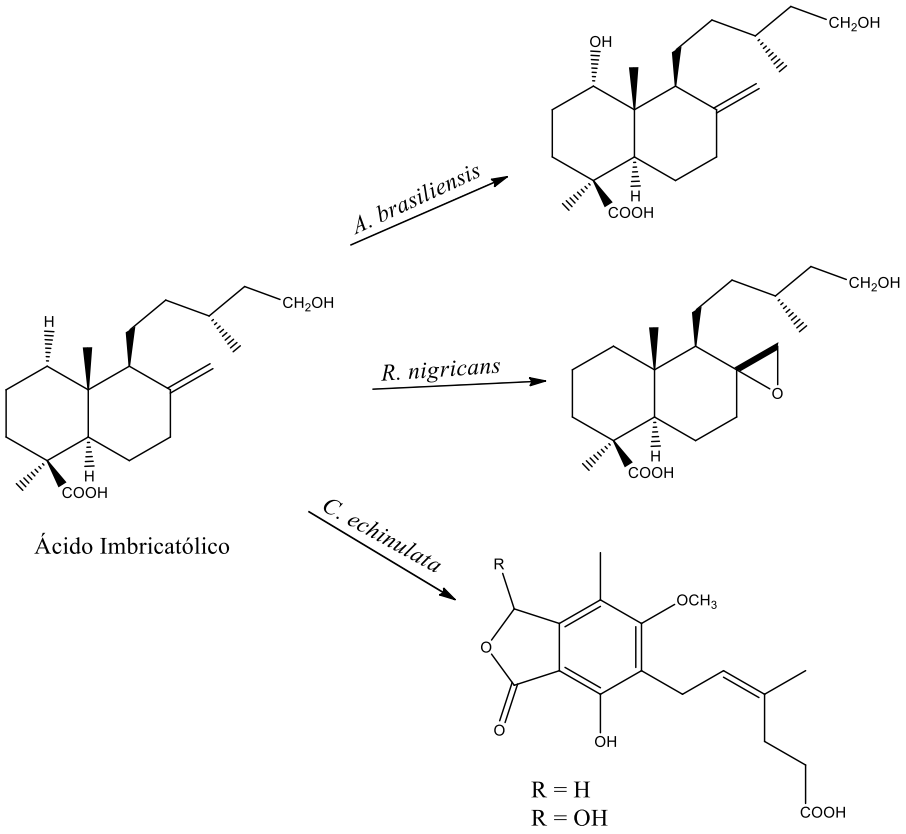


Figura 11: Biotransformações do ácido imbricatolico

Observando as biotransformações descritas na literatura podemos destacar que nos processos é possível produzir os mesmos metabólitos com diferentes espécies de micro-organismos, mas com rendimentos diferentes e também diversos produtos com apenas um micro-organismo.

1.4 Potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico de um determinado composto envolve alguns ensaios biológicos que permitem uma estimativa da capacidade de atuação desses compostos sobre os processos de manutenção metabólica da homeostase celular, bem como sobre o

rompimento da capacidade replicativa e ainda na indução de morte celular programada. Uma análise comparativa dessas respostas celulares frente ao tratamento com diferentes concentrações desses compostos em modelo *in vitro*, utilizando linhagens celulares de origem primária neoplásica ou normal, permitem ainda uma estimativa do potencial anticarcinogênico, bem como do efeito seletivo desses compostos sobre células com diferentes "backgrounds" genéticos (Franken *et al*., 2006).

Dentre os diversos ensaios colorimétricos existentes, o ensaio do XTT é um dos mais utilizados para avaliar a citotoxidade de substâncias reportadas na literatura. O ensaio do XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio) baseia-se na atividade mitocondrial das células para medir a proliferação celular. Neste teste, o XTT (de coloração amarelada) é reduzido por desidrogenases presentes nas mitocôndrias das células viáveis, originando o formazan, um corante alaranjado e solúvel em água (Henriksson *et al*., 2006; Coelho, 2013).

Estudos demostram as propriedades antitumorais *in vitro* e *in vivo* da oleorresina de algumas espécies de *Copaifera* e de algumas substâncias majoritárias presente.

Chen-Chen & Sena (2002) avaliaram a atividade mutagênica e citotóxica da oleorresina de *Copaifera langsdorffii* realizando o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos. Os resultados obtidos sugerem que esta oleorresina apresenta atividade mutagênica e tóxica e quanto maior a dose maior a frequência de micronúcleos induzidos.

Vargas e colaboradores (2015) nos estudos realizados *in vitro* em linfócitos normais humanos e nas linhagens de câncer gástrico, cólon retal, mama, ovário, melanoma e glioblastoma humano frente aos diterpenos ácido copálico, ácido 3-hidróxi-copálico, ácido 3-acetóxi-copálico, ácido hardwickiico, ácido colávico-15-metil éster e ácido caurenóico, todos isolados de oleorresina de *Copaifera* sp., demonstraram não apresentar efeitos citotóxicos frente

a linhagem celular normal e as células tumorais testadas e em concentrações únicas não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular.

Masson-Meyers (2013) verificaram a viabilidade celular e proliferação de células 3T3 quando as células permaneceram em contato com concentrações acima de 100µg/mL de oleorresina de *C. langsdorffii* e não observaram perda de viabilidade. Vargas e colaboradores (2015) também realizaram ensaios com a mesma linhagem e foi observado que os diterpenos majoritários da oleorresina de *Copaifera* não ocasionaram redução significativa na viabilidade dessas células em comparação com o grupo contendo células não tratadas.

Vargas e colaboradores (2015) também relataram que os ácidos 3-hidróxi-copálico e 3-acetóxi-copálico apresentaram citotoxidade frente a linhagem AGP01. Para as linhagens HCT-116 e NIHOVCAR apenas o ácido 3-acetoxi-copálico apresentou citotoxidade. Quanto a linhagem SF-295, a qual mostrou-se mais sensível, os diterpenos ácidos 3-hidróxi-copálico e 3-acetoxi-copálico apresentaram citotoxidade em torno de 20 %. Os diterpenos avaliados não foram citotóxicos para a linhagem MCF-07.

Estudos também foram realizados com o ácido caurenóico isolado da oleorresina de *C. langsdorffii* e os autores observaram que esse diterpeno apresentou potencial efeito citotóxico, mas inespecífico (Costa-Lotufo *et al*., 2002). Corroborando com esses resultados Leandro e colaboradores (2012) reportaram atividades mutagênica e citotóxica da oleorresina de espécies de *Copaifera* e de sesquiterpenos e diterpenos majoritários presentes. Na literatura há diversos trabalhos a respeito do ácido caurenóico nos quais os autores reportam as atividades antitumoral e citotóxica frente a células cancerosas (Paiva *et al*., 2002b; Costa-Lotufo *et al*., 2002; Cavalcanti *et al*., 2006).

Diferentemente dos autores anteriormente citados Almeida e colaboradores (2012) em estudos *in vivo* realizaram o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de camundongos e concluíram que a oleorresina e as frações voláteis e resinosa não apresentaram efeitos genotóxicos ou mutagênicos.

A oleorresina de *C. multijuga* e frações que apresentam o ácido 3-acetoxi copálico como um dos majoritários e o β-cariofileno apresentaram efeito inibitório no crescimento tumoral por redução na formação dos nódulos de metástase do tecido pulmonar. Essa oleorresina demostrou-se tóxica e com elevada atividade antitumoral com tempo e dose dependentes em ensaios frente a células tumorais, sugerindo que esta oleorresina poderia ser utilizada de maneira segura como um agente antitumoral. Porém nesse estudo não foram realizados ensaios com as substâncias majoritárias presentes (Lima *et al*., 2003).

Tendo em vista o exposto sobre a biotransformação de xenobióticos, a investigação do metabolismo *in vitro* de substâncias por micro-organismos constitui uma ferramenta importante para predizer a ocorrência de reações *in vivo*. Para complementar esses estudos de metabolismo é importante também verificar o efeito citotóxico *in vitro* dos metabólitos obtidos nos processos de biotransformações frente às células normais e tumorais complementando assim o presente trabalho.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudos de biotransformação dos terpenos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico presentes em oleorresinas de *Copaifera* sp. utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e isolar os produtos de biotransformação para avaliação da citotoxidade.

2.2 Objetivos específicos

-Determinar as condições para obtenção de esporos e biomassa das linhagens dos fungos filamentosos;

- Determinar as condições para o crescimento das bactérias do trato gastrointestinal a serem avaliadas em culturas isoladas e mistas;

- Isolar o ácido 3β-acetoxi-copálico de oleorresinas de espécies de *Copaifera* sp.*;*

- Determinar os valores de concentração inibitória mínima dos substratos frente aos micro-organismos avaliados;

- Desenvolver os processos de biotransformação do β-cariofileno e do ácido 3β-acetoxi-copálico utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal;

- Selecionar os processos mais promissores para cada substância, mediante avaliação dos perfis químicos, para o desenvolvimento em escala ampliada;

- Desenvolver os processos selecionados em escala ampliada;

- Isolar e elucidar as estruturas químicas dos produtos de biotransformação majoritários;

- Avaliar a atividade citotóxica dos produtos majoritários obtidos frente às linhagens celulares de glândulas mamárias normais (MCF-10A) e de adenocarcinoma mamário (MCF-7).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos utilizados

- Autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil)
- Balança analítica digital (Ohaus, México, DF, México)
- Ultrassom (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil)
- Capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil)
- Estufa bacteriológica (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil)
- Estufa de ar circulante (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil)
- Evaporador rotativo sob pressão reduzida (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil)
- Evaporador rotativo sob pressão reduzida (Büchi, Alemanha)
- Microscópio (Nikon, Shanghai, China)
- Água MiliQ (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Vortex (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil)
- Micropipetas (Gilson, Midleton, WI, USA)
- Câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, U.K.)
- Espectrofotômetro (Femto, São Paulo, SP, Brasil)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Speed vacuum (Thermo Coorporation®)
- Cromatógrafo líquido Waters® acoplado aos detectores de arranjo de diodos-PDA (Waters®) e Corona-CAD (Thermo Scientific®)
- Cromatógrafo líquido Shimadzu® com detector UV/VIS SPD-20ª
- Cromatógrafo líquido de ultra performance (Waters®) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters®)
- Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas (Shimadzu®)

- Espectrômetro Bruker DRX 400 e DRX 500 operando em 400 e 500 MHz para ^{1}H e 100 e 125 MHz para ^{13}C, respectivamente.

- Espectrômetro de massas microTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics®)

3.2 Materiais, reagentes, solventes e antibióticos utilizados

- Cloreto de sódio (Cinética)
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Penicilina (Sigma)
- Sangue desfibrinado de carneiro (Biotério Rodrigues)
- Sulfato de sódio anidro (Vetec)
- Etanol (Synth**)**
- Resazurina (Sigma)
- Acetato de etila (Synth**)**
- Hexano (Synth**)**
- Metanol (Synth,
- Acetonitrila grau HPLC (Merck)
- Acetato de etila grau HPLC (Merck)
- Anisaldeído
- Microplacas com 96 poços "U" (Costar®)
- Membrana filtrante de 0,22µm (Millipore®)
- Placa de Petri (Pleion
- Sílica gel 60 GF_{254} – código 1.07730 (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha)
- Sílica gel 60 – código 1.07734, 0,063-0,200nm (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha)

- Sílica gel 60 – código 1.09385, 0,040-0,063nm (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha)

3.3 Meios de cultura utilizados

3.3.1 Meios sólidos

- Agar Mueller Hinton – MH (Himedia);
- Agar DeMan-Rogosa-Sharpe – MRS (Acumedia);
- Agar MRS suplementado com 0,05% de cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich®);
- Gifu Anaerobic Medium Agar – GAM agar (Himedia);
- Agar batata dextrose – PDA (Himedia);
- Agar Sabouraund (BBL-Difco);
- Agar Malte: 2,0% de extrato de malte (Himedia), 2,0% de glicose (Synth), 0,1% de peptona (Himedia), 1,8% de agar (Himedia).

3.3.2 Meios líquidos

- Caldo Mueller Hinton – MH (Himedia);
- Caldo DeMan-Rogosa-Sharpe – MRS (Oxoid);
- Caldo MRS suplementado com 0,05% de cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich®);
- Caldo triptona de soja – TSB (Difco);
- Caldo Meio Anaeróbico Gifu – GAM (Himedia);
- Meio pré-fermentativo de Jackson (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 extrato de tomate (Quero), 1,0% de $CaCl_2$. $2H_2O$ (Vetec) e 10,0 mL/L da solução com traços de elementos (0,1% de $FeSO_4$. $7H_2O$ (Vetec), 0,1% de $MnCl_2$. $4H_2O$ (Vetec), 0,0025% de $CuCl_2$. $2H_2O$

(Vetec), 0,01% de $CaCl_2$. $2H_2O$ (Vetec), 0,056% de H_3BO_3 (Vetec), 0,0019% de $(NH_4)_6.MoO_2$. $4H_2O$ (Vetec) e 0,02% de $ZnSO_4$. $7H_2O$ (Vetec);

- Koch´s K1: 0,18% de glicose (Synth), 0,06% de peptona (Himedia) e 0,04% de extrato de levedura (Himedia);

- Czapek: 3,0% de sacarose (Synth), 0,2% de $NaNO_3$ (Vetec), 0,1% de K_2HPO_4 (Vetec), 0,05% de $MgSO_4$. $7H_2O$ (Vetec), 0,05% de KCl (Vetec) e 0,001% de $FeSO_4$. $7H_2O$ (Vetec).

3.4 Aquisição do β-cariofileno

O β-cariofileno foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® com pureza ≥ 98,5%.

3.5 Obtenção do ácido 3β-acetoxi-copálico

Devido a não disponibilidade no mercado para aquisição do ácido 3β-acetoxi-copálico, o mesmo foi obtido a partir da oleorresina de *Copaifera* sp, adquirida da empresa Apis-Flora Comercial e indústria, localizada na cidade de Ribeirão Preto, lote 0790310, fabricação 09/2010.

A oleorresina (25,15g) foi submetida à cromatografia líquida sob pressão reduzida (Pelletier, *et al.* 1986) empregando-se uma coluna de vidro de 5 cm de altura e 5 cm de diâmetro, empacotada com 60g de sílica gel 60 (40-33 µm) (Merck®). A oleorresina foi previamente incorporada em sílica gel 60 (0,200-0,060mm) (Acros organics®) e o gradiente de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está apresentado na **Tabela 1**. Foram utilizados em cada eluição 500mL da fase móvel.

Tabela 1 - Cromatografia Líquida sob pressão reduzida da oleorresina de *C. langsdorffii*

Eluente	Fração
n-hex	**Fr 1**
n-hex:AcOEt (9:1)	**Fr 2**
n-hex:AcOEt (4:1)	**Fr 3**
n-hex:AcOEt (7:3)	**Fr 4**
n-hex:AcOEt (1:1)	**Fr 5**
AcOEt	**Fr 6**
Metanol	**Fr 7**

Legenda: n-hex = n-hexano; AcOEt = Acetato de etila

Foram obtidas 7 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC; sílica gel 60 GF_{254} - *Merck*, código 1.07730) utilizando-se uma mistura de n-hexano/Acetato de etila 7:3 e ácido acético 1% como fase móvel. As placas cromatográficas foram observadas sob luz UV (254) e posteriormente reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico.

Após as análises por CCDC continuou-se o processo de isolamento e purificação do ácido 3β-acetoxi-copálico a partir da **Fr 3**.

A Fração 3 (2,0g) foi também submetida a Cromatografia Líquida sob pressão reduzida (Pelletier, *et al.* 1986) empregando-se uma coluna de vidro de 5 cm de altura e 5 cm de diâmetro, empacotada com 60g de sílica gel 60 (40-33 µm) (Merck®). A fração foi previamente incorporada em sílica gel 60 (0,200-0,060mm) (Acros organics®), foram utilizados 500mL de fase móvel em cada gradiente e 7 novas frações foram coletadas. O gradiente de eluição utilizado e o códigos estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Cromatografia líquida sob pressão reduzida da **Fração 3**

Eluente	Fração
n-hex:AcOEt (9:1)	**Fr 3.1**
n-hex:AcOEt (7:1)	**Fr 3.2**
n-hex:AcOEt (5:1)	**Fr 3.3**
n-hex:AcOEt (4:1)	**Fr 3.4**
n-hex:AcOEt (7:3)	**Fr 3.5**
AcOEt	**Fr 3.6**
Metanol	**Fr 3.7**

Legenda: n-hex = n-hexano; AcOEt = Acetato de etila

As sete novas frações obtidas na segunda coluna foram analisadas por CCDC utilizando-se uma mistura de Hexano/Acetato de etila 7:3 e ácido acético 1% como fase móvel.

Após as análises por CCDC observou-se em 2 frações (**Fr 3.2** e **Fr 3.3**) a presença do possível composto de interesse (ácido 3β-acetoxi-copálico), por meio da comparação com o padrão. Foi adicionado n-hexano e os precipitados codificado como **3.2 A** e **3.3 A** foram separadas dos sobrenadantes das frações **Fr 3.2** e **Fr 3.3**, respectivamente.

As frações foram analisadas também por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em cromatógrafo analítico Waters® com sistema de bomba binário modelo 1525, injetor automático, modelo 2707, acoplado ao detector Corona CAD (Charged Aerosol Detector) (Thermo Scientific®), e software Empower 3. Foi utilizada coluna de fase reversa C_{18}, SunFire (Waters®, 100x4,60 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm, acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase estacionária) com sistema de eluição isocrático composto de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético (7:3) durante 35 minutos. A vazão foi de 1,0 mL/min e foram injetados 30 µL de cada fração na concentração de 1,0 mg/mL, solubilizados na fase móvel inicial.

As substâncias isoladas foram submetidas as análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C, em tubos Shigemi®, em espectrômetro Bruker DRX 400 e 500, operando a 400 e 500 MHz, utilizando como solvente clorofórmio deuterado

($CDCl_3$). Os processamentos dos espectros foram realizados com auxílio do software MestReNova 6.0.2. Após análise dos espectros as amostras foram codificadas novamente como substância **A**.

3.6 Micro-organismos utilizados nos processos de biotransformação

Os micro-organismos utilizados nos estudos de biotransformação realizados com β-cariofileno e o ácido 3β-acetoxi-copálico estão apresentados nas **Tabelas 3** e **4**.

Os fungos filamentosos foram provenientes da "American Type Culture Collection" (ATCC) e algumas linhagens fornecidos gentilmente pelo Dr. Igor Parshikov e pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP).

As bactérias foram adquiridas pela ATCC e da da CHR Hansen, a qual fornece às indústrias alimentícias culturas de micro-organismos para a produção de alimentos funcionais probióticos.

Os experimentos com as bactérias do trato gastrointestinal também foram realizados em cultura mista na qual foram semeadas todas as bactérias utilizadas.

Tabela 3 – Fungos filamentosos utilizados nas biotransformações, origem, fonte do isolamento e aplicações

Fungos filamentosos	Origem	Isolado de	Aplicações e características relevantes
Aspergillus brasiliensis	ATCC - 16404	Mirtilo	Ensaio antimicrobiano de eficácia de conservantes, teste fungicida, controle de qualidade e análise de alimentos
Cunninghamella elegans	ATCC - 10028b	*	Produz substâncias bifenil hidroxilados
Cunninghamella echinulata var. *elegans*	ATCC - 8688A	*	Usado na oxidação de esteroides, transformações de alcaloides, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas
Cunninghamella echinulata var. *elegans*	ATCC - 9245	Sementes de *Linum usitatissimum* (linho)	Produção de esteroides, transformação de lactonas sesquiterpênicas e diversos medicamentos
Curvularia lunata	ATCC - 12017	*	Produção de esteroides, transformação de lactonas sesquiterpênicas e degrada hormônios de insetos na ecdise
Aspergillus alliaceus	ATCC - 10060	Escaravelho venenosos	Transformação de flavonoides
Beauveria bassiana	ATCC - 7159	Contaminante de laboratório	Realiza reações de hidroxilação, oxidação e glicosilação
Aspergillus niger	VKM F – 1119 **	Solo	Pertence a coleção Rússia de micro-organismos (Moscou, Rússia)
Aspergillus phoenicis	***	Solo (Montes Claros, MG)	
Aspergillus versicolor	***	Solo (Montes Claros, MG)	
Mucor rouxii	*** NRRL 1894	Solo	

Legenda: * = não há informações sobre a fonte de isolamento
** = Fornecido pelo Dr. Igor Parshikov
*** = Fornecido pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da FFCLRP

Tabela 4 – Bactérias utilizadas nas biotransformações, origem, fonte do isolamento e aplicações

Bactérias	Origem	Isolada de	Aplicações e características relevantes
Lactobacillus acidophilus	FERM FD DVS LA-5® - Probio-Tec™ **	*	Fornecidas às indústrias alimentícias para a produção de alimentos funcionais probióticos
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*	FERM FD DVS BB 12®- Probio-Tec™ **	*	Utilizado como suplemento de alimentos funcionais probióticos
Cultura mista (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*)	FERM F DVS ABT-4 **	*	Utilizado como suplemento de alimentos funcionais probióticos
Escherichia coli	ATCC - 25922	Isolado clínico	Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (teste de disco-difusão), controle de qualidade, avaliação de meio de cultura e análise de alimentos
Lactobacillus acidophilus	ATCC - 53544	*Swab* retal de bebê humano	Utilizado como suplemento na alimentação para animais
Bifidobacterium longum	ATCC - 55814	Fezes humana	Preparação de matéria-prima, fermentação de produtos alimentares, resistente a sais biliares, ácido gástrico e oxigênio
Lactobacillus johnsonii	ATCC - 33200	Sangue humano	
Lactobacillus rhamnosus	ATCC - 21052	Fezes humana	

Legenda: * = não há informações sobre a fonte de isolamento

** = Proveniente da CHR Hansen

3.7 Fungos filamentosos

3.7.1 Preservação

A manutenção das culturas dos fungos filamentosos foi realizada em água destilada esterilizada e os tubos foram mantidos a 4°C. Inicialmente, os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultivo apropriados para cada linhagem e as culturas foram incubadas em estufa de ar circulante (BOD) a 30°C por 7 dias. Após o crescimento, discos de micélio ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram transferidos, com o auxílio de um tubo de transferência (Sigma®), para criotubos contendo 3 mL de água destilada e os mesmos foram mantidos sob refrigeração a 4°C. Todos os materiais utilizados na etapa de preservação dos fungos foram previamente esterilizados.

3.7.2 Produção de esporos

Os fungos *A. niger* e *M. rouxii* foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura PDA, *A. brasiliensis* e *A. phoenicis* no meio agar Sabouraund, *A. alliaceus* e as linhagens do gênero *Cunninghamella* em agar malte. Todas as culturas foram incubadas por 7 dias a 30°C. Após o período de incubação foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada em cada placa e com o auxílio de uma alça de inoculação foi realizada a raspagem dos esporos que foram posteriormente transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca. Em seguida, foi efetuada a contagem do número de esporos das suspensões em câmara de Neubauer.

3.7.3 Curva de crescimento dos fungos filamentosos

a) Meio Pré-fermentativo

Após a padronização do inóculo descrito no item anterior, alíquotas foram transferidas para Enlenmeyers de 125mL contendo 15 mL de meio pré-fementativo (Jackson *et al*., 1993) e as culturas foram incubadas a 30°C, sob agitação constante de 120rpm. Para determinação da

quantidade de biomassa produzida, no período de 5 dias foram retirados a cada 24 horas Erlenmeyers contendo a massa micelial com o meio pré-fermentativo e Erlenmeyers controles contendo apenas o meio pré-fermentativo. As culturas foram filtradas à vácuo em papeis de filtro previamente pesados e após secagem em estufa a 50°C por 3 dias as massas miceliais foram mensuradas.

Os fungos *B. bassiana*, *A. versicolor* e *C. lunata* não esporularam nos meios e condições empregadas. Assim, para obtenção dos dados para construção das curvas de crescimento destes micro-organismos, cinco discos de micélio-agar foram transferidos para cada Erlenmeyer contendo meio pré-fermentativo.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata a partir do mesmo inóculo.

b) Meios fermentativos

Após os fungos atingirem a fase estacionária em meio pré-fermentativo as massas miceliais foram filtradas e transferidas para Erlenmeyers de 250mL contendo 30 mL do meio Koch's ou Czapek, mantidos sob agitação constante de 120 rpm a 30°C. Durante 15 dias foram retirados, a cada 24 horas, Erlenmeyers das respectivas culturas e dos meios de cultura, filtrados e após secagem em estufa a 50°C por 3 dias as massas foram pesadas.

3.7.4 Determinação dos valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do β-cariofileno e do ácido 3β-acetoxi-copálico frente aos fungos filamentosos

Com o intuito de evitar possíveis efeitos tóxicos dos diterpenos a serem biotransformados frente as linhagens avaliadas, foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos substratos frente aos micro-organismos utilizados. Foi utilizado o

método de microdiluição em placa, segundo a metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, M38-A, 2005), com adaptações.

Os fungos foram inoculados em meios sólidos previamente estabelecidos e mantidos durante 7 dias em B.O.D a 30°C. Após crescimento, para a preparação do inóculo, foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada e após raspagem dos esporos os mesmos foram transferidos para tubos previamente esterilizados. Alíquotas foram retiradas e os esporos foram contados em câmara de Neubauer.

Para preparo das amostras 1 mg de cada substrato foi solubilizado em 125 µL de dimetilsulfóxido (ácido 3β-acetoxi-copálico) ou em 125 µL de etanol (β-cariofileno), sendo essa solução denominada solução 1 (8000 µg/mL). Posteriormente, 20 µL da solução 1 foram diluídos em 80 µL do caldo de cultivo utilizado, sendo essa solução denominada solução 2 (1600 µg/mL).

Miconazol (Sigma®) foi utilizado como controle positivo e para o preparo da solução do antibiótico controle pesou-se 1mg do antibiótico, o qual foi solubilizado em 10mL de DMSO. Transferiu-se 1mL dessa solução para um tubo contendo 4 mL de meio Koch´s K1, chegando a uma concentração de 0,02mg/mL, sendo essa a solução uso para realização da técnica, considerando a potência do antibiótico de 100%.

Para a realização da técnica tentou-se mimetizar as condições experimentais dos processos de biotransformação mantendo, portanto, o meio de cultura e a quantidade do inóculo iguais aos utilizados nos processos. A concentração final de inóculo foi de $4x10^6$ esporos/mL.

Na primeira fileira da placa de 96 poços foram adicionados 100 µL do meio Koch´s K1, em seguida no primeiro poço foram depositados 100 µL da solução 2 e iniciou-se a diluição seriada. Após proceder com a diluição seriada, foram adicionados em cada poço 80 µL de caldo e 20 µL do inóculo, reduzindo a concentração de cada poço à metade. Desse modo as concentrações dos substratos testados variaram de 0,195 a 500 µg/mL.

Foram realizados o controle do diluente da amostra na mesma concentração utilizada e o controle do antibiótico padrão (miconazol) cujas concentrações variaram de a 0,01 a 5,9 µg/mL. Foram realizados também os controles de esterilidade dos meios de cultura, da última diluição das amostras, do antibiótico, do diluente e a viabilidade do inóculo. Após confecção das placas as mesmas foram incubas em B.O.D a 30°C por 7 dias.

Após o período de incubação foi adicionado em cada poço 20µL de solução aquosa de resazurina na concentração de 0,02%. A leitura dos resultados foi observada pela mudança ou permanência de coloração da mesma por meio de uma reação de oxi-redução, sendo azul (ausência de crescimento microbiano) e rosa (presença de crescimento microbiano) (Collins & Franzblau, 1997; Candeias *et al*., 1998; Franzblau, *et al*., 1998).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida como a menor concentração das amostras em que não houve crescimento bacteriano visível.

Para realização da CBM foi retirada alíquotas de 1µL de cada poço das placas de 96 poços, anteriormente descritas para a determinação da CIM, e inoculadas em placas de Petri contendo agar.

Esta técnica permitiu saber se as substâncias avaliadas na CIM atuaram com ação fungicida (causando a morte dos fungos) ou ação fungiostática (inibindo o crescimento fúngico).

3.7.5 Processos de biotransformação com os fungos filamentosos

Alíquotas do inóculo conforme descrito no item 3.7.2 foram transferidas para Erlenmeyers de 125mL contendo 15mL de meio pré-fermentativo de modo que a concentração final de esporos fosse de $4x10^6$ esporos/mL. As culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm, a 30°C até atingirem a fase estacionária.

Ao atingirem a fase estacionária em meio pré-fermentativo, as massas miceliais foram transferidas para Erlenmeyers de 250mL contendo 30mL do meio fermentativo Koch´s K1.

Após finalização da fase exponencial de crescimento em meio fermentativo, soluções nas concentrações de 100µg/mL de ácido 3β-acetoxi-copálico ou de 500µg/mL de β-cariofileno foram adicionadas nas culturas. As culturas foram mantidas a 30°C sob agitação de 120rpm por 15 dias.

A cada 24 horas, três Erlenmeyers foram retirados (um contendo meio de cultura, inóculo e a substância, outro Erlenmeyer controle, contendo o meio de cultura, inóculo e o solvente utilizado para solubilizar o substrato e o terceiro Erlenmeyer, controle, contendo apenas o meio fermentativo com o substrato). Posteriormente, as culturas foram filtradas, separadamente e os caldos resultantes foram posteriormente submetidos a processos de partição líquido-líquido.

As massas miceliais resultantes das filtrações foram congeladas e após congelamento foram submetidas a processos de sonicação em ultra-som em 10 mL de acetato de etila por 10 minutos, por três vezes consecutivas, para a completa extração das substâncias presentes nos micélios.

Com as culturas provenientes dos processos de biotransformação do β-cariofileno nos tempos de 5, 10 e 15 dias também foram realizadas microextrações em fase sólida (SPME) no modo headspace na tentativa de captar as substâncias voláteis presente, já que o sesquiterpeno é uma substância volátil. O sistema foi inserido na parte superior de cada Erlenmeyer e em seguida a fibra foi exposta por 40 minutos a 30°C para captação dos voláteis presentes nas amostras.

3.8 Bactérias

3.8.1 Preservação e ativação

Para preservação das bactérias lácteas tubos criogênicos previamente esterilizados foram utilizados adicionando-se 1 mL de caldo DeMan-Rogosa-Sharpe suplementado contendo

20% de glicerol. Nesse caldo foi adicionado uma suspensão de bactérias com crescimento de 72 horas em agar MRS suplementado. Após a turvação adicionou-se 1mL de sangue desfibrinado de carneiro, homogeneizou-se, e em seguida os tubos foram mantidos em freezer a -20°C.

Colônias de *E. coli* com crescimento de 24 horas em agar MH foram adicionadas em tubos contendo 3 mL de caldo TSB, sendo posteriormente incubadas por 24 horas. Após o período de incubação foram adicionados 500 µL de uma solução de glicerol 80% e, em seguida, alíquotas foram transferidas para tubos criogênicos e condicionadas em freezer a -20°C.

Para posterior ativação das cepas bacterianas, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio contendo seus respectivos caldos e após os tempos de incubação de 24 ou 72 horas alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo agar. As placas foram incubadas a 37°C na atmosfera e tempo de incubação adequados para cada espécie.

As bactérias utilizadas foram cultivadas a 37°C em câmara de anaerobiose (atmosfera de 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de gás hidrogênio) ou aerobiose em meios de cultura e tempo de crescimento diferentes umas das outras. As condições de cultivo para cada bactéria estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Bactérias, meios de cultura, tempo de crescimento e atmosfera utilizados nos ensaios

Bactérias	**Meios de cultura (Caldo e Agar)**	**Tempo de crescimento**	**Atmosfera de incubação**
L. acidophilus, cultura mista CHR, *L. acidophilus*(ATCC), *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* e mistura	MRS suplementado com L-cisteína/HCl (0,05%) e glicose 33,33% (Goderska, *et al*., 2008)	72 horas	Anaerobiose
Bifidobacterium sp, *B. longum*	MRS suplementado com L-cisteína/HCl (0,05%)	72 horas	Anaerobiose
E. coli	MH	24 horas	Aerobiose e anaerobiose

Também foi utilizado para ativação de todas as bactérias o meio GAM quando o mesmo foi o meio de escolha dos processos da biotransformação. Para as bactérias lácteas advindas da ATCC foi utilizado também o tempo de crescimento de 48 horas.

3.8.2 Padronização do inóculo e curvas de crescimento bacteriano

A quantificação do inóculo bacteriano foi realizado com a padronização em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm. Após o crescimento bacteriano em agar, colônias foram transferidas para tubos contendo caldo (MRS ou MH), estes foram homogeneizados e a leitura da turbidez foi realizada em espectrofotômetro. Em seguida foram realizadas diluições em solução salina e 10 µL da diluição final foram transferidos para placas de Petri contendo agar e incubadas para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

Várias absorbâncias foram mensuradas, assim para cada bactéria foi adquirido uma absorbância diferente, permanecendo para todas as bactérias um inóculo inicial de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Como branco foi utilizado o meio de cultura sem micro-organismos.

Decorrido o período de crescimento, as culturas foram inoculadas em caldo MRS suplementado ou caldo MH (para *E. coli*), e alíquotas das culturas foram retiradas nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 66 e 72 horas, e adicionadas em agar MRS suplementado ou agar MH, sendo as placas incubadas para contagem das células viáveis.

3.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos substratos frente as bactérias do trato gastrointestinal

As bactérias foram inoculadas em seus respectivos meios em agar (**Tabela 5**), após o crescimento foram suspensas em tubos de ensaios contendo seus respectivos caldos e as leituras

foram realizadas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm até a absorbância padronizada anteriormente.

Para a realização da técnica tentou-se mimetizar as condições experimentais dos processos de biotransformação mantendo iguais o meio de cultura e o tamanho do inóculo utilizados. A concentração final bacteriana utilizada nos experimentos iniciais foi de 10^6 UFC/mL (Charteris *et al.*, 1998).

Os procedimentos realizados para a determinação da CIM foram similares ao descrito no item **3.7.4**, segundo a metodologia preconizada pelo CLSI (M7-A6, 2005; M11-A8, 2012) com adaptações, sendo as condições de cultivo e meios utilizados descritos na **Tabela 5**.

Os preparos das amostras foram realizados conforme descrito no item **3.7.4** alterando os meios de cultura empregados.

Penicilina e Estreptomicina foram utilizados como controles positivos, sendo que 1 mg dos mesmos foram pesados em tubos previamente esterilizados e solubilizados em tampão de Penicilina e tampão de Estreptomicina, respectivamente. Em seguida transferiu-se 1 mL de cada solução para tubos contendo 4mL de caldo (**Tabela 5**). Estas soluções foram usadas para confecção das placas de 96 poços.

Após o período de incubação, para a leitura dos resultados, foram adicionados em cada poço 30µL de solução aquosa de resazurina na concentração de 0,02%. A leitura dos resultados foi observada pela mudança de coloração (rosa), a qual indica presença de crescimento bacteriano, ou permanência da mesma (azul), indicando ausência de crescimento microbiano (Collins & Franzblau, 1997; Candeias *et al*., 1998; Franzblau, *et al*., 1998).

Para realização da CBM foi retirada alíquotas de 1µL de cada poço das placas de 96 poços, anteriormente descritas para a determinação da CIM, antes da adição da resazurina e inoculadas em placas de Petri contendo agar específico para cada micro-organismo.

Esta técnica permitiu avaliar se as substâncias atuaram na CIM com ação bactericida (causando a morte das bactérias) ou ação bacteriostática (inibindo o crescimento bacteriano).

3.8.4 Processos de biotransformação com bactérias do trato gastrointestinal

Para a realização dos processos de biotransformação, as culturas estocadas foram reativadas e após crescimento os inóculos foram preparados e alíquotas foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de caldo. O inóculo final padronizado em cada Erlenmeyer foi de 10^6 UFC/mL nos experimentos inicias (Charteris *et al.*, 1998).

As bactérias foram cultivadas sob agitação, com auxílio de barra magnética, nas atmosferas e temperaruras adequadas, até atingirem a fase estacionária (36 horas para *Bifidobacterium* sp., 18 horas para a mistura láctea e 12 horas para *L. acidophilus* e *E. coli*), sendo então adicionados os substratos solubilizados. As concentrações finais dos substratos foram de 100 µg/mL para o ácido 3β-acetoxi-copálico e de 500 µg/mL para o β-cariofileno em cada Erlenmeyer. Os processos de biotransformação foram avaliados nos tempos de 6, 12 e 24 horas após a adição dos terpenos.

Juntamente com as biotransformações foram realizados dois controles, um da cultura bacteriana contendo o diluente e outro controle do meio de cultura contendo 100 e 500µg/mL do ácido 3β-acetoxi-copálico e β-cariofileno, respectivamente.

Após o período de incubação, os conteudos de cada Erlenmeyer foram transferidos para tubos Falcon, centrifugados durante três minutos a 4000 rpm, sob refrigeração de 15 °C, e em seguida os sobrenadantes foram separados para posterior partição com solventes orgânicos.

A microextração foi realizada com os controles e biotransformações do β-cariofileno conforme descrito no item **3.7.5** porém com os tempos de análise de 6, 12 e 24 horas.

Após análise dos primeiros resultados obtidos foram realizadas algumas alterações nos processos de biotransformação com as bactérias. Foram adicionados 20g/L do prebiótico inulina (Nazzaro *et al.*, 2012) que é um carboidrato considerado ingrediente funcional recomendado para suplementação alimentar propiciando no aumento de bactérias pertencentes

a microbiota humana resultando em benefícios a saúde (Carabin & Flamm, 1999; Kaur & Gupta, 2002; Delzenne *et al*., 2002).

Outra alteração realizada no processo foi o aumento na concentração do inóculo devido ao baixo rendimento apresentado nos processos, sendo alterado para 1,2 x 10^9UFC/mL (escala 4 McFarland) já que a concentração bactéria relatada no trato gastrointestinal é da ordem de 10^3 a 10^{13} UFC/mL (Sousa *et al*., 2008; Montalto *et al*., 2009; Tiihonen *et al*., 2010).

3.9 Obtenção dos extratos brutos e microextração em fase sólida das biotransformações e controles

Nos processos com o β-cariofileno foram realizadas as microextrações em fase sólida (SPME) no modo headspace, nesse processo o sistema foi inserido na parte superior do Erlenmeyer e em seguida a fibra foi exposta por 40 minutos a 30°C ou 37°C para captação dos voláteis presentes na amostra.

Os caldos de cultivo obtidos dos controles e das biotransformações do substrato β-cariofileno foram submetidos a partições líquido-líquido com n-hexano e acetato de etila e para os caldos obtidos dos experimentos realizados com o ácido 3β-acetoxi-copálico foram realizadas apenas partições líquido-líquido com acetato de etila. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, em temperaturas inferiores a 20°C, para obtenção dos extratos. Todos os extratos foram protegidos da luz e armazenados sob refrigeração.

Os micélios resultantes das filtrações foram inicialmente armazenados em freezer -4°C. Para a obtenção do extrato os micélios foram retirados do freezer, triturados, transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de acetato de etila permanecendo em ultrassom por 30 minutos. Após esse período o conteúdo foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida

3.10 Avaliação dos perfis químicos dos extratos obtidos

As fibras e os extratos brutos obtidos dos controles e das biotransformações de β-cariofileno foram analisadas por cromatografia de fase gasosa acoplado a um detector seletivo de massas (GC/EM).

Foi utilizado o cromatógrafo a gás da marca Shimadzu com coluna capilar de sílica fundifa DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25µm). Como gás de arraste foi utilizado Helio. A rampa de temperatura do forno iniciou-se em 70ºC aumentando para 140°C elevando-se a temperatura em 5°C/min; em seguida a temperatura foi de 140 a 180°C com 1,5°C/min e de 180°C a 200°C com 20°C/min, finalizando a análise com o tempo de 41 minutos e 67 segundos. A temperatura do injetor foi de 240°C, operando no modo Split de 30:1 para as amostras dos extratos brutos. Os espectros de massas foram obtidos no modo impacto eletrônico a 70eV, com escala de massas variando entre 40-500 *m/z*.

Com o intuito de identificar os metabólitos foram utilizados os bancos de dados das bibliotecas de espectros de massas wiley 7.0 e Nist para comparação dos espectros obtidos.

As fibras foram inseridas no injetor manual do cromatógrafo e expostas por 10 minutos a temperatura de 250°C para a completa desorção dos analitos. Os extratos brutos foram evaporados até obter 1mL do mesmo e injetados 2 µL de cada amostra.

Os extratos brutos advindos do ácido 3β-acetoxi-copálico foram analisados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo Waters® acoplado ao detector Corona® de aerossol carregado (CAD) da Thermo Scientific, com auxílio do software Empower. Foi utilizada coluna de fase reversa C_{18}, SunFire (Waters®, 100x4,60 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm) acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase estacionária e coluna de fase reversa Kromasil (C18, 250,0 x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5µm, Varian®, acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase estacionária).

O gradiente utilizado nas análises está apresentado na **Tabela 6,** composto de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético, vazão foi de 1,0 mL/min, sendo injetados 30 µL de cada fração na concentração de 1,0mg/mL solubilizados na fase móvel inicial.

Tempo (minutos)	**Água acidificada**	**Acetonitrila**
0	80%	20%
30	30%	70%
50	0	100%
60	0	100%
65	80%	20%
70	80%	20%

Tabela 6: Gradiente de eluição utilizado para as análises dos extratos obtidos das biotransformações do ácido 3β-acetóxi-copálico

Os extratos brutos das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com as bactérias também foram analisados utilizando-se HPLC acoplada a Espectrometria de Massas

As análises dos extratos e controles por LC-MS e LC-MS/MS foram realizadas usando um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao espectrômetro de massas tandem quadrupolo Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo negativo de análise. Um volume de 10 µL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm diâmetro da partícula) Supelco. A fase móvel usada para eluição isocrática consistiu de 30% de uma solução aquosa de acetato de amônio 0,1% como sistema A e 70% de acetonitrila como sistema B. A vazão foi de 0,5 mL min-1 e o tempo total do desenvolvimento cromatográfico foi de 30 min.

Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar foi de 2.5 kV, voltagem do cone de 40 V, source offset de 60 V, temperatura da fonte

Z-spray igual a 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N_2 de 300°C, vazão do gás de dessolvatação de 700 L h^{-1}. A faixa de massas usada no modo de análise Full-scan foi de 100 a 600 unidades de massa (u). Os experimentos de LC MS/MS foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ([M – H]-). As energias de colisão foram otimizadas para cada substancia de interesse.

3.11 Biotransformações em escala ampliada, isolamento e determinação estrutural dos metabólitos obtidos

Na ampliação da escala foi determinado o tempo de incubação e meio de cultura mais promissores, após análise e comparação dos perfis químicos das triagens realizadas

Nos processos de biotransformação em escala ampliada realizados com os fungos filamentosos aumentou-se o número de Erlenmeyers, mantendo as condições descritas no item 3.7.5. Para as bactérias foram aumentados em 3 vezes o volume do meio de cultura, tamanho do Erlenmeyer, quantidade de inóculo e quantidade de substrato, mas mantendo as concentrações finais iguais as realizadas na triagem.

Os conteúdos dos Erlenmeyers foram filtrados e os caldos resultantes foram submetidos a partições líquido-líquido com acetato de etila e concentrados por evaporação sob vácuo para obtenção dos extratos brutos.

Os extratos obtidos dos processos com o ácido 3β-acetoxi-copálico em escala ampliada foram pré-fracionados utilizando cartuchos de SPE contendo 1 g de fase estacionária composta por sílica modificada C18. Em cada cartucho foram adicionados até 100 mg de extrato, o qual foi eluído com volume de 6 mL de fase móvel composta por acetonitrila e água. O gradiente com proporção crescente do solvente orgânico utilizado foi de 10% para cada cartucho, iniciando com 100% de água até 100% de acetonitrila. Para auxiliar na eluição da fase móvel foi utilizado um sistema a vácuo (VISIPREP-SPE, SUPELCO®).

As frações obtidas na cromatografia por SPE foram analisadas por HPLC-CAD em escala analítica e posteriormente, os analitos contidos nas mesmas, foram isolados com auxílio de uma coluna cromatográfica Sunfire semi-preparativa de fase reversa (C_{18}, 10x100 mm, tamanho de partícula 5µm, Waters®), acoplado a uma pré-coluna com mesmo material de empacotamento e também a coluna semi-preparativa de fase reversa Kromasil (C_{18}, 250,0 x 10 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5µm, Varian®, acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase estacionária)

Os sistemas eluentes foram gradientes compostos por acetonitrila e água, em diferentes proporções, dependendo da complexidade da fração e a vazão foi de 4,7 e 3,0 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µL e a quantidade injetada foi de aproximadamente 3 mg por injeção. As frações obtidas foram evaporadas em evaporador centrífugo (*Speed-vacum* Savant SPD2010) a 45°C durante 24 horas e armazenadas em dessecador até análise de RMN, após foi mantida sob refrigeração.

Os dados de RMN das substâncias isoladas foram adquiridos em tubos Shigemi®, em espectrômetro Bruker DRX 400 ou 500, utilizando como solvente clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) ou metanol deuterado (CD_3OD). Foram obtidos espectros uni e bi dimensionais para todos os derivados. Os processamentos dos espectros foram feitos com auxílio do software MestReNova 6.0.2.

Para a obtenção dos espectros de massas em alta resolução utilizou-se o espetrômetro de massas microTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics®), com nitrogênio como gás de colisão, na temperatura de 200 °C. As amostras foram previamente diluídas em metanol:água na proporção de 1:1, na concentração de 0,02 mg/mL, sendo realizadas infusões diretas.

3.12 Ensaios citotóxicos

Os ensaios citotóxicos do ácido 3β-acetoxi-copálico e de seus metabólitos foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LAGBIM) da Universidade de Franca (UNIFRAN). O método utilizado foi o ensaio de citotoxidade XTT. As linhagens avaliadas foram de células humanas tumorais a MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e normais MCF-10A (células epiteliais de mama).

As linhagens foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e foram cultivadas em meio de cultivo composto por meio HAM F10+DMEM (Sigma, St Louis, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) para a linhagem MCF-10A e 20% SBF para a linhagem MCF-7 e mistura de antibióticos penicilina/estreptomicina (10 $mL.L^{-1}$, Sigma, St Louis, USA) acrescido de sulfato de canamicina (10 mg. L^{-1}) utilizando garrafas de cultivo de 25 mm^2 (TPP, Swizerland) ou placas de poços múltiplos quando necessário. Durante o tempo de cultivo e tratamentos as células foram mantidas em estufa de CO_2 à 37ºC. Os tempos de cultivo e tratamento foram determinados com base nos resultados obtidos pelos ensaios de citotoxidade.

A citotoxidade foi determinada por meio da utilização do Cell Proliferation Kit (Roche Applied Science), baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas formando o corante formazana alaranjado. As células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO_2 à 37ºC por 24 h. Após esse período o protocolo de tratamento consistiu em expor as células às diferentes concentrações do ácido 3β-acetoxi-copálico e seus metabólitos (7,8 a 1000 µg/mL) por 24 horas. As substâncias testadas foram diluídas em DMSO, sendo a concentração máxima do diluente em cultura de 0,1%. Como controle positivo foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (0,5 µM) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Após 24 horas de exposição foi realizada a lavagem das células com tampão salino fosfato (PBS) 1X e incubação das mesmas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após esse tempo, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados com auxílio do GraphPad Prisma 5.0 e segundo seus valores de IC_{50}.

Resultados e Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Isolamento do ácido 3β-acetoxi-copálico

A oleorresina (25,15g) de *Copaifera langsdorffi* foi inicialmente, submetida a cromatografia líquida sob pressão reduzida, obtendo-se 7 frações que estão apresentadas na **Tabela 7**, com os respectivos pesos e rendimentos obtidos.

Tabela 7: Frações obtidas na cromatografia líquida sob pressão reduzida da oleorresina de *Copaifera langsdorfii*

Frações	Eluente	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Fr 1	n-hex	12,72	50,6
Fr 2	n-hex:AcOEt (9:1)	7,14	28,4
Fr 3	n-hex:AcOEt (4:1)	2,23	8,9
Fr 4	n-hex:AcOEt (7:3)	1,29	5,1
Fr 5	n-hex:AcOEt (1:1)	0,96	3,8
Fr 6	AcOEt	0,38	1,5
Fr 7	Metanol	0,28	1,1

n-hex: n-hexano, AcOEt: Acetato de etila

As frações foram analisadas por CCDC de fase normal (**Figura 12**), comparando com um padrão cedido pelo professor e pesquisador Dr. Vladmir Constantino Gomes Heleno da Universidade de Franca. Após a revelação, comparando as frações obtidas com o padrão, observou-se que na **fração 3**, provavelmente, havia o ácido 3β-acetoxi-copálico, sendo esse composto denominado como **A**, em destaque na **Figura 12**. Essa fração foi obtida com um rendimento de 8,86% e massa de 2,23g. O fator de Retenção (R_f) do padrão foi de 0,39, e o provável composto (**A**) na oleorresina apresentou R_f de 0,32 e na fração 3 o R_f foi de 0,33, sendo as diferenças nos valores de R_f devido a complexidade da oleorresina e da Fração 3.

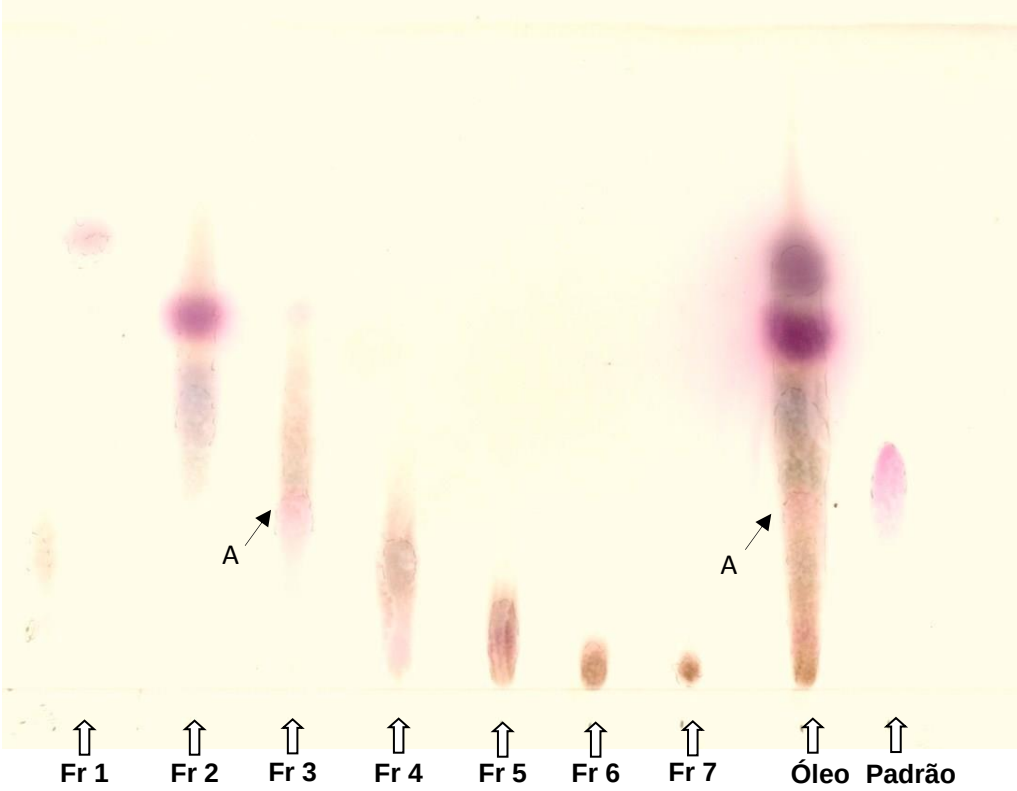


Figura 12: Cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas da primeira coluna realizada com a oleorresina de *C. langsdorfii*, e padrão (ácido 3β-acetoxi-copálico).

Os perfis cromatográficos analisados por HPLC-CAD, das frações e do padrão, também sugeriram que na fração 3 haveria o composto de interesse. Na **Figura 13** está apresentado o perfil cromatográfico da oleorresina de *C. langsdorfii*, da qual foi isolado o composto de interesse e a **Figura 14** apresenta o padrão cedido pelo Prof Dr. Vladimir, após a solubilização com éter para retirada de impurezas observadas anteriormente na CCDC.

O composto **A** indicado na **Figura 13**, provavelmente corresponde ao ácido 3β-acetoxi-copálico, também indicado na **Figura 14,** na análise do padrão.

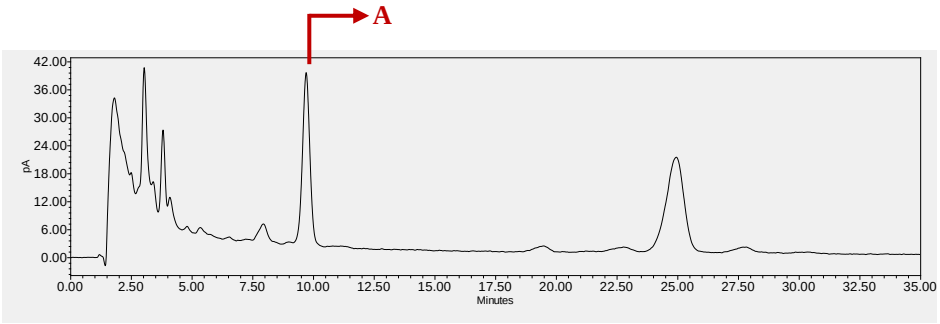


Figura 13: Perfil cromatográfico da oleorresina de *C. langsdofii* obtido por HPLC-CAD

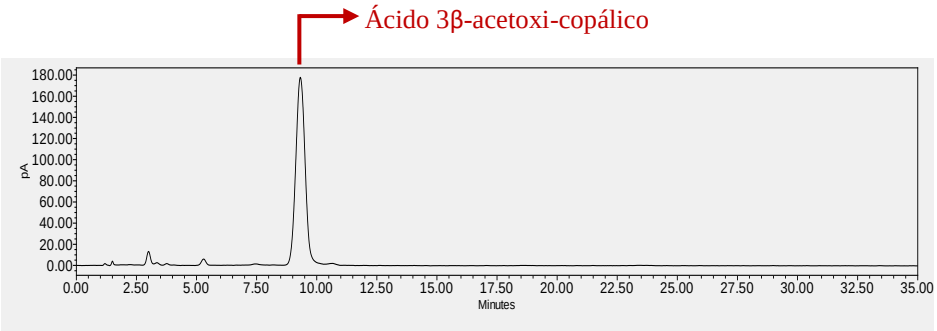


Figura 14: Cromatograma do padrão (ácido 3β-acetoxi-copálico) obtidos por HPLC-CAD

Os cromatogramas das frações obtidas após a realização da primeira coluna cromatográfica estão apresentados na **Figura 15**. Analisando os cromatogramas das frações observa-se que o composto A está presente na fração *n*-hexano/acetato de etila (4:1) com tempo de retenção de 9,57 minutos.

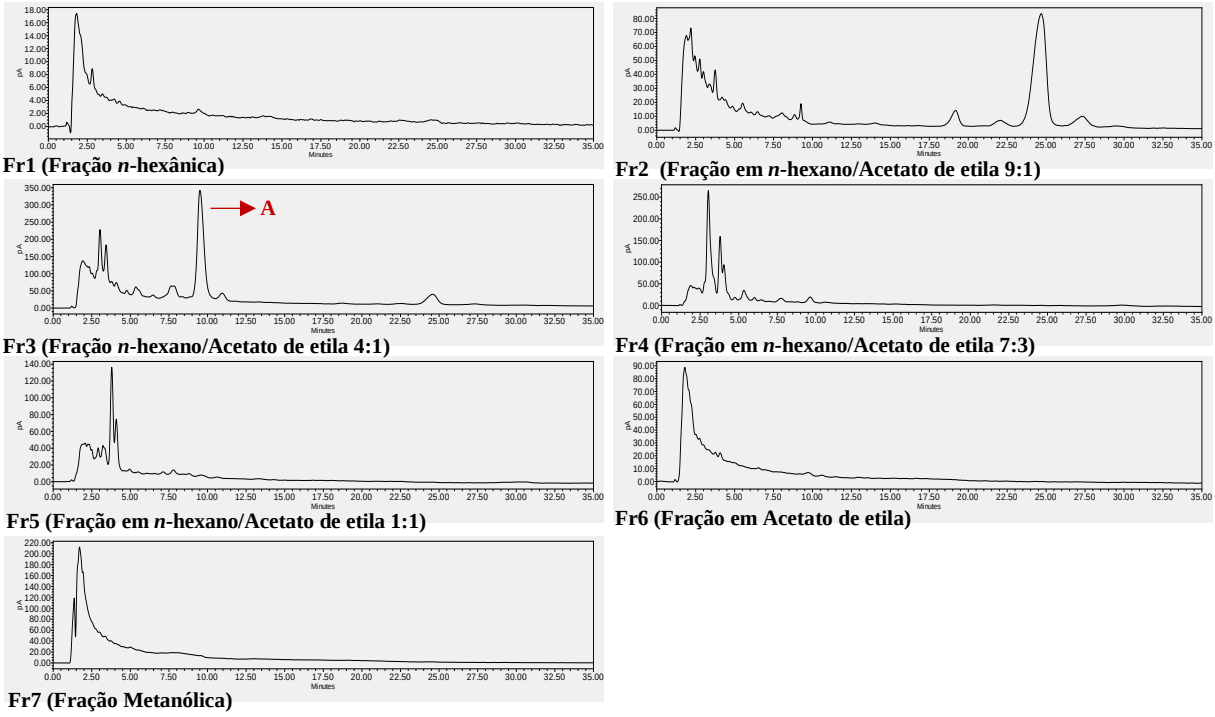


Figura 15: Cromatogramas das frações obtidas da 1° coluna cromatográfica realizada com a oleorresina de *C. langsdorfii*.obtidos por HPLC-CAD.

A fração *n*-hexano/acetato de etila 4:1 (**Fr3**) foi selecionada para prosseguir com o isolamento do ácido 3β-acetoxi-copálico. Na segunda coluna realizada com dois gramas da **Fr3** obteve-se 7 novas frações que estão descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8: Frações obtidas na cromatografia líquida sob pressão reduzida da **Fração 3**

Frações	Eluente	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Fr 3.1	n-hex/AcOEt (9:1)	0,3176	15,9
Fr 3.2	n-hex /AcOEt (7:1)	0,7176	35,9
Fr 3.3	n-hex /AcOEt (5:1)	0,216	10,8
Fr 3.4	n-hex /AcOEt (4:1)	0,2322	11,6
Fr 3.5	n-hex /AcOEt (7:3)	0,1392	7,0
Fr 3.6	AcOEt	0,0272	1,4
Fr 3.7	Metanol	0,0408	2,0

n-hex: n-hexano, AcOEt: Acetato de etila

As frações obtidas (**Tabela 8**) foram analisadas por CCDC de fase normal (**Figura 16**) e após a revelação, comparando as frações obtidas com o padrão, observou-se que o composto **A** estava presente nas frações hexano/acetato de etila 9:1 (**Fr 3.2**) e hexano/acetato de etila 5:1 (**Fr 3.3**) com Rf de 0,40 em ambas as frações. O Rf do padrão nessa CCDC foi de 0,39

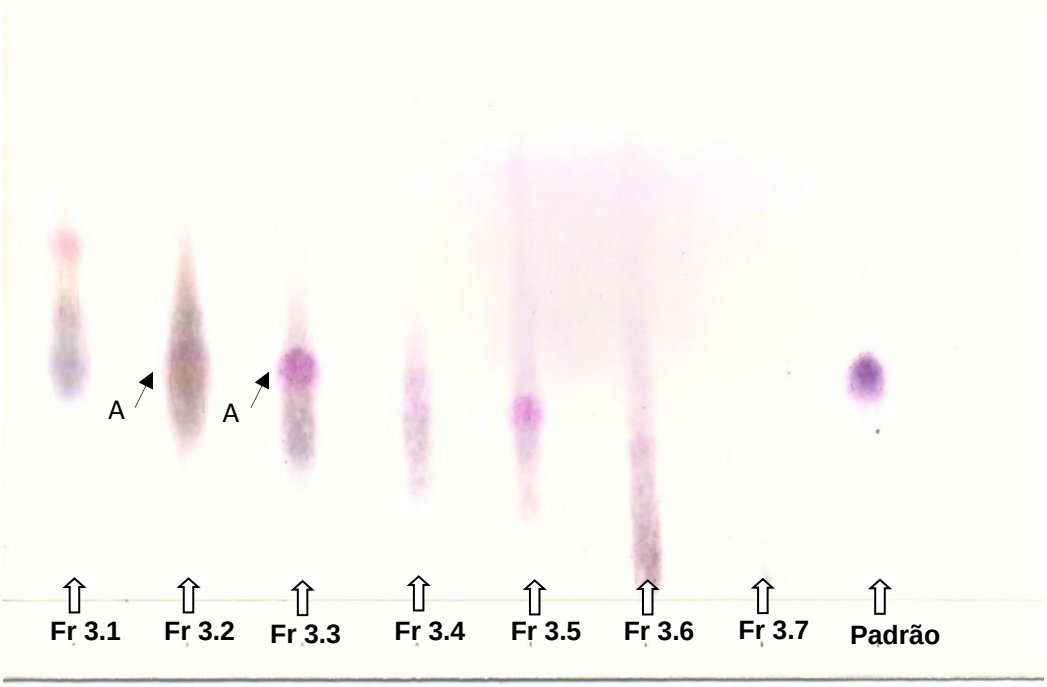


Figura 16: Cromatografia em camada delgada comparativa do padrão e das frações obtidas da coluna realizada com a Fração 3.

As frações nas quais foram observadas o composto **A** foram purificadas solubilizando as mesmas em n-hexano, separando-se em seguida os sobrenadantes, obtendo-se assim o precipitado das Frações 3.2 e 3.3 com massas de 0,098g e 0,198g, respectivamente. Considerando as massas obtidas, podemos destacar que a fração hexano/acetato de etila (5:1) foi a que propiciou maior rendimento da substância A, mesmo considerando que a massa da **Fr 3.2** foi superior a **Fr 3.3**.

A **Figura 17** apresenta os cromatogramas das frações obtidas da segunda coluna realizada com a fração 3 visando o isolamento do composto **A**.

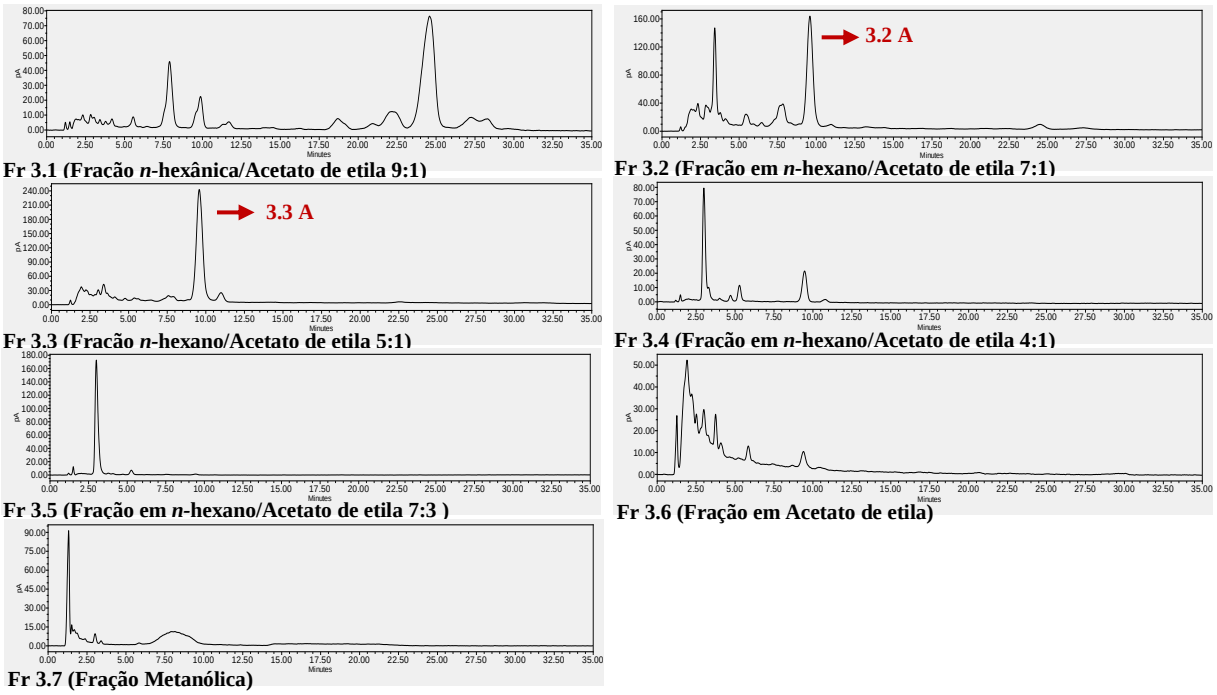


Figura 17: Cromatogramas das frações obtidas da 2° coluna cromatográfica da Fração 3 obtidos por HPLC-CAD

Analisando os cromatogramas pode-se verificar que a substância **A** também foi detectada em outras frações, fato que pode ter ocorrido devido ao aumento gradual de polaridade no gradiente de eluição utilizado.

As análises dos espectros de RMN das substâncias isoladas possibilitaram a confirmação da identidade da substância codificada até então com **A**. Os espectros do composto isolado estão nos **Apêndices 1** a **5.**

No processo de isolamento do ácido 3β-acetoxi-copálico a partir de oleorresina de *Copaifera* sp comercial foram obtidos 296 mg do mesmo, sendo o rendimento de 1,18%.

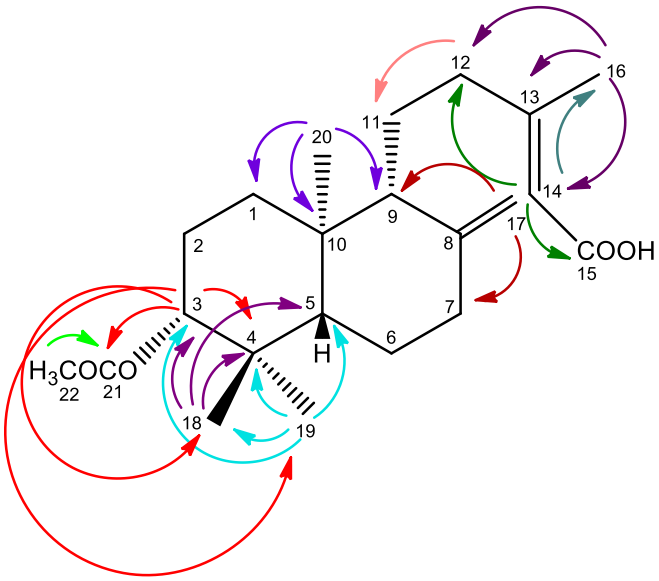


Figura 18: Estrutura química do ácido 3β-acetoxi-copálico (ácido *ent*-3β-acetoxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico) com dados de correlações observadas no HMBC

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndice 1**) dessa substância muitos sinais na região entre δ_H 0,72 e δ 2,42, característicos dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos presentes na grande maioria dos diterpenos. Destaca-se nesse espectro a presença de dois *s(l)* em δ_H 5,67 e em 4,88, integrados para 1H cada, atribuídos respectivamente aos hidrogênios olefínicos H-14, e H-17b. Um sinal aparece em δ_H 4,52 (*m*) integrado para dois hidrogênio podendo ser atribuído ao hidrogênio olefínico H-17a e ao H-3. Ainda no espectro de RMN de ^{1}H verifica-se a presença de cinco sinais (singletos, integrados para 3H cada) em δ_H 0,72, 0,85, 0,87, 2,17, e 2,06 que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios dos grupos metílicos ligados nos carbonos C-20, C-19, C-18, C-16 e a do grupamento –$OCOCH_3$.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 2**) da substância **A** observa-se a presença de 22 sinais podendo-se destacar os carbonos carbonílicos em δ_C 171,4 e 171,0 que foram atribuídos e confirmados com as análises do mapa de contornos HMBC (**Apêndice 5**), respectivamente aos carbonos C-15 e C-21, os carbonos olefínicos em δ_C 107,0, 114,8, 147,4 e 163,7 atribuídos respectivamente aos carbonos C-17, C-14, C-8 e C-13. Todas as atribuições referentes aos

átomos de hidrogênios e carbonos do composto **A** (**Tabela 9**) foram realizadas com auxílio da literatura.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz), HMQC e HMBC obtidos em $CDCl_3$ referentes à substância **3.2 A** (*δ=ppm*)

Posição	***δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral**	***δ* ^{13}C/HMQC**	***δ* ^{13}C** Segundo, Braun *et al.*, 1977	**HMBC**
1	1,24 *m*; 1,77 *m*	36,7	36,8	
2		24,2	24,3	
3	4,52 *m* 2H	80,6	80,7	16,5, 28,2, 38,0; 171,0
4	-	38,0	38,1	
5	1,17 *m*	54,6	54,8	
6		23,8	24,0	
7		37,9	38,1	
8	-	147,4	147,5	
9	1,56 *s-l* 1H	55,7	55,9	
10	-	39,2	39,3	
11		21,6	21,8	
12	1,99 *m*; 2,32 *m*	39,9	40,0	21,6
13	-	163,7	163,4	
14	5,67 *s-l* 1H	114,8	115,1	19,2; 39,9; 171,4
15	-	171,4	171,8	
16	2,17 *s* 3H	19,2	19,2	39,9; 114,8; 163,7; 171,4
17	a) 4,52 *m* 2H; b) 4,88 *s* 1H	107,0	107,0	37,9; 55,7; 171,4
18	0,87 *s* 3H	28,2	28,3	16,5; 38,0; 54,6; 80,6
19	0,85 *s* 3H	16,5	16,5	28,2; 38,0; 54,6; 80,6
20	0,72 *s* 3H	14,5	14,5	39,3; 36,7, 55,7
21	-	171,0	171,0	
22	2,06 *s* 3H	21,3	21,3	171,0

4.2 Condições de cultivo dos micro-organismos avaliados

4.2.1 Produção de esporos dos fungos filamentosos

Na avaliação e monitoramento, após 7 dias a 30°C, do crescimento dos fungos filamentosos utilizados em diferentes meios de cultura foi possível verificar a quantidade de esporos/mL produzidos nos meios de cultura agar extrato de malte, agar batata dextrose (PDA) e agar Sabouraud. Os valores obtidos estão apresentados na **Figura 19**.

Os fungos filamentosos *B. bassiana*, *Curvularia lunata* e *A. versicolor* não esporularam nos meios de cultura, temperatura e condições de atmosfera avaliadas.

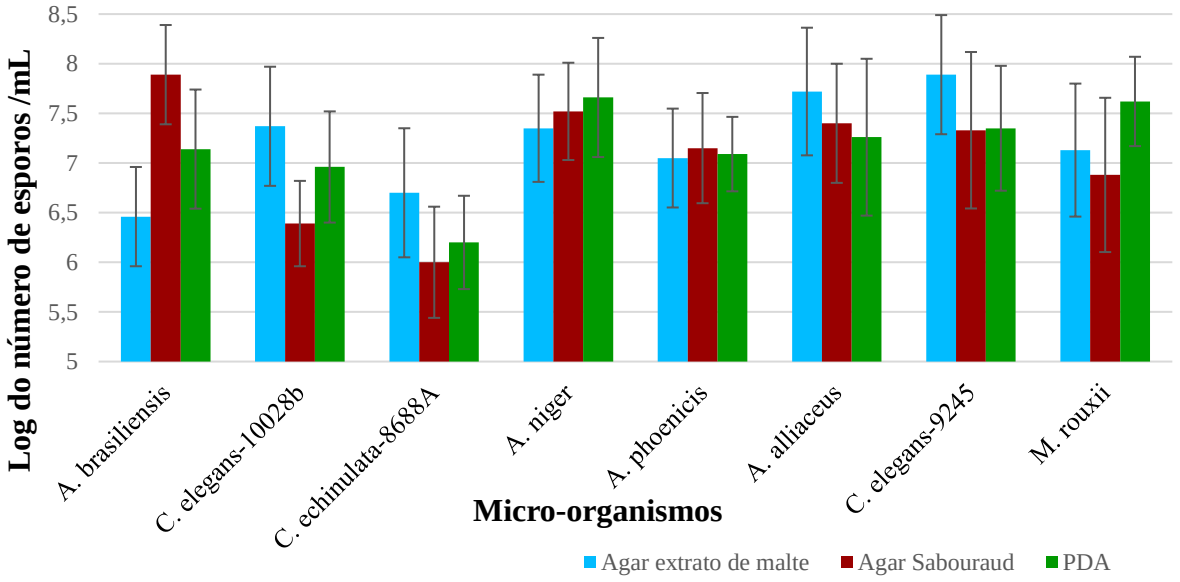


Figura 19: Média do número de esporos/mL em diferentes meios de cultura

Na contagem dos esporos em diferentes meios de cultura pode-se verificar que *A. brasiliensis* e *A. phoenicis* produziram a maior quantidade de esporos no meio agar Sabouraud nos valores de 7,9 x 10^7 e 1,4 x 10^7 esporos/mL respectivamente, sendo o agar extrato de malte o meio de cultura em que ambos esporularam menos.

O meio de cultura agar batata dextrose (PDA) foi o que propiciou o maior número de esporos para os fungos *A. niger* e *M. rouxii* nos valores de 4,6 x 10^7 e 4,2 x 10^7 esporos/mL e o de menor esporulação foram agar malte e Sabouraud respectivamente.

Para *A. alliaceus* com 5,3 x 10^7 esporos/mL e as linhagens do gênero *Cunninghamella* avaliadas o melhor meio de cultura foi o agar extrato de malte com 2,3x10^7 (*C. elegans* 10028b), 7,8 x 10^7 (*C. elegans* 9245) e 5,0 x 10^6 esporos/mL (*C. echinulata*) e o meio agar Sabouraud foi o que propiciou a produção de menor número de esporos para as três linhagens de *Cunninghamella* e PDA para *A. alliaceus*.

4.2.2 Produção de biomassa dos fungos filamentosos em meio pré-fermentativo

Os fungos filamentosos podem ser divididos em 4 fases principais em seu crescimento, constituídas da fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio, nessas fases diferentes enzimas são produzidas (Finkelstein & Ball, 1992).

Os processos de biotransformação são realizados por micro-organismos geralmente quando os mesmos se encontram na fase estacionária de crescimento, uma vez que nesta fase as enzimas produzidas são menos específicas (Robinson, *et al*., 2001) e as enzimas participantes da biossíntese dos metabólitos secundários, nessa etapa do crescimento, são amplificadas (Finkelstein & Ball, 1992).

O meio pré-fermentativo utilizado é rico em nutrientes, permitindo assim o desenvolvimento adequado da massa micelial a partir das células reprodutivas (Jackson *et al*., 1993).

Após a padronização da quantidade de esporos dos fungos utilizados nos processos de biotransformação, os mesmos foram inoculados nos meios pré-fermentativos e as massas miceliais obtidas mensuradas durante 7 dias estão apresentadas nas **Figuras 20** a **22.**

Com os resultados obtidos para as diferentes espécies de *Aspergillus* pôde-se determinar que a fase estacionaria inicia 24 horas após a inoculação (**Figura 20**), exceto para *A. versicolor*

que iniciou após 48 horas e seu controle também foi diferente dos demais devido a adição de discos de micélio-agar.

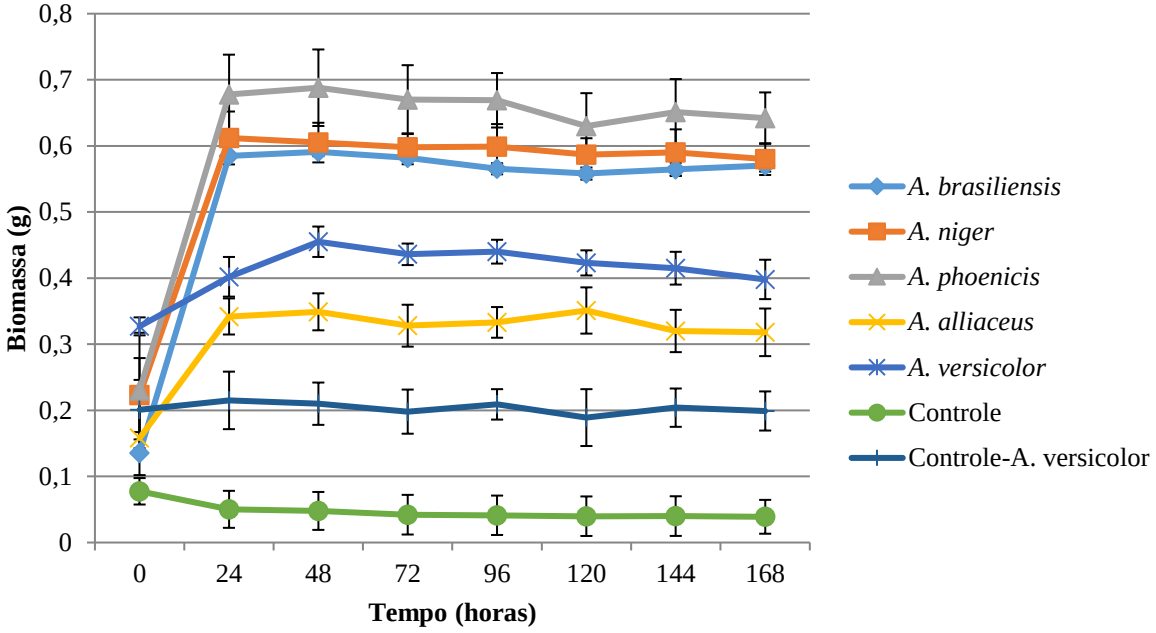


Figura 20: Curvas de crescimento de *Aspergillus* em meio pré-fermentativo

As espécies do gênero *Cunninghamella* iniciaram a fase estacionária após 48 horas (**Figura 21**), assim como *C. lunata*, *B. bassiana* e *M. rouxii* (**Figura 22**).

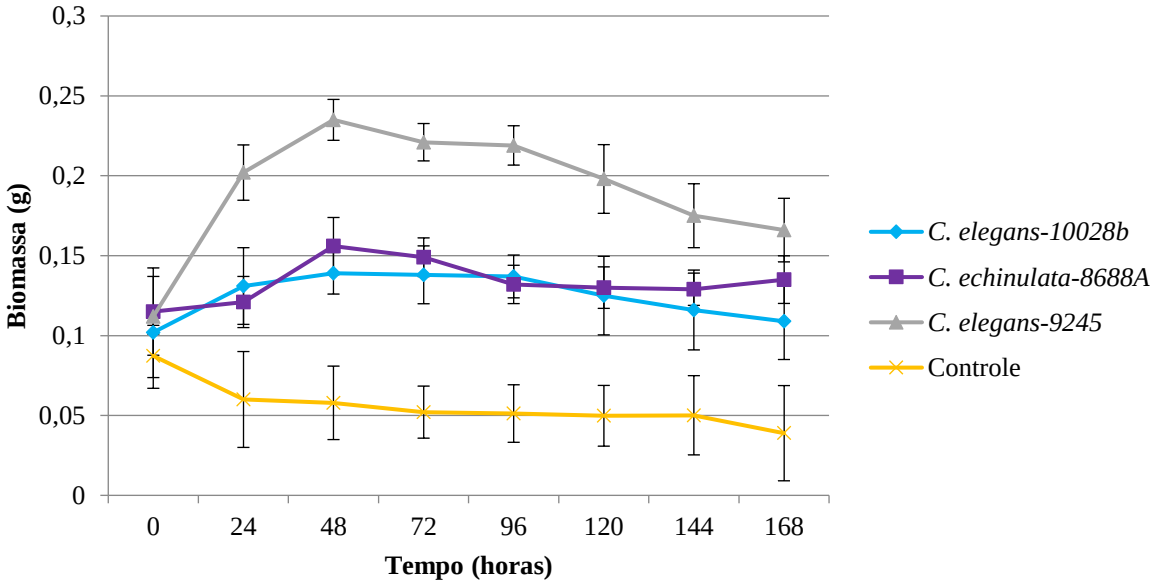


Figura 21: Curvas de crescimento de *Cunninghamella* em meio pré-fermentativo

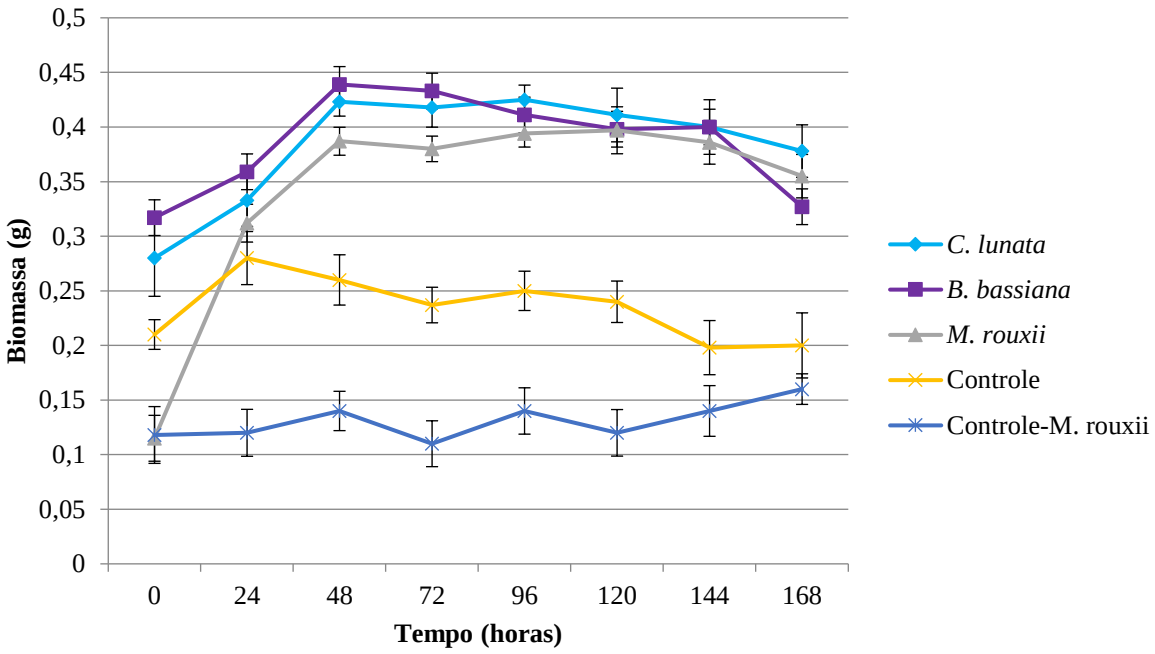


Figura 22: Curvas de crescimento de *C. lunata*, *B. bassiana* e *M. rouxii* em meio pré-fermentativo

4.2.3 Produção de biomassa dos fungos filamentosos em meio fermentativo

O cultivo dos fungos em meio pobre em nutrientes pode levar a um estresse metabólico na cultura, ocasionando a ativação de enzimas utilizadas na biossíntese dos metabólitos secundários (Gaden Jr *et al*., 2000; Elias *et al*., 2006). Devido a esse fato, optou-se por utilizar dois meios de cultura para avaliação e seleção do mais apropriado para as biotransformações.

Os resultados da curva de crescimento dos fungos *A. brasiliensis* e *C. elegans* 10028b nos meios fermentativos Koch´s K1 e Czapek estão apresentados nas **Figuras 23** a **26 .**

Analisando as curvas de crescimento observa-se que após transferência do meio pré-fermentativo para o meio Czapek, o fungo *A. brasiliensis* demora 24 horas para iniciar a fase estacionária (**Figura 23**), sendo necessário aguardar 24 horas para só então adicionar o substrato, considerando a estratégia da adição do substrato apenas após o término da fase exponencial de crescimento. Já no meio Koch´s K1 a adição do substrato pode ser feita no momento da transferência.

O fungo *C. elegans* no meio fermentativo Czapek inicia a fase estacionária no tempo de 48 horas e no meio Koch´s K1 se mantém na fase estacionária desde o momento da transferência a partir do meio pré-fermentativo (**Figura 25**).

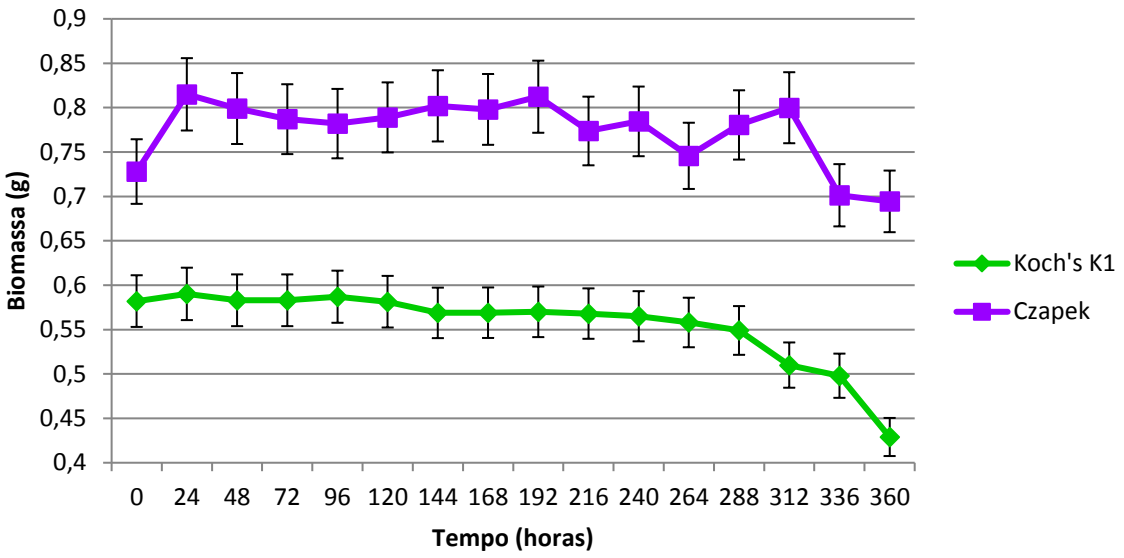


Figura 23: Curvas de crescimento de *A. brasiliensis* em meios fermentativos

Considerando que para os dois fungos mencionados acima seria necessário aguardar mais tempo para adição do substrato se as culturas fossem desenvolvidas no meio Czapek, o meio Koch's K1 foi selecionado para o desenvolvimento das culturas de outros fungos visando a obtenção de dados para construção das curvas de crescimento por um período de 10 dias.

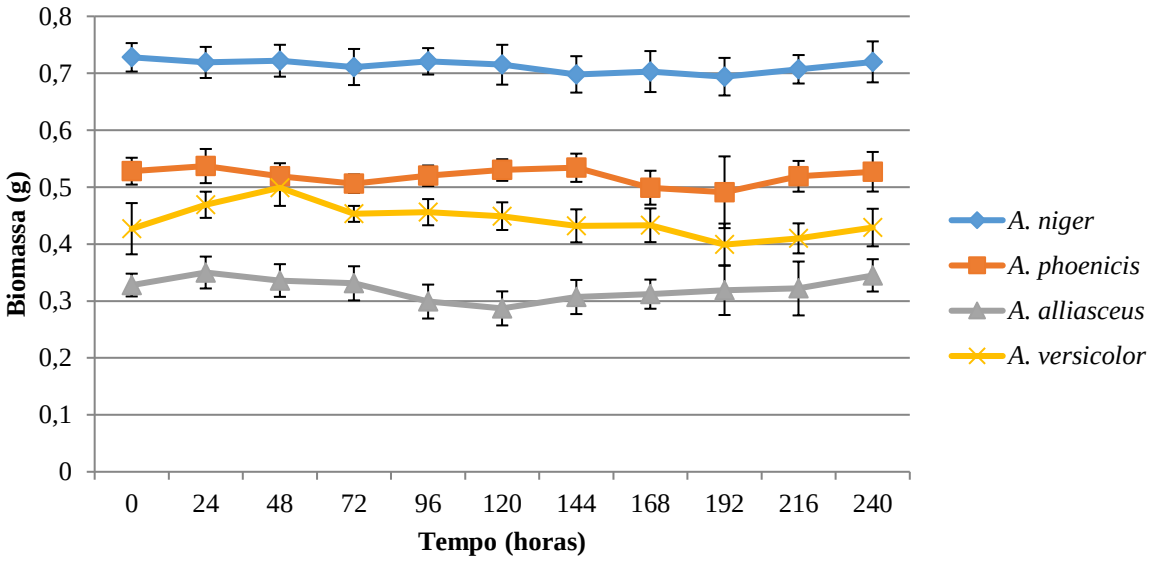


Figura 24: Curvas de crescimento do gênero *Aspergillus* no meio fermentativo (Koch´s K1)

Assim como no meio pré-fermentativo, as espécies de *Aspergillus* apresentaram entre si curvas de crescimento similares, com exceção do *A. versicolor* que entra na fase estacionaria após 48 horas. Os demais entram na fase estacionária no início da transferência para o meio Koch's K1 (**Figura 24**).

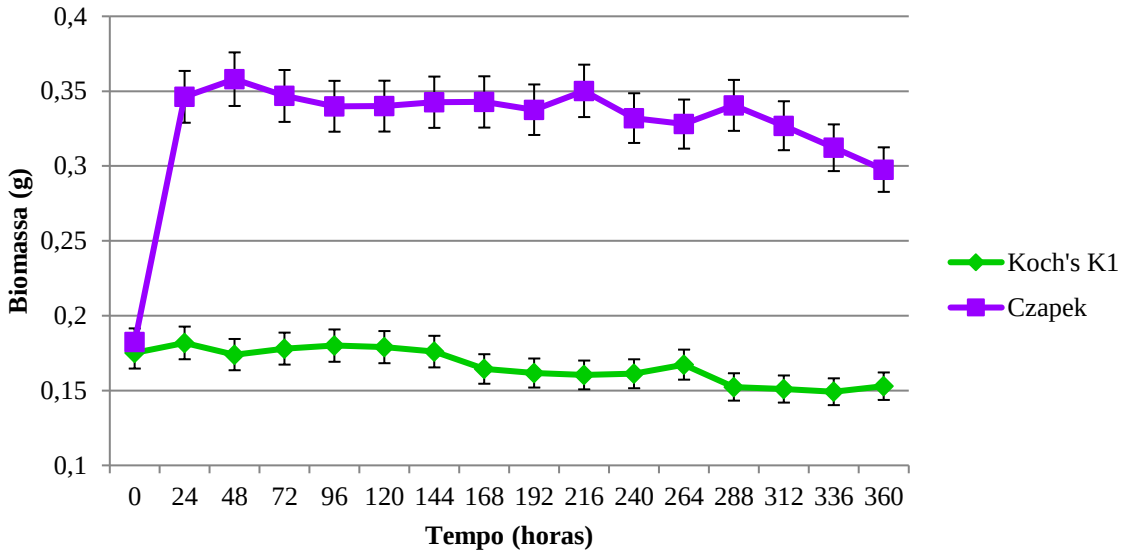


Figura 25: Curvas de crescimento de *C. elegans* em meios fermentativos

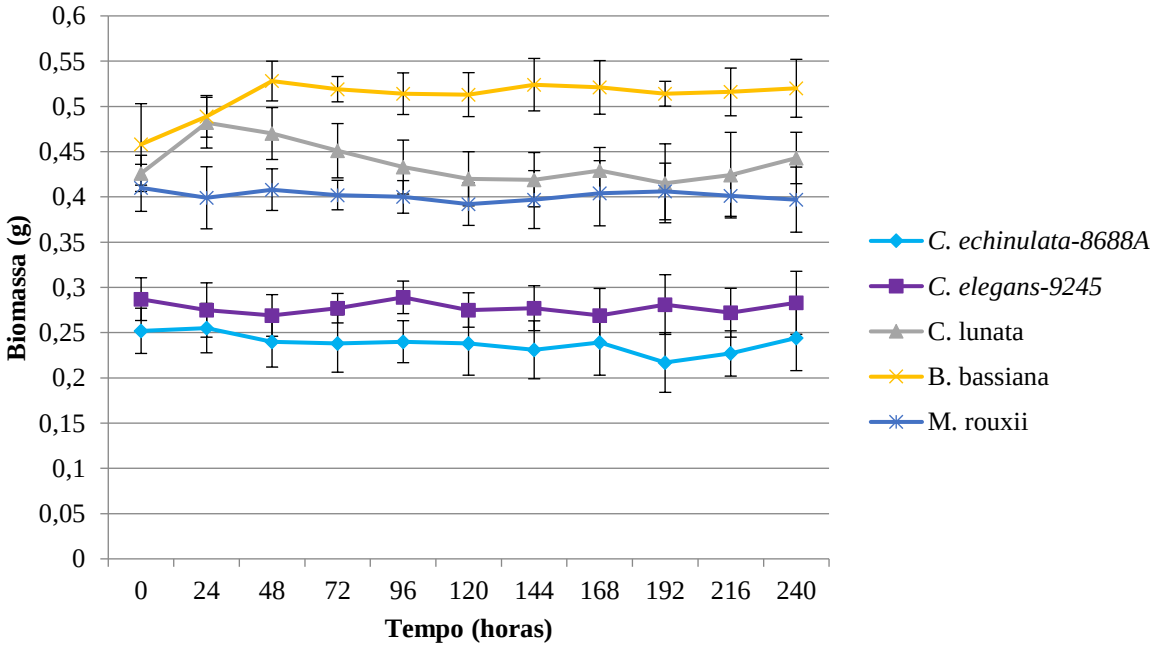


Figura 26: Curvas de crescimento de fungos filamentosos no meio fermentativo (Koch´s K1)

As linhagens de *Cunninghamella* iniciam a fase estacionária no início da transferência para o meio Koch's K1 (**Figura 26**), *B. bassiana* e *A. versicolor* após 48 horas.

4.2.4 Padronização da absorbância do inóculo das bactérias do trato gastrointestinal

Na padronização do inóculo das bactérias foram relacionados os valores de absorbância da turvação da bactéria com o número de unidades formadoras de colônias presentes.

Foram medidas várias absorbâncias sendo determinadas aquelas em que o inóculo inicial fosse de aproximadamente 10^7 UFC/mL. A absorbância de 0,122 propicia a obtenção de 3,1 x 10^7 UFC/mL para *L. acidophilus*, A absorbância de 0,109 e 0,129 propicia a obtenção de 3,0 x 10^7 UFC/mL para *Bifidobacterium* sp e para a cultura mista respectivamente. A absorbância de 0,109 para *E. coli* em anaerobiose ou aerobiose apresentou aproximadamente 1,9 x 10^7UFC/mL.

4.2.5 Curvas de crescimento das bactérias do trato gastrointestinal

Analisando as curvas de crescimento das bactérias (**Figura 27**) observou-se que as bactérias *L. acidophilus* e *E. coli* nos meios de cultura e condições avaliadas iniciaram a fase estacionária com 12 horas de incubação no meio líquido, porém permanecem em tempos diferentes nessa fase, sendo de 24 horas e de menos de 3 horas, respectivamente. A cultura mista atinge a fase estacionária com 18 horas permanecendo nesta por 30 horas e *Bifidobacterium* sp atinge com 36 horas, após o início do cultivo, permanecendo na fase estacionária por 24 horas.

Os resultados das curvas de crescimento demonstram que as culturas de bactérias do trato gastrointestinal em mistura possuem perfis de crescimentos diferentes.

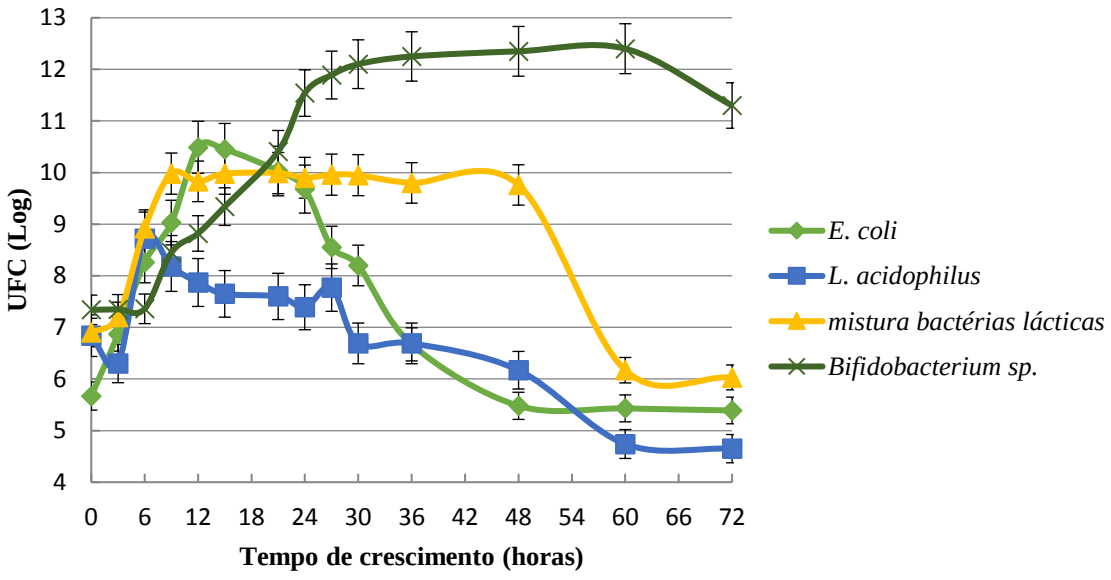


Figura 27: Curvas de crescimento das bactérias do trato gastrointestinal

4.3 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A determinação dos valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CBM) dos substratos β-cariofileno e ácido 3β-acetoxi-copálico foram realizadas nas condições dos processos de biotransformação, com o intuito de verificar se nessas condições ocorreriam inibições dos micro-organismos avaliados pelos substratos pertencentes as classes dos terpenos utilizados, pois concentrações tóxicas podem propiciar a inibição dos micro-organismos e com isso impedir a produção de enzimas (Hahn *et al.*, 2013).

As concentrações inibitórias mínimas para o β-cariofileno frente aos fungos filamentosos foram todas superiores a 400µg/mL.

Os resultados obtidos de concentração inibitória mínima frente aos micro-organismos testados variaram de 200 a > 400µg/mL (**Tabela 10**).

Tabela 10: Valores de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do ácido 3β-acetóxi-copálico e β-cariofileno

Micro-organismos	β-cariofileno (μg/mL)		Ácido 3β-acetoxi-copálico (μg/mL)		Antibiótico Padrão (μg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
A. brasiliensis	> 400	> 400	**400**	> 400	Mico > 5,9	> 5,9
C. elegans-10028b	> 400	> 400	**200**	**400**	Mico 2,95	> 5,9
C. echinulata-8688A	> 400	> 400	**400**	> 400	Mico 2,95	> 5,9
C. elegans-9245	> 400	> 400	> 400	> 400	Mico > 5,9	> 5,9
A. niger	> 400	> 400	**400**	> 400	Mico > 5,9	> 5,9
A. phoenicis	> 400	> 400	> 400	> 400	Mico > 5,9	> 5,9
A. alliaceus	> 400	> 400	> 400	> 400	Mico > 5,9	> 5,9
M. rouxii	> 400	> 400	> 400	> 400	Mico 5,9	> 5,9
Bifidobacterium sp	> 400	> 400	> 400	> 400	Pn 0,3687	0,3687
L. acidophilus	> 400	> 400	> 400	> 400	Pn 0,3687	0,3687
L. acidophilus-53544	**400**	> 400	> 400	> 400	Pn 0,1843	0,1843
E. coli anaerobiose	> 400	> 400	> 400	> 400	Strept > 5,9	>5,9
E. coli aerobiose	> 400	> 400	> 400	> 400	Strept > 5,9	> 5,9
Mistura	> 400	> 400	> 400	> 400	Pn 0,3687	0,3687
B. longum	**200**	> 400	**400**	> 400	Pn 0,3687	0,7375
L. johnsonii	**400**	> 400	**400**	> 400	Pn 0,0921	0,3687

Legenda: CIM= Concentração Inibitória Mínima, CBM= Concentração Bactericida Mínima, Mico = Miconazol, Pn= Penicilina, Strept= Streptomicina

O ácido 3β-acetoxi-copálico apresentou atividade inibitória frente aos fungos *A. brasiliensis*, *C. echinulata* 8688A e *A. niger* no valor de 400μg/mL e para o fungo *C. elegans*-10028b em 200μg/mL, sendo todos com ação fungistática.

Para as bactérias lácticas testadas o sesquiterpeno apresentou atividade frente a *L. acidophilus* e *L. johnsonii* no valor de 400µg/mL e de 200µg/mL para *B. longum* apresentando para todas as bactérias avaliadas ação bacteriostática.

Os resultados obtidos de CIMs foram considerados adequados, pois o intuito proposto foi o de não inibir os micro-organismos na concentração de 100 µg/mL (para o ácido 3β-acetoxi-copálico) e de 500µg/mL (para o β-cariofileno) a qual é a concentração máxima utilizada nas biotransformações.

4.4 Avaliação dos processos de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico e elucidação dos metabólitos obtidos

O monitoramento dos perfis químicos visando a avaliação da influência do tempo de incubação nas reações de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico foram realizados inicialmente por 15 dias a cada 24 horas após a adição do substrato para os fungos *A. brasiliensis* e *C. elegans* 10028b, posterior as análises dos resultados obtidos o tempo de monitoramento para os demais fungos filamentosos foram alterados para 10 dias devido a não alteração dos perfis após o 10° dia.

4.4.1 Biotransformação pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*

Nas análises dos cromatogramas dos extratos obtidos dos caldos das culturas foi observado que o ácido 3β-acetoxi-copálico foi consumido quase por completo pelo fungo *A. brasiliensis* 24 horas após adição do mesmo na cultura. Nas análises dos micélios foi detectado o substrato, porém no mesmo período, nenhum metabólito produzido pelo fungo foi detectado nos extratos obtidos dos caldos de cultura e dos micélios.

No segundo dia observa-se no cromatograma a presença de possíveis metabólitos nos tempos de retenção de 14,0 (**1**), 23,0 (**2**), 23,4 (**3**) e 24,8 minutos (**4**), e mais um metabólito com

t_R de 25,3 (**5**) minutos foi detectado em 72 horas e observou-se também o aumento na concentração dos possíveis metabólitos descritos anteriormente. No quarto dia mais um pico foi detectado com t_R de11,8 minutos (**6**) e no oitavo dia foi detectado o pico em 16,52 minutos (**7**).

No último dia de monitoramento (15° dia) observou-se que todos os metabólitos detectados no cromatograma estavam presentes no extrato do caldo da cultura, porém apresentavam-se em concentrações inferiores as detectadas no 9° dia. No extrato do micélio nenhum produto de biotransformação foi detectado e foi observada alta concentração do substrato.

Analisando os cromatogramas dos 15 dias foi possível observar que a substância **2** está mais concentrada no 3° dia, **3** e **4** estão em maior concentração no 7° dia e as substâncias **1**, **5**, **6** e **7** no 9° dia.

No 9° dia estão presentes todos os compostos de biotransformação detectados, diferentes dos picos apresentados no cromatograma do controle, sendo 2 substâncias majoritárias detectadas em maiores concentrações neste dia (**Figura 28**). Portanto o 9° dia foi o tempo escolhido para o aumento de escala por ter propiciado a obtenção de um número maior de metabólitos e em suas maiores concentrações.

Nas análises das biotransformações com *A. brasiliensis* foi utilizada a coluna C_{18} Sun fire Waters® para obtenção dos cromatogramas da **Figura 28**.

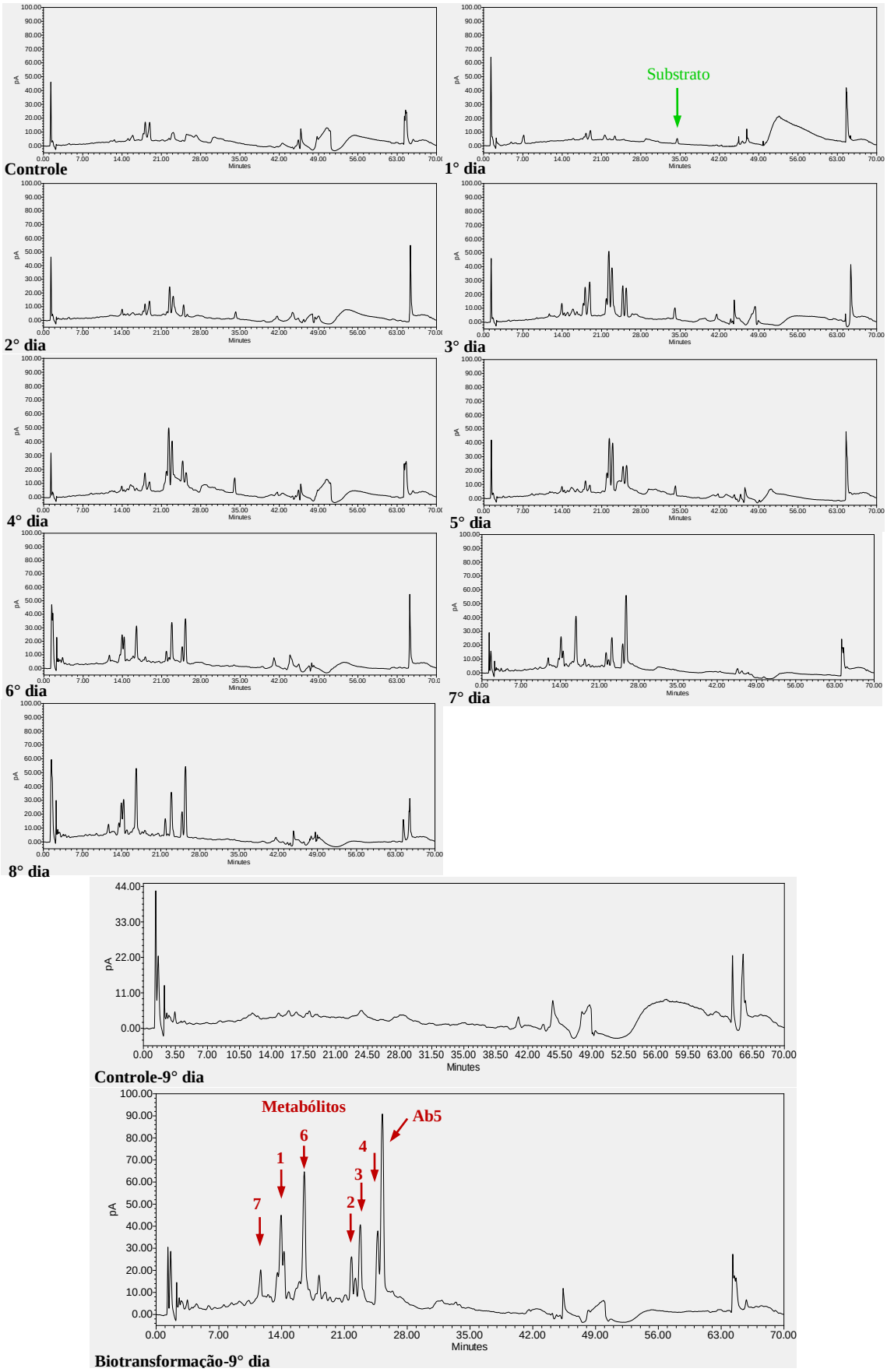
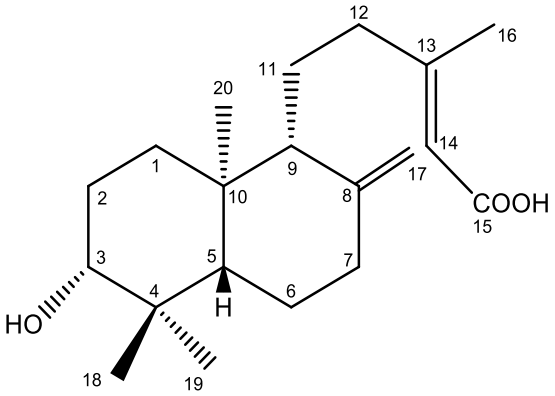


Figura 28: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *A. brasiliensis* do 1° ao 9° dia obtidos por HPLC-CAD.

Para facilitar o isolamento foi realizado o fracionamento do extrato bruto utilizando SPE e as frações selecionadas para o isolamento da substância **Ab5** foram as obtidas com 60%, 70% e 80% de acetonitrila.

O produto **Ab5** com tempo de retenção de 25,3 minutos isolado utilizando o cromatógrafo Waters® no modo semi-preparativo acoplado ao detector CORONA foi submetido às análises de RMN (**Apêndices 6** a **10**) e espectrometria de massas (**Apêndices 11**). Os dados de RMN de ^{13}C desse derivado, com as comparações da literatura estão apresentados na **Tabela 11**.

Analisando os dados de RMN da substância **Ab5** foi possível identificá-la como sendo o ácido 3β-hidroxi-copálico (**Figura 29**). Análises comparativas entre os deslocamentos químicos obtidos com aqueles apresentados na literatura (Braun *et al*., 1977) possibilitaram a confirmação da estrutura química proposta, a qual também foi confirmada com a análise de massas de alta resolução.



Fórmula Molecular: $C_{20}H_{32}O_3$
***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 343,2249 (Apêndice **11**)
***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 343,2249
Tempo de retenção (HPLC-CAD): 25,7 min.
Nome químico: ácido *ent*-3β-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Figura 29: Estrutura química do derivado **Ab5** obtido pela biotransformação do ácido 3β- acetoxi-copálico pelo fungo *A. brasiliensis*

Tabela 11: Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz), HMQC e HMBC obtidos em $CDCl_3$ referentes à substância **Ab5** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	*δ* ^{13}C Segundo, Braun *et al*., 1977	HMBC
1		37,0	37,1	
2		27,9	27,8	
3	3,25 *dd* (11,7;4,2) 1H	78,8	78,9	15,4; 28.3; 39,1
4	-	39,1	39,2	
5	1,09 *m* 1H	54,5	54,7	
6		24,0	24,0	
7		38,1	38,2	
8	-	147,6	147,7	
9	1,54 *s* 1H	55,8	56,0	
10	-	39,4	39,5	
11		21,6	21,7	
12	1,99 *m*; 2,39 *m*	39,9	40,0	21,6
13	-	163,8	163,7	
14	5,67 *s* 1H	114,4	114,9	39,9; 170,2
15	-	170,2	171,4	
16	2,17 *s* 3H	19,2	19,2	39,9; 114,4; 163,8; 170,2
17	a) 4,51 *s-l* 1H; b) 4,87 *s-l* 1H	106,8	106,9	38,1; 147,6; 55,8
18	1,0 *s* 3H	28,3	28,3	15,4; 39,1; 54,5; 78,8
19	0,78 *s* 3H	15,4	15,4	28,3; 39,1; 54,5; 78,8
20	0,69 *s* 3H	14,5	14,6	37,9; 39,4; 55,8

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndice 6**) da substância **Ab5** muitos sinais na região entre δ_H 0,5 e δ_H 2,5, característicos dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos presentes na grande maioria dos diterpenos. Também podem ser observados sinais dos hidrogênios olefínicos, característicos dos compostos com esqueleto labdano em δ_H 4,51 (H-17a), 4,87 (H-17b) e 5,67 (H-14); um duplo dupleto em δ_H 3,25 (J= 11,7 e 4,2 Hz), integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC (**Apêndice 9**) aparece ligado ao carbono em δ_C 78,8 o que sugere a presença de um grupo hidroxílico. A estereoquímica do grupo hidroxílico foi atribuída considerando o valor da constante de acoplamento.

Não foi observado o sinal do H-22 do ácido 3β-acetoxi-copálico em δ_H 2,06, sendo um indício de modificação nessa parte da molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 7**) observou-se 20 sinais, que foram caracterizados também com o auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° (**Apêndice 8**) como sendo: quatro metílicos, sete metilênicos, quatro metínicos e cinco quaternários. Não foram observados os sinais em δ_C 171,0 e 21,3 dos C-21 e C-22, respectivamente, do grupo acetoxi presente no ácido 3β-acetoxi-copálico no espectro de RMN de ^{13}C da substância **Ab5**, inferindo assim a perda do grupo acetoxi.

A fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_3$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo negativo (*m/z* 319, 2267 $[M-H]^-$), correspondente a molécula desprotonada.

Hirschmann *et al*., (2004) realizaram estudos de biotransformação de solidagenona com o fungo *A. brasiliensis* e obtiveram metabólitos em que o fungo hidroxilou o substrato na posição 3 sugerindo que o *Aspergillus brasiliensis* é capaz de hidroxilar diterpenos do tipo labdano nas posições 3 e 19. No presente trabalho o fungo *A. brasiliensis* propiciou a ocorrência de desacetilação na posição 3, o qual converteu o ácido 3β-acetoxi-copálico em ácido 3β-hidroxi-copálico após 9 dias de incubação com rendimento molar de 4,3%.

4.4.2 Biotransformação pelo fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b

Fungos do gênero *Cunninghamella* assim como outros fungos filamentosos apresentam a capacidade de metabolizar diversos xenobióticos, sendo as transformações semelhantes ao sistema enzimático dos mamíferos (Asha & Vidyavathi, 2009). Diversos autores relatam que esta espécie é amplamente utilizada como modelo para estudo do metabolismo hepático em mamíferos (Asha & Vidyavathi, 2009, Barth *et al*., 2012), justificando assim o uso nos processos avaliados.

Barth e colaboradores (2012) utilizou a linhagem *C. elegans* ATCC 10028b para biotransformar o medicamento Donepezil, usado no tratamento de mal de Alzheimer, demonstrando a enantiosseletividade com o metabólito predominante produzido que não foi relatado até o momento em modelos de biotransformação, os autores afirmam também que a linhagem em questão correlaciona-se com o metabolismo de mamíferos e pode ser utilizado como uma alternativa na produção de metabolitos para estudos toxicológicos e farmacológicos, demonstrando novamente a importância da utilização desse gênero nos processo empregados.

Embora esse fungo seja descrito como uma importante ferramenta nos processos de biotransformação, o mesmo produziu diversos metabólitos a partir do diterpeno estudado com baixos rendimentos conforme descrito abaixo.

No processo de biotransformação com o diterpeno o fungo *C. elegans* em 48 horas consumiu todo o substrato adicionado na cultura. Em 24 horas foram observados dez novos compostos que provavelmente são produtos das reações de biotransformação nos tempos de retenção entre 14 a 21,5 minutos aproximadamente, sendo esses compostos mais polares que o ácido 3β-acetoxi-copálico. No segundo dia nova substância minoritária foi detectada no t_R de 14 minutos (**8**) e os demais produtos apresentaram-se em maior concentração. No 6° dia um novo composto foi detectado com t_R de 28,5 (**14**) minutos e este foi o dia escolhido para o aumento de escala. Nas análises dos micélios do 6° dia não foram detectados o substrato e produtos de biotransformação, mas no 7° dia foi detectada a substância 14 nos micélios, podendo assim inferir que a substância foi interiorizada pelo fungo.

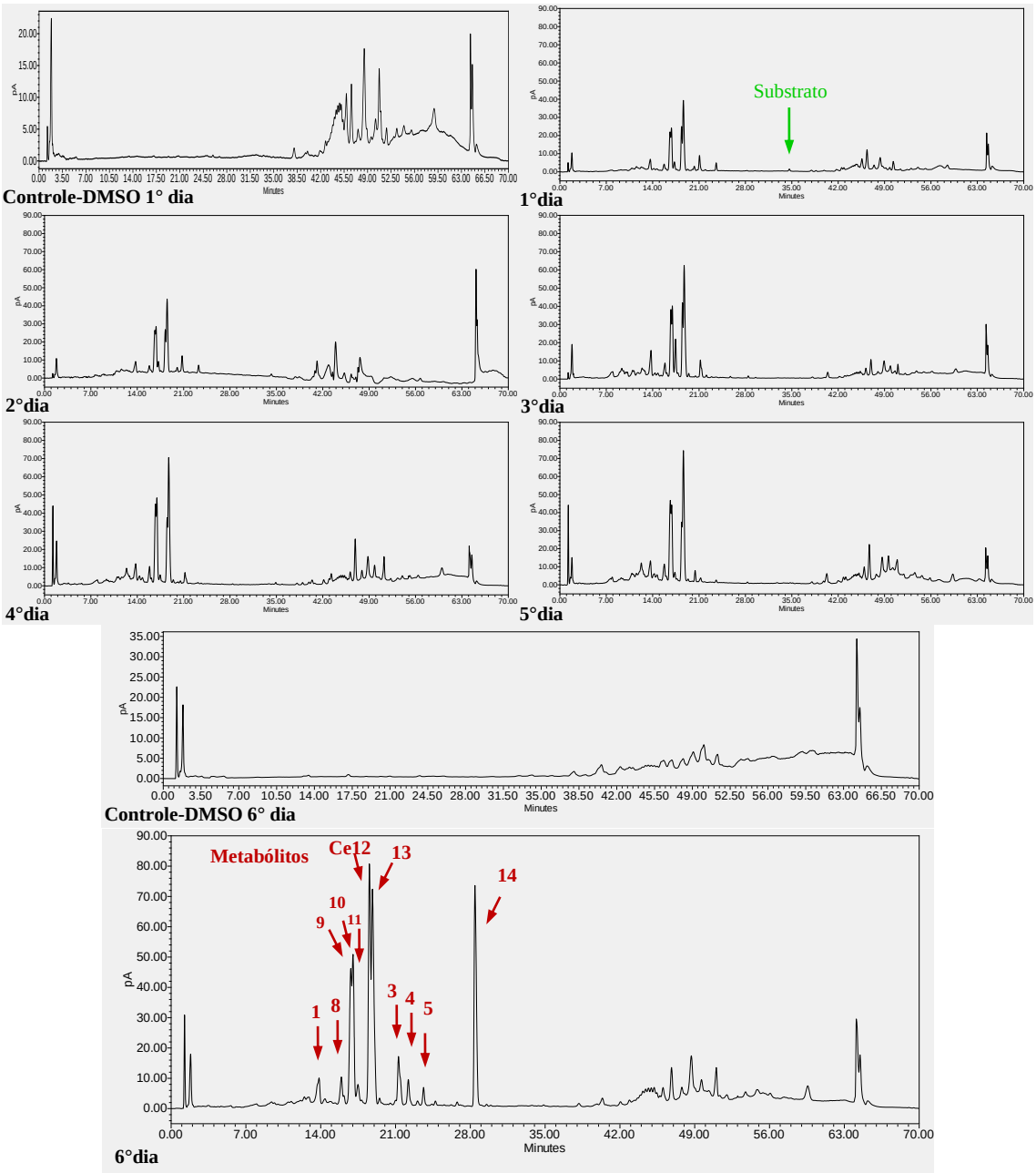
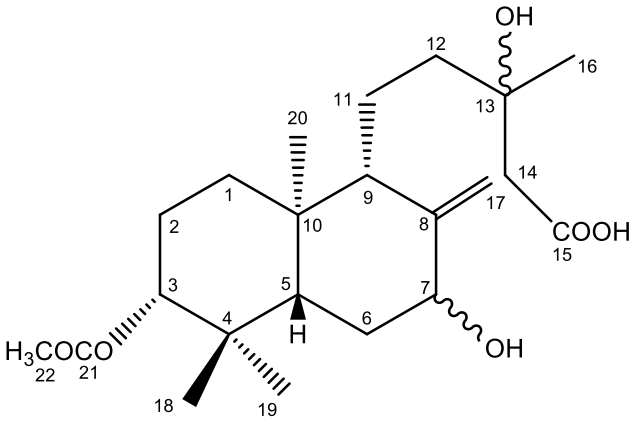


Figura 30: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *C. elegans* do 1° ao 6° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa SunFire (Waters®).

No 15° dia a maioria dos produtos de biotransformação foi detectada em menor concentração, exceto as substâncias **4, 5 e 14** que não foram detectadas nos tempos de retenção anteriormente observados.

Para a realização do isolamento das substâncias majoritárias foram utilizadas as frações obtidas da SPE com 50 e 60% de acetonitrila para o isolamento das substâncias **9** e **10** e de 60 e 70% de acetonitrila para o isolamento das substâncias **Ce12** e **13**.

Foi possível obter apenas a substância **Ce12** isolada em quantidade suficiente para análises de RMN. Os dados espectroscópios estão apresentados na **Tabela 12.**



Fórmula Molecular: $C_{22}H_{36}O_6$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 419,2396 (Apêndice **17**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 419,2410

Tempo de retenção (HPLC-CAD):18,4 min.

Nome químico: ácido *ent*-3β-acetoxi,7,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico)

Figura 31: Estrutura química do derivado **Ce12** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *C. elegans* 10028b

Tabela 12: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Ce12** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1	1,84 *m*; 1,31 *m*	37,8	
2		25,4	
3	4,52 *dd* (11,2;5,0) 1H	82,5	172,8; 38,7; 28,5; 16,8
4	-	38,7	
5	1,71 *m*	48,3	
6	1,83 *m*	31,7	40,6;48,3;74,6
7	4,30 *t* 1H	74,6	48,3;52,4;110,5
8	-	150,5	
9	2,09 *m*	52,4	18,7;110,5;150,5
10	-	40,6	
11	1,64 *m*; 1,42 *m*	18,7	

Tabela 10. Continuação

Posição	δ ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	δ ^{13}C/HMQC	HMBC
12	1,79 *m*; 1,30 *m*	41,5	18,7
13	-	72,5	
14	2,43 *s-l* 2H	46,6	72,5
15	-	174,8	
16	1,26 *s* 3H	27,3	41,5;72,5
17	4,74 *s* 1H; 5,05 *s* 1H	110,5	52,4;74,6;150,5
18	0,87 *s* 6H	28,5	16,8;48,3;82,5;38,7
19	0,87 *s* 6H	16,8	28,5;48,3;82,5;38,7
20	0,73 *s* 3H	14,0	40,6; 48,3;37,8;52,4
21	-	172,8	
22	2,03 *s* 3H	21,1	172,8

Analisando o espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndice 12**) da substância **Ce12** verifica-se sinais na região δ_H 0,7 a δ_H 2,1, indicando a presença de uma grande quantidade de hidrogênios metilênicos e metínicos. Pode-se observar sinal do hidrogênio olefínico, característico das substâncias com esqueleto labdano em δ_H 4,74 (H-17a) e δ_H 5,05 (H-17b). um duplo dupleto em δ_H 4,52 (J= 11,2 e 5,0 Hz), integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC (**Apêndice 15**) aparece ligado ao carbono em δ_C 82,5. Pode-se verificar também a presença de três simpletos integrados para 3H em δ_H 0,73, 1,26 e 2,03 atribuídos aos hidrogênios das metilas C_{20}, C_{16} e C_{22} e um simpleto integrado para 6H atribuídos aos hidrogênios das metilas C_{29} e C_{18}.

Diferentemente do espectro de RMN de ^{1}H do substrato (**A**) observou-se a presença de um sinal referente a hidrogênio carbinólico, sendo um tripleto em δ_H 4,30 integrado para 1H e um simpleto em δ_H 2,43 integrado para 2H inferindo a perda da ligação dupla nas posições H_{13} e H_{14}.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 13**) da substância **Ce12** observa-se 22 sinais, podendo-se destacar a presença de três carbonos carbinólicos em δ_C 82,5, δ_C 74,6 e

δ_C 72,5, dois sinais de carbonos carbonílicos em δ_C 174,8 e δ_C 172,8 que foram atribuídos e confirmados com as análises do mapa de contornos HMBC (**Apêndice 16**), respectivamente aos carbonos C_{15} e C_{21}, os carbonos olefínicos em δ_C 110,5 e δ_C 150,5 atribuídos respectivamente aos carbonos C_{17} e C_8.

A fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_6$ do metabólito **Ce12** (**Figura 31**) foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 419, 2396 $[M+Na]^+$).

O fungo *C. elegans* ATCC 10028b converteu o ácido 3β-acetoxi-copálico em ácido *ent*-3β-acetoxi,7,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico, substância inédita na literatura, após 6 dias de biotransformação com rendimento molar de 3,09%.

Os outros metabólitos produzidos foram isolados a partir do aumento de escala da biotransformação de outras linhagens, sendo descritos posteriormente.

4.4.3 Biotransformação pelo fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e 9245

No processo de biotransformação com as linhagens de *C. echinulata* ATCC 8688A foram observados 6 metabólitos (**Figura 32**), sendo 4 desses com o mesmo tempo de retenção que os metabólitos apresentados no processo com *C. elegans* 10028b e com a linhagem ATCC 9245 foram detectados 10 produtos (**Figura 33**) dos quais 7 já haviam sido detectados anteriormente.

Entre os perfis dos fungos *C. echinulata* a linhagem ATCC 9245 foi a que forneceu o perfil mais complexo, pois os produtos minoritários **29**, **30**, e **31** não foram detectados nas demais espécies de *Cunninghamella*.

No cromatograma da **Figura 32** podemos observar que no primeiro dia o fungo havia consumido quase por completo o substrato utilizado e a substância majoritária produzida foi uma das majoritárias produzidas anteriormente pelo fungo *C. elegans* e codificada como

substância **10** com t_R de 20,3 minutos. Cabe ressaltar que a coluna analítica C_{18} de fase reserva Kromasil (Varian®) foi utilizada nas análises dos extratos obtidos dos processos realizados com *C. echinulata* por propiciar a obtenção de picos mais resolvidos nas análises.

Na segunda **Figura 33** podemos observar que o ácido 3β-acetoxi-copálico foi consumido completamente no primeiro dia de transformação e a substância majoritária produzida foi o metabólito **13**, demostrando que os mesmos metabólitos produzidos nas 3 linhagens fúngicas são produzidos em diferentes concentrações em cada processo.

O tempo escolhido para o aumento de escala com o fungo *C echinulata* ATCC 8688A foi o segundo dia, no qual as seis substâncias estavam presentes.

Foram obtidos 258,5mg de extrato bruto do aumento de escala no processo de biotransformação realizado com *C. echinulata* ATCC 8688A, o qual foi submetido a SPE para o isolamento da substância majoritária (**Ce9**). Utilizou-se para o isolamento as frações com 20, 30, 40, 50, 55 e 60% de acetonitrila obtidas.

Os dados de RMN da substância majoritária estão apresentados na **Tabela 13** e os espectros nos **Apêndices 18** a **22**

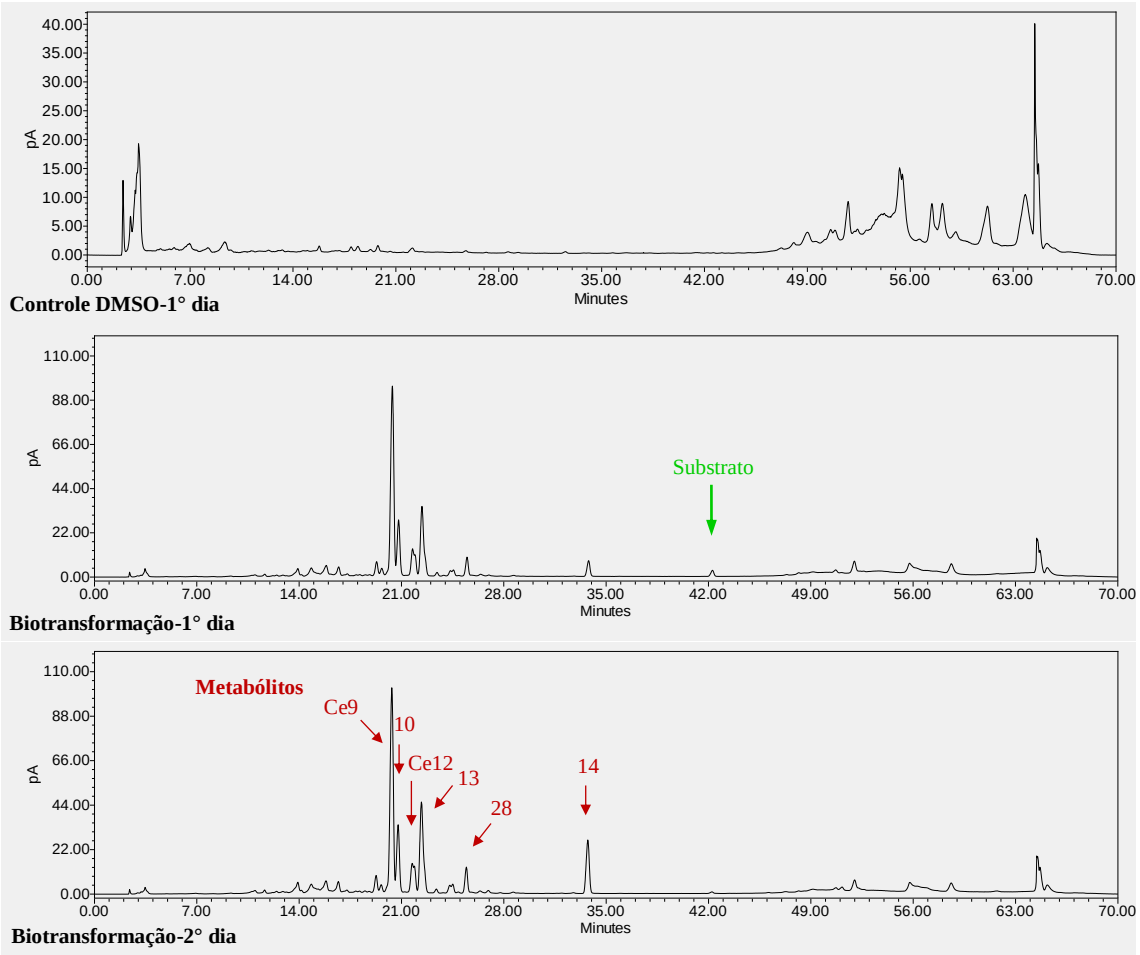


Figura 332: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *C. echinulata* ATCC 8688A do 1° ao 2° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)

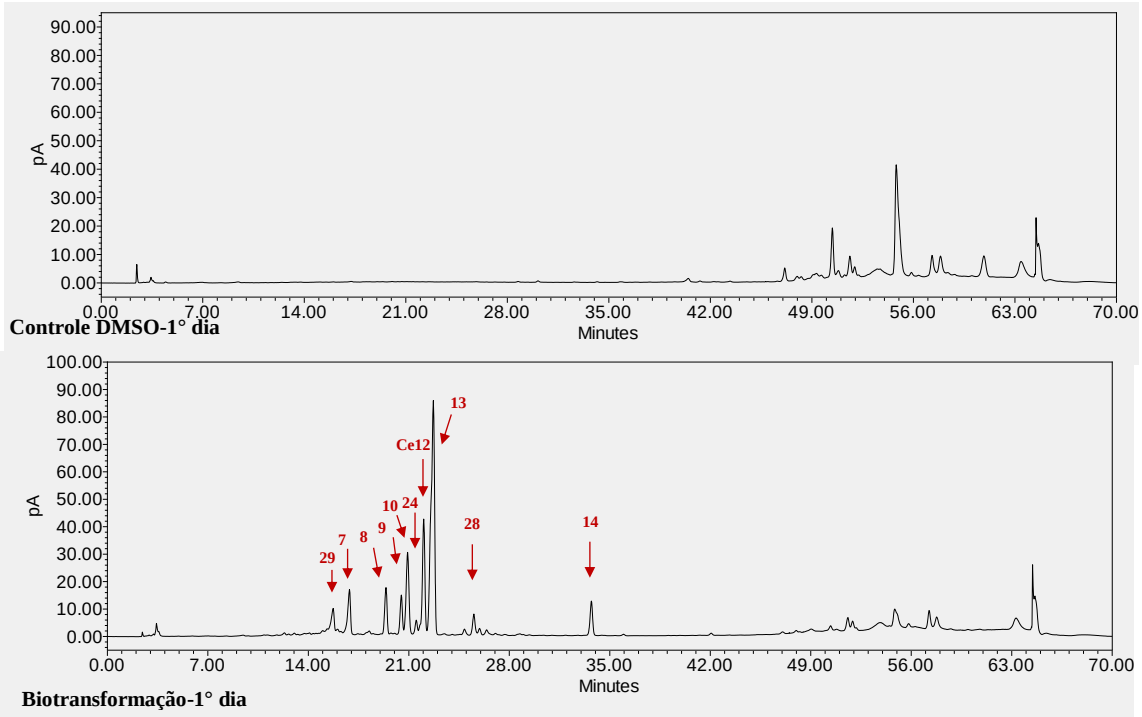
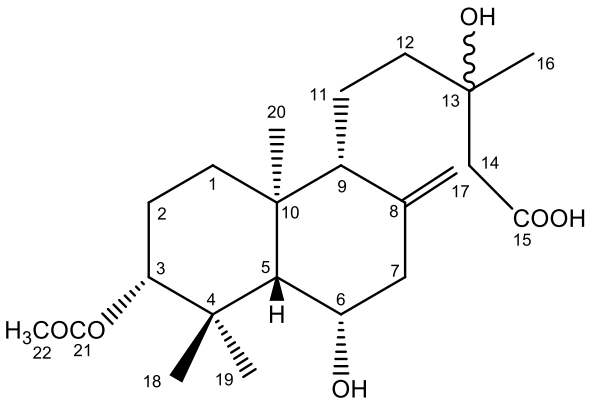


Figura 33: Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com *C. elegans* ATCC 9245, 1° dia, obtidos por HPLC-CAD.. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)



Fórmula Molecular: $C_{22}H_{36}O_6$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 419,2415(Apêndice **23**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 419,2410

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 20,3 min.

Nome químico: ácido *ent*-3β-acetoxi,6,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico

Figura 34: Estrutura química do derivado **Ce9** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *C. echinulata*

Tabela 13: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Ce9** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1	1,25 *m*; 1,79 *m*	38,0	
2	1,65 *m*	25,1	
3	4,48 *dd* (10,9; 5,5) 1H	82,6	17,1; 25,1; 39,5; 31,3; 173,0
4	-	39,5	
5	1,23 *m*	61,0	
6	3,81 *td* (10,8; 4,8) 1H	71,4	40,4;49,8;61,0
7	2,11 *t* (11,6) 1H; 2,62 *dd* (12,3; 4,7) 1H	49,8	71,4;109,0;147,0
8	-	147,0	
9	1,61 *m*	57,7	
10	-	40,4	
11		19,2	
12	1,30 *m*; 1,78 *m*	41,9	19,2; 72,5
13	-	72,5	
14	2,44 *s* 2H	46,4	72,5; 175,6
15	-	175,6	
16	1,27 *s* 3H	27,3	72,5
17	a) 4,68 *s* 1H; b) 4,90 1H	109,0	49,8; 57,7; 147,0
18	1,06 *s* 3H	17,1	31,3; 39,5; 82,6; 61,0
19	1,18 *s* 3H	31,3	17,1; 39,5; 61,1; 82,6;
20	0,76 *s* 3H	16,4	40,4; 57,7; 38,0
21	-	173,0	
22	2,05 *s* 3H	21,1	173,0

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndice18**) da substância **Ce9** sinais na região entre δ_H 0,7 e δ_H 2,5, característicos dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos presentes na grande maioria dos diterpenos. Foram observados sinais, assim como nos espectros do ácido 3β-acetoxi-copálico, dos hidrogênios olefínicos, característicos dos compostos com esqueleto labdano em δ_H 4,68 (H-17a) e 4,90 (H-17b), um duplo dupleto em δ_H 4,48 (j= 10,9 e 5,5Hz) integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC (**Apêndice21**) aparece ligado ao carbono em δ_C 82,6.

Destaca-se no espectro de RMN de ^{1}H um triplo dupleto em δ_H 3,81 (*J*= 10,8 e 4,8 Hz) integrado para 1 hidrogênio ligado ao carbono em δ_C 71,4, que devido ao deslocamento químico sugere a presença de grupo hodroxílico, o qual foi atribuído ao carbono C-6. Pode-se também ser observado um tripleto em δ_H 2,11 (*J*=11,6Hz) e um duplo dupleto em δ_H 2,62 (*J*=12,3 e 4,7 Hz), todos integrados para um hidrogênio cada, o qual aparece ligado ao carbono em δ_C 49,8, que foi atribuído ao carbono C-7, confirmando com as análisesdo mapa de contornos HMQC e HMBC (**Apêndice 22**).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice19**) observou-se 22 sinais, que foram caracterizados também com auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° como sendo: cinco metílicos, sete metilênicos, quatro metínicos e seis quaternários.

A fim de determinar a estereoquímica das hidroxilas presentes neste metabólito, utilizou-se experimentos de NOEdiff. Foi observado o efeito NOEdiff nos hidrogênios da metila H_{20} quando irradiado o H_6 (**Apêndice 24**) permitindo assim inferir que o grupamento hidroxila foi inserido na posição α.

A fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_6$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 419,2415 $[M+Na]^-$), correspondente a molécula sodiada.

A ampliação da escala realizada com a linhagem ATCC 9245 resultou em 213 mg de extrato bruto que foi submetido a SPE. Foram selecionadas para o isolamento as frações obtidas

com 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 e 80% de acetonitrila. Cada fração foi utilizada para o isolamento de diferentes substâncias, porém não foram possíveis análises de RMN dos metabólitos obtidos, devido ao baixo rendimento.

O fungo *C. echinulata* biotransformou o ácido 3β-acetoxi-copálico após 2 dias de incubação no ácido *ent*-3β-acetoxi,6,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico com rendimento molar de 9,41%.

As hidroxilações advindas dos processos de biotransformação são catalisadas por enzimas podendo apresentar regio ou enantiosseletividade. Essas reações são importantes em síntese orgânica e em algumas posições das substâncias como essa ocorrida no carbono 6 são bastante complexas de se obter. Esses processos são ferramentas extremamente úteis na síntese de substâncias enantiomericamente puras, destacando-se as aplicadas na área de química medicinal.

A importância do estudo de diferentes linhagens do gênero *Cunninghamella* se deve ao fato de que diversos autores relatam que os mesmos agem de forma similar ao metabolismo dos mamíferos (Lisowska *et al*., 2006, Asha & Vidyavathi, 2009, Barth *et al*., 2012) como podemos evidenciar nos estudos realizados por Paula e colaboradores (2015) que biotransformaram diazepam em apenas uma substância a nordiazepam, um metabólito ativo, resultados de estudos *in vivo* em humanos voluntários comprovam as observações *in vitro* (Acikgoz *et al*., 2009; Acikgoz *et al*., 2012; Andresen *et al*., 2013).

Os metabólitos advindos desses processos podem produzir compostos mais bioativos, promissores quanto as atividades biológicas ou também substâncias idênticas produzidas pela metabolização humana podendo assim testar os possíveis efeitos causados no mesmo.

4.4.4 Biotransformação pelo fungo *Aspergillus niger* VKMF 119

Analisando os cromatogramas pode-se observar que *A. niger* foi capaz de promover a biotransformação completa do diterpeno em oito dias do processo em 9 metabólitos, sendo quatro majoritários com t_R de 15,2 (**An15**), 17,8 (**An16**), 22,1 (**An17**), 27,4 (**An18**).

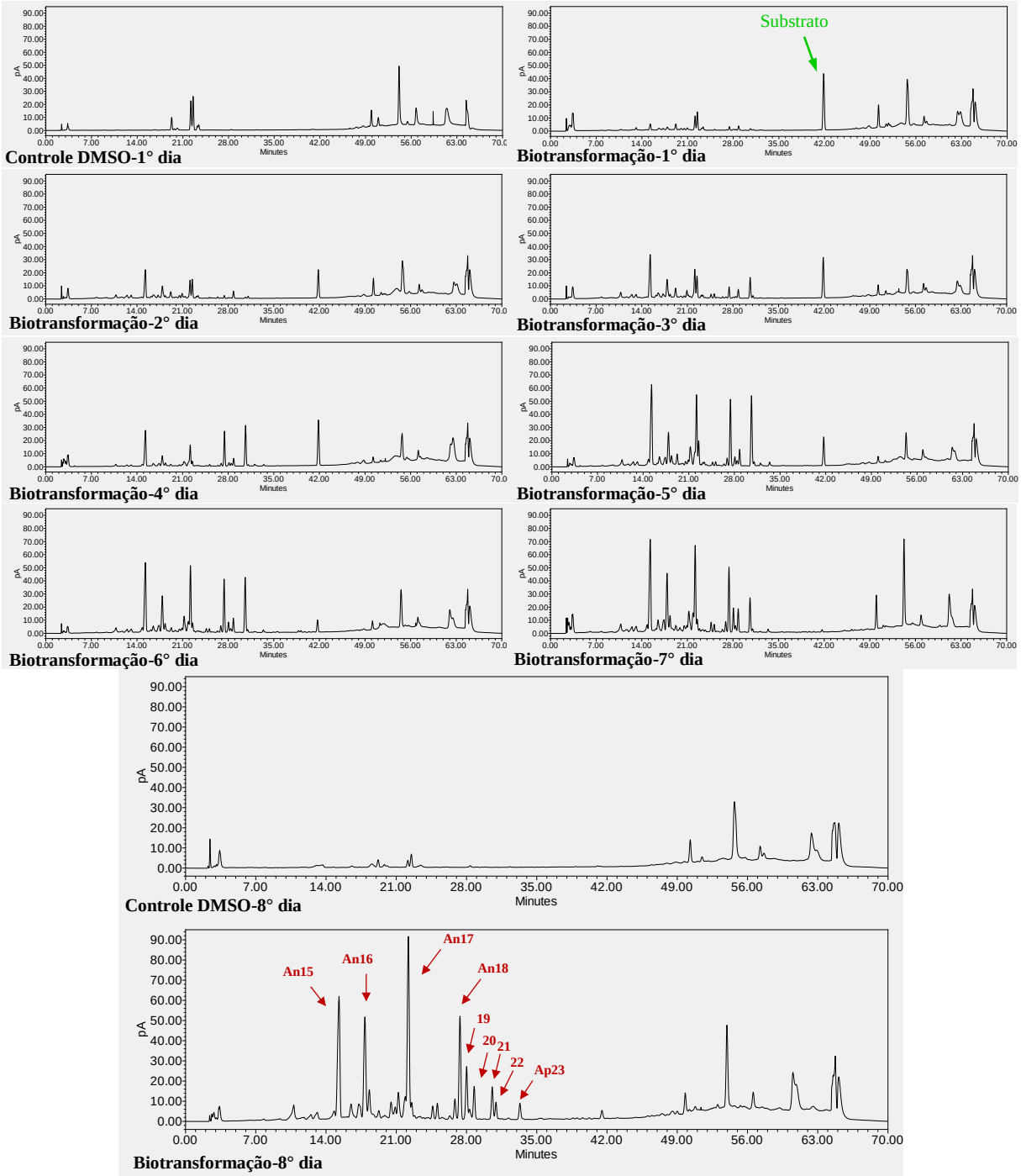
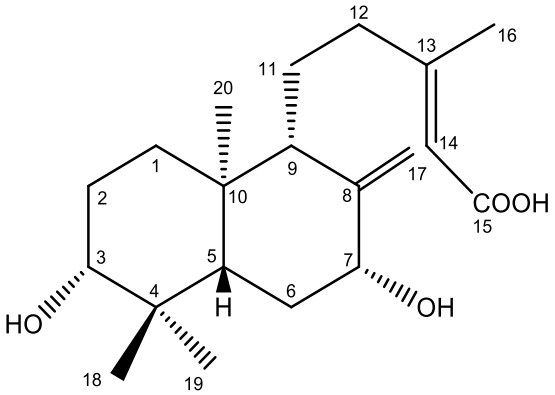


Figura 35: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *A. niger* do 1° ao 8° dia obtidos por HPLC-CAD.

Para ampliação da escala e isolamento dos metabólitos foi escolhido o oitavo dia que apresentou todos os metabólitos nas maiores concentrações (**Figura 35**).

No aumento de escala as concentrações de cada metabólito detectado foram alteradas, sendo a substância **An15** a majoritária. A mesma foi submetida às análises de RMN (**Apêndices 25** a **29**) e espectrometria de massas (**Apêndices 25** e **29**). Os dados de RMN de ^{13}C desse derivado, com as comparações da literatura estão apresentados na **Tabela 14**.

A proposta foi confirmada com análise de massas de alta resolução e também com análises comparativas entre os deslocamentos químicos obtidos com aqueles apresentados na literatura (Bohlmann *et al*., 1979) possibilitando a confirmação da estrutura química proposta (**Figura 36**).



Fórmula Molecular: $C_{20}H_{32}O_4$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 359,2210 (**Apêndice 30**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 359,2198

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 15,28 min.

Nome químico: ácido *ent*-3β,7α-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Figura 36: Estrutura química do derivado **An15** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *A. niger*

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (**Apêndice25**) da substância **An15** sinais característicos dos compostos com esqueleto labdano e do padrão (ácido 3β-acetoxi-copálico) em δ_H 4,70 (H-17a), 5,27 (H-17b) e 5,61 (H-14).

Diferentemente do padrão podemos observar um duplo dupleto em δ_H 3,88 (J= 11,1 e 5,3 Hz), outro duplo dupleto em δ_H 3,2 (J= 10,7 e 5,5 Hz) todos integrados para um hidrogênio, os quais no mapa de contornos HMQC aparecem ligados aos carbonos em δ_C 74,5 e 79,4 respectivamente, o que sugere a presença de grupos hidroxílicos.

Não foi observado também o sinal do H-22 do ácido 3β-acetoxi-copálico em δ_H 2,06, sendo um indício de modificação nessa parte da molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se 20 sinais (**Tabela 14**), que foram caracterizados também com auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° como sendo: quatro metílicos, seis metilênicos, cinco metínicos e cinco quaternários. Não foram observados os sinais em δ_C 171,0 e 21,3 dos C-21 e C-22, respectivamente, do grupo acetoxi presente no ácido 3β-acetoxi-copálico no espectro de RMN de ^{13}C da substância **An15**, inferindo assim a perda do grupo acetoxi.

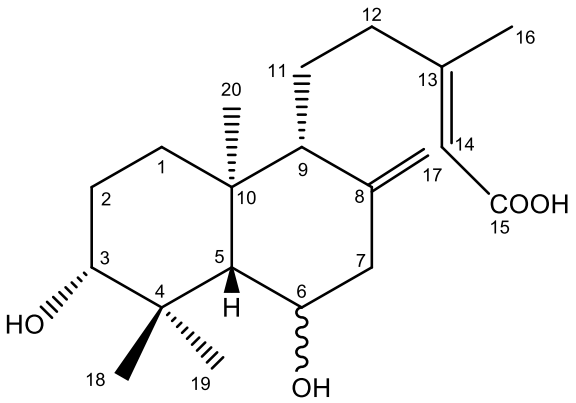
A fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 359,2210 $[M+Na]^+$).

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **An15** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1		38,1	
2		28,6	
3	3,20 *dd* (10,7; 5,5) 1H	79,4	16,1; 28,8; 40,0
4	-	40,0	
5		53,6	
6	1,34 *m*; 2,03*m*	34,4	
7	3,88 *dd* (11,1; 5,3) 1H	74,5	
8	-	151,2	
9	1,54 *m*	55,1	
10	-	40,1	
11	1,63 *m*; 1,69 *m*	22,6	
12	2,01 *m*; 2,30 *m*	40,3	8,9; 22,6; 55,1; 161,4
13	-	161,4	
14	5,61 *s-l* 1H	117,1	18,9; 170,5
15	-	170,54	
16	2,12 s 3H	18,9	3; 117,1; 161,4; 170,5
17	4,7 *s* 1H; 5,27 *s* 1H	104,2	55,1; 151,2
18	1,00 *s* 3H	28,8	16,1; 40,0; 53,6; 79,4
19	0,77 *s* 3H	16,1	53,6; 28,8; 40,0; 79,4
20	0,70 *s* 3H	15,0	38,1; 40,1; 53,6

O metabólito **An15** descrito já foi isolado das raízes de *Ayapana amygdalina* e identificado como ácido *ent*-3β,7α-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (Bohlmann *et al*., 1979). A estereoquímica do grupo hidroxílico ligado ao C_7 foi definida a partir dos valores das constantes de acoplamento comparando com a literatura. Alguns deslocamentos químicos de hidrogênio observados na literatura foram diferentes aos obtidos devido ao solvente utilizado nas análises de RMN serem diferentes. Foi utilizado metanol deuterado para obtenção dos espectros do metabólito **An15** e Bohlmann *et al*. (1979) utilizou benzeno deuterado, justificando assim a diferença de alguns deslocamentos químicos observados.

A estrutura química da substância **An16** produzida pelo fungo *A. niger*, após análise dos espectros de RMN (**Apêndices 31** a **35**), foi proposta conforme apresentado na **Figura 37**.



Fórmula Molecular: $C_{20}H_{32}O_4$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 359,2209(**Apêndice 36**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 359,2198

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 17,8 min.

Nome químico: ácido *ent*-3β,6-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Figura 37: Estrutura química do derivado **An16** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *A. niger*

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndices 31** a **35**) da substância **An16** sinais característicos do padrão em δ_H 4,74 (H-17a), 5,08 (H-17b) e 5,61 (H-14) (**Tabela 15**).

Diferentemente do substrato foi possível observar um duplo dupleto em δ_H 3,13 (J= 11,3 e 4,6 Hz), integrados para um hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC aparece ligado ao carbono em δ_C 79,9 e um simpleto largo em δ_H 4,39 ligado ao carbono em δ_C 69,8 o que sugere a presença de grupos hidroxílicos.

Tabela 15: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **An16** (*δ=ppm*)

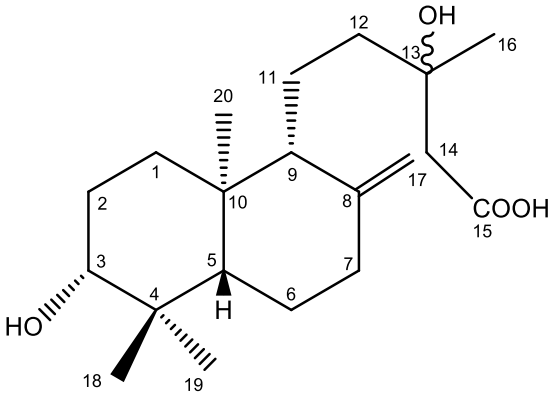
Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1	1,18 *m*;1,77 *m*	40,3	28,7
2		28,7	
3	3,13 *dd* (11,3; 4,6) 1H	79,9	17,4;28,4;40,9
4	-	40,9	
5	1,62 *s-l*	57,5	40,9;69,8
6	4,39 *s-l* 1H	69,8	
7	2,27 *m*; 2,35 *m*	48,5	69,8
8	-	145,3	
9	1,62 *s-l*	57,7	
10	-	41,4	
11		22,9	
12		40,5	
13	-	161,6	
14	5,61 *s-l* 1H	117,0	18,9
15	-	170,6	
16	2,12 *s* 3H	18,9	117,0;170,6
17	4,74 *s-l* 1H;5,08 *s-l* 1H	109,9	57,7;145,3
18	1,07 *s* 3H	28,4	17,4;40,9;57,5,79,9
19	1,14 *s* 3H	17,4	28,4;40,9;57,5,79,9
20	1,0 *s* 3H	17,3	57,7;40,3;41,4;57,5

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se 20 sinais (**Tabela 15**), que foram caracterizados também com auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° (**Apêndice 33**).

A fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 359,2209 $[M+Na]^+$), correspondente a molécula sodiada. O metabólito **An16** (ácido *ent*-3β,6-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico) produzido por *A. niger* não foi descrito na literatura até o momento.

A substância codificada como **An17** com t_R de 22,1 minutos também foi produzida pelos fungos *C. elegans* e *C. echinulata* e codificada anteriormente como substância **13**.

Analisando os espectros obtidos da substância **An17** (**Apêndices 37** a **41**) foi possível propor a estrutura química apresentada na figura abaixo.



Fórmula Molecular: $C_{20}H_{34}O_4$
***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 361,2330 (Apêndice **42**)
***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 361,2355
Tempo de retenção (HPLC-CAD): 22,1 min.
Nome químico: ácido *ent*-3β,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico

Figura 38: Estrutura química do derivado **An17** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *A. niger*

Os dados de RMN da substância **An17** estão apresentados na **Tabela 16**. No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 38**) observou-se 20 sinais, e o espectro de ^{13}C-DEPT 135° (**Apêndice 39**) confirmou o padrão de hidrogenação de cada carbono sendo, quatro metílicos, oito metilênicos, três metínicos e cinco quaternários, confirmados também pelos mapas de contorno HMQC e HMBC (**Apêndices 40** e **41**).

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 37**) da substância **An17** sinais dos hidrogênios olefínicos, característicos dos compostos com esqueleto labdano em δ_H 4,60 (H-17a), 4,83 (H-17b) e 2,44 (H-14); um duplo dupleto em δ_H 3,19 (J= 9,3 e 6,9 Hz), integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC (**Apêndice 40**) aparece ligado ao carbono em δ_C 79,6, o que sugere a presença de grupo hidroxílico.

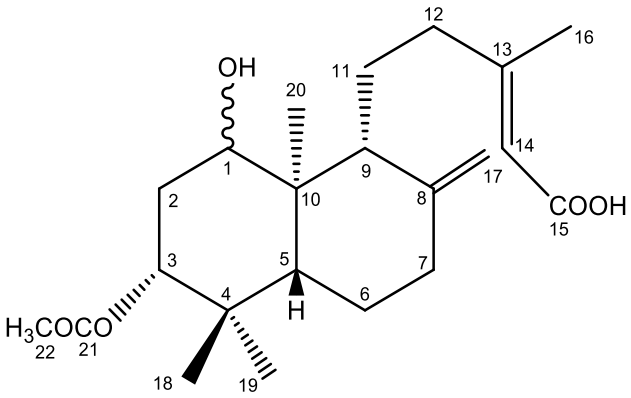
No espectro de RMN de ^{13}C dessa substância observou-se 20 sinais destacando-se o carbono carbonílico em δ_C 175,9 que foi atribuído ao carbono C-15, confirmando com as análises do mapa de contornos HMBC (**Apêndice 41**), os carbonos olefínicos em δ_H 149,9 e 107,5 atribuídos respectivamente aos carbonos C-8 e C-17. Um carbono quaternário com deslocamento químico em δ_C 72,5, o que sugere a presença de grupo hidroxílico.

Tabela 16: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **An17** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1		38,4	
2		28,7	
3	3,19 *dd* (9,3; 6,9) 1H	79,6	28,7; 40,2; 16,1; 28,9
4	-	40,2	
5		56,2	
6		25,3	
7		39,4	
8	-	149,4	
9		58,7	
10	-	40,7	
11	1,45 *m*; 1,62 *m*	19,1	
12	1,27 *m*; 1,78 *m*	42,0	
13	-	72,5	
14	2,44 *s-l* 2H	46,4	27,3; 42,0; 72,5; 175,9
15	-	175,9	
16	1,27 *s* 3H	27,3	42,0; 46,4; 72,5
17	4,60 *s-l* 1H; 4,83 *s-l* 1H	107,5	39,4; 58,7
18	0,98 *s* 3H	28,9	16,1; 40,2; 56,2; 79,6
19	0,77 *s* 3H	16,1	79,6; 56,2; 48,2; 28,9
20	0,73 *s* 3H	15,0	38,4; 40,7; 58,7

A fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_4$ e a estrutura química proposta do metabólito **An17** foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 361,2330 $[M+Na]^+$), correspondente a molécula sodiada.

Analisando os espectros obtidos da substância **An18** (**Apêndices 43** a **47**) com t_R de 27,4 minutos foi possível propor a estrutura química inédita na literatura apresentada na **Figura 39**, confirmada com a análise do espectro de massas de alta resolução como ácido *ent*-3β-acetoxi,1,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico.



Fórmula Molecular: $C_{22}H_{34}O_5$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 401,2317 (**Apêndice 48**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 401,2304

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 27,4 min.

Nome químico: ácido *ent*-3β-acetoxi,1-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Figura 39: Estrutura química do derivado **An18** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *A. niger*

No espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 43**) dessa substância pode-se observar os sinais também presentes no substrato de três simpletos largos em δ_H 5,62 e em 4,75 e 4,98, integrados para 1H cada, atribuídos respectivamente aos hidrogênios olefínicos H-14, e H-17a e b. Um sinal em δ_H 4,45 (*dd*) integrado para um hidrogênio podendo ser atribuído ao hidrogênio H-3. A presença de cinco simpletos integrados para 3H cada em δ_H 0,98, 1,04, 1,26, 2,04 e 2,14 que foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos metílicos ligados nos carbonos C-19, C-20, C-18, C-22 e C-16.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Apêndice 44**) da substância **An18** observa-se, assim como no ácido 3β-acetoxi-copálico, a presença de 22 sinais podendo-se destacar os carbonos

carbonílicos em δ_C 172,9 e 173,3 que foram atribuídos e confirmados com as análises do mapa de contornos HMBC, respectivamente aos carbonos C-15 e C-21, os carbonos olefínicos em δ_C 109,9, 117,0, 145,1 e 161,6 atribuídos respectivamente aos carbonos C-17, C-14, C-8 e C-13.

Distinto do padrão foi possível observar um multipleto em δ_H 4,39, integrado para um hidrogênio, o qual no mapa de contorno HMQC aparece ligado ao carbono em δ_C 69,5, o que sugere a presença do grupo hidroxílico e que que foram atribuídos e confirmados com as análises do mapa de contornos HMBC ao carbono C-1.

Com auxílio também dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° foram caracterizados os carbonos como sendo: cinco metílicos, seis metilênicos, cinco metínicos e seis quaternários.

A proposta para a estrutura química do ácido *ent*-3β-acetoxi,1-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico foi corroborada pela análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 401,2317 $[M+Na]^+$), confirmando também a fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_5$.

Tabela 17: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **An18** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1	4,39 *m* 1H	69,5	41,4
2	2,3 *m*;2,38 *m*	48,5	69,5;
3	4,45 *dd* (11,4;4,6) 1H	82,6	18,4;28,3;41,4;173,3
4	-	41,4	
5	1,15 *d* (2,0) 1H	57,6	17,3;28,3;41,4;69,5;82,6
6	1,76 *m*	25,5	
7	1,25 *m*;1,80 *m*	39,8	
8	-	145,1	
9	1,66 *s-l* 1H	57,6	109,9
10	-	39,9	
11	1,68 *m*	23,0	57,6
12	2,04;2,32	40,6	161,6;117,0;23,0;18,9
13	-	161,6	
14	5,62 *s-l* 1H	117,0	18,9;40,6
15	-	172,9	
16	2,14 *s* 3H	18,9	40,6;117,0;161,6;172,9
17	4,75*s-l* 1H;4,98 *s-l* 1H	109,9	57,6;145,1
18	1,26 *s* 3H	18,4	17,2;28,3;40,6;57,4;82,6
19	0,98 *s* 3H	28,3	18,4;40,6;57,4;82,6
20	1,04 *s* 3H	17,3	39,9;41,4;57,4
21	-	173,3	
22	2,04 *s* 3H	21,1	173,3

O fungo *A. niger* no oitavo dia do processo de biotransformação produziu os seguintes metabólitos majoritários: ácido *ent*-3β,7α-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico, ácido *ent*-3β,6-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico, ácido *ent*-3β,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico e ácido *ent*-3β-acetoxi,1-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico com rendimentos molares de 15%, 4,63%, 6,5% e 7,52%, respectivamente.

Analisando os metabólitos produzidos por *A. niger* foi possível observar reações de hidroxilação nas posições C-7, C-6, C-3 e C-1, assim como ocorreu nos processos de biotransformação descrito por Severiano *et al.* em 2013, nos quais o ácido pimaradienóico foi hidroxilado por outra linhagem de *A. niger* nas posições C-1, C-6, C-7 e C-11.

As principais posições em que ocorre reação de hidroxilaçao nos processos de biotransformação com diterpenos utilizando fungos filamentosos são as posições C-1, C-3, C-7 e C-11, corroborando com os resultados obtidos por outros pesquisadores (Aranda *et al*., 2001; Chen *et al*., 2001; Martínez *et al*., 2004; Yang *et al*., 2004; Gouiric *et al*., 2004; Akihisa *et al*., 2004; Oliveira *et al*., 2005; Lamm *et al*., 2006; Haridy *et al*., 2006; Yang *et al*., 2007; Chou *et al*., 2008; Marquina *et al*., 2009; Chang *et al*., 2009; Chou *et al*., 2009; Chou *et al*., 2011; Yang *et al*.,2012; Severiano *et al*., 2013).

4.4.5 Biotransformação pelo fungo *Curvularia lunata* ATCC 12017

O fungo *C. lunata* foi capaz de biotransformar o ácido 3β-acetoxi-copálico em cinco derivados, consumindo todo o substrato no 3° dia do processo. Analisando os perfis químicos dos extratos da biotransformação podemos inferir que a substância **Cl22** com t_R de 30,9 minutos foi o primeiro metabólito a ser formado e a concentração deste metabólito diminuiu conforme a substância **Cl24** com t_R de 21,5 minutos foi formada, como podemos observar na **Figura 40**.

Foi definido o oitavo dia de incubação para a ampliação da escala do processo de biotransformação, sendo obtidos 345,9mg do extrato bruto para isolamento dos metabólitos majoritários.

Foi possível propor as estruturas químicas das substâncias **Cl24** e **Cl22** por análises dos espectros de RMN e confirmar as propostas por análises dos espectros de massas de alta resolução.

A substância **Cl22** foi identificada como ácido 3β-hidroxi-copálico (**Figura 29**, página 66) que também foi isolado nos processos com o fungo *A. brasiliensis* e codificada anteriormente como **Ab5**, seus espectros estão apresentados nos **apêndices 61** a **65**.

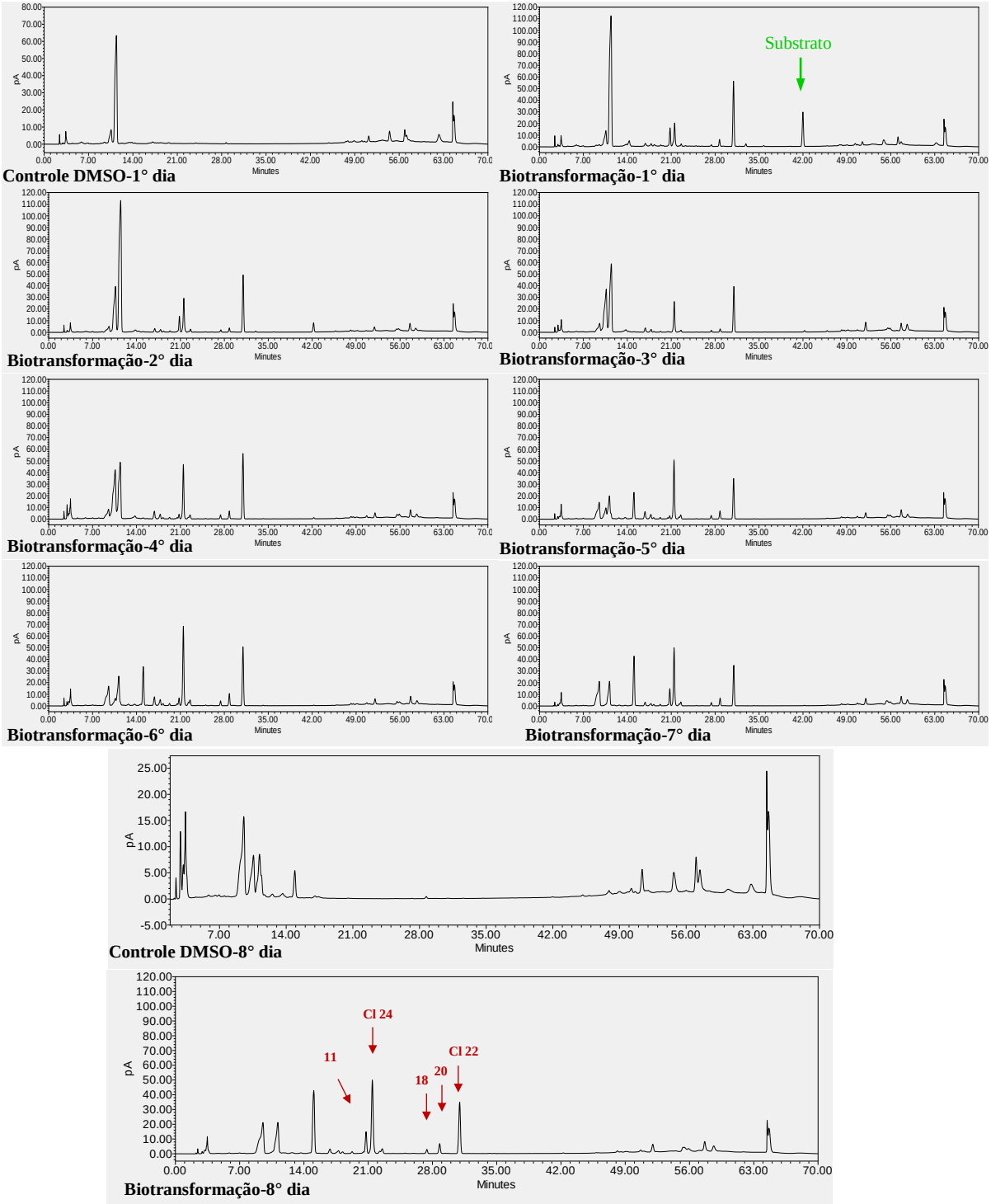
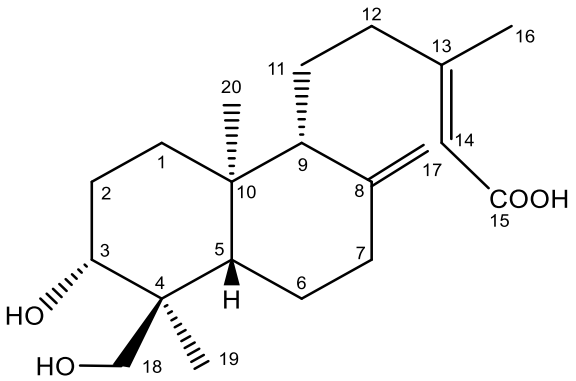


Figura 40: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *C. lunata* do 1° ao 8° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)

O segundo produto formado **Cl24**, provavelmente a partir da substância **Cl22,** sofreu uma hidroxilação na posição 18, podendo ser sugerido pelo deslocamento químico observado em δ_C 67,0.

A estrutura proposta (**Figura 41**) já foi descrita por Jakupovic *et. al.*, 1985 que isolou esta substância das partes aéreas de *Gutierrezia solbrigii*. Porém neste trabalho constam apenas os deslocamentos químicos de ^{1}H dessa substância. Os dados espectroscópicos obtidos estão apresentados na **Tabela 18**.

A fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$ foi confirmada na análise do espectro de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 359,2209 $[M+Na]^+$), correspondente a molécula sodiada.



Fórmula Molecular: $C_{20}H_{32}O_4$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 359,2209(Apêndice **54**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 359,2198

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 21,5min.

Nome químico: Ácido *ent*-3β,18-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Figura 41: Estrutura química do derivado **Cl24** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *C. lunata*

Tabela 18: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Cl24** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1		38,0	
2		28,2	
3	3,64 *dd* (9,9; 6,6) 1H	73,5	12,6;28,2;67,0
4	-	40,2	
5	1,47 *m*	48,2	
6	1,66 *m*; 1,68 *m*	24,9	
7	2,04 *m*; 2,38 *m*	38,9	
8	-	149,3	
9	1,64 *m*	57,1	
10	-	43,8	
11		22,8	
12	2,29 *m*; 2,0 *m*	40,7	
13	-	161,9	
14	5,60 *s-l* 1H	116,8	18,9;40,7;161,9;170,3
15	-	170,3	
16	2,13 *s* 3H	18,9	40,7;116,8;161,9;170,3
17	a) 4,55 *s-l* 1H; b) 4,88 *s-l*	107,1	38,9;57,1;149,3
18	3,26 *d* (11,0) 1H; 3,50 *d* (11,0) 1H	67,0	12,6;43,8;48,2;73,5
19	0,67 *s* 3H	12,6	43,8;48,2;67,0;73,5
20	0,75 *s* 3H	15,4	38,0;48,2;57,1

Pode-se observar no espectro de RMN de ^{1}H (**Apêndice 49**) da substância **Cl24** sinais de hidrogênios que são característicos de subtâncias com esqueleto labdano em δ_H 4,55 (H-17a), 4,88 (H-17b) e 5,60 (H-14), que foram também observados no substrato, assim como a presença de três simpletos integrados para 3H cada em δ_H 0,67, 0,75 e 2,13 que foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos ligados nos carbonos C-19, C-20 e C-16, respectivamente.

Ainda no espectro de RMN de ^{1}H pode-se destacar a presença de dois dupletos em δ_H 3,26 (H-18a) e 3,50 (H-18b) integrados para um hidrogênio, os quais no mapa de contorno

HMQC aparecem ligados ao carbono em δ_C 67,0, sendo característico do grupo hidroxílico ligado ao C-18 que foi confirmado com as análises do mapa de contornos HMBC.

Foi também possível observar um duplo dupleto em δ_H 3,64 (J= 9,9 e 6,6 Hz) integrado para um hidrogênio, os quais no mapa de contorno HMQC aparece ligado ao carbono em δ_C 73,5, o que sugere a presença de grupos hidroxílicos, o qual foi atribuído e confirmados com as análises do mapa de contorno HMBC ao carbono C-3.

Comparando alguns sinais no espectro de RMN de ^{1}H do ácido *ent*-3β,18-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico com os obtidos por Jakupovic e colaboradores em 1985 foi possível observar algumas diferenças nos deslocamentos químicos, podendo ter ocorrido devido ao solvente (clorofórmio deuterado) utilizado pelos autores nos experimentos de RMN.

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se 20 sinais (**Tabela 18**, **Apêndice 50**), que foram caracterizados também com auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135° como sendo: três metílicos, oito metilênicos, quatro metínicos e cinco quaternários.

O fungo *C. lunata* com oito dias de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico produziu como metabólitos majoritários o ácido 3β-hidróxi-copálico e o ácido *ent*-3β,18-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico com rendimentos molares de 7,43% e 39,86%, respectivamente.

O ácido 3β-hidroxi-copálico foi obtido com maior rendimento e em um período menor nos processos realizados com *C. lunata* comparando com os processos realizados com *A. brasiliensis*.

Schmeda-Hirschmann *et al.* em 2004 biotransformou o diterpeno labdano solidagenona utilizando os fungos *A. brasiliensis* e *C. lunata* e em seus experimentos ocorreram reações de hidroxilações nas posições C-3 e C-18, assim como obtido no presente estudo no C-18.

Granados *et al.* em 1990 também realizou biotransformação com diterpenos utilizando *C. lunata* e sugeriu que esse micro-organismo normalmente produz desacetilação, do mesmo

modo que ocorreu no C-3 do ácido 3β-acetoxi-copálico nas duas substâncias majoritárias isoladas em nosso estudo na biotransformação com esse micro-organismo.

4.4.6 Biotransformação pelo fungo *A. phoenicis*

Os estudos da avaliação da influência do tempo de incubação nas reações de biotransformação com *A. phoenicis* foram realizados no 1°, 5° e 10° dia e observando a **Figura 42** pode-se verificar que este fungo foi capaz de consumir grande concentração do substrato nas primeiras 24 horas, mas o dia escolhido para o aumento de escala foi o 5° dia na tentativa de obter maior massa dos produtos, uma vez que o substrato foi consumido quase por completo e no 10° dia o perfil cromatográfico manteve-se similar.

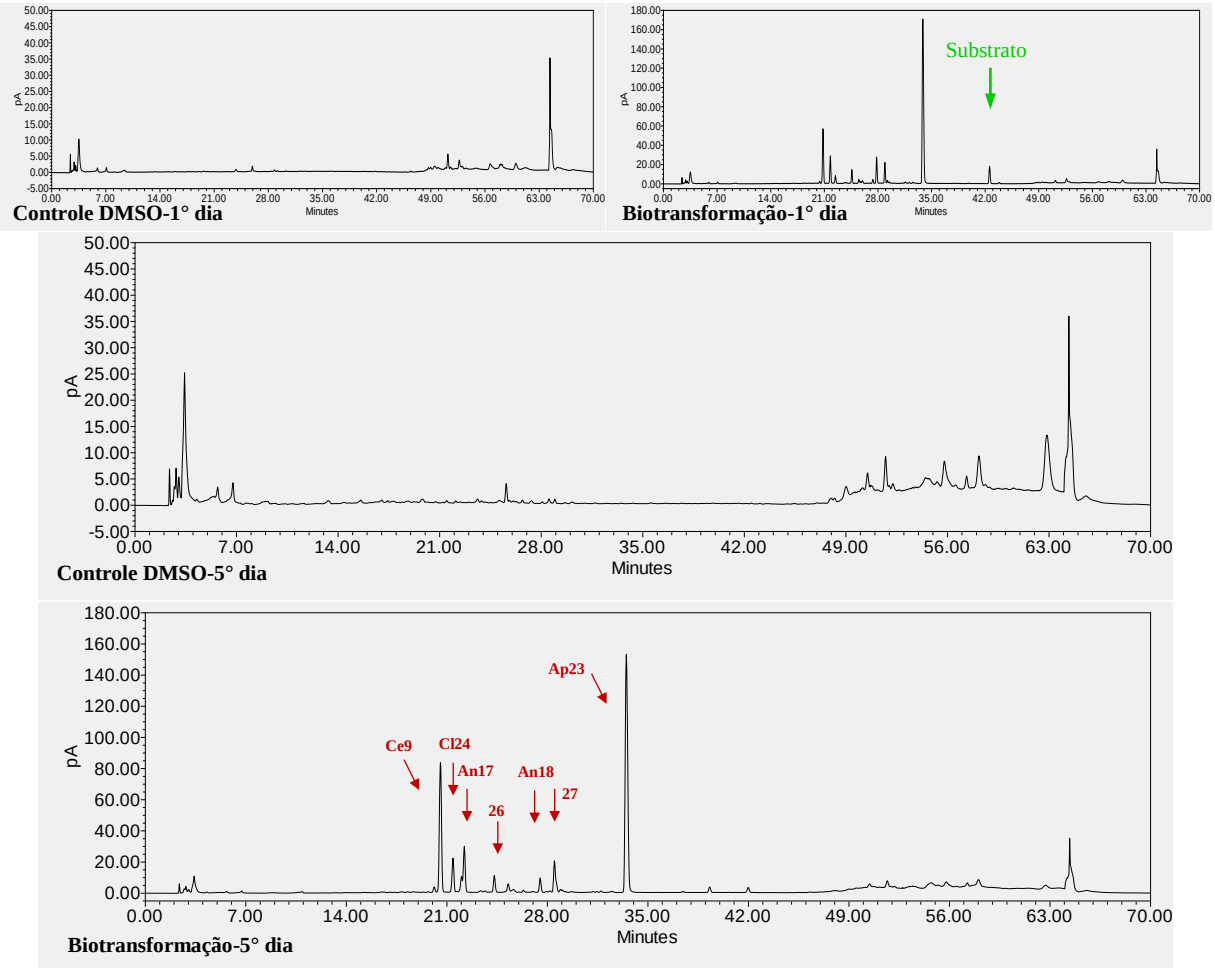


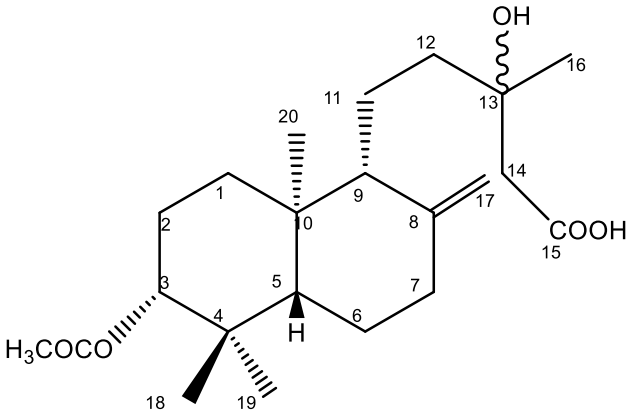
Figura 42: Cromatogramas dos extratos brutos dos controles com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *A. phoenicis* 1° e 5° dia. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)

Na **Figura 42** foi possível observar sete metabólitos dos quais cinco já foram produzidos e isolados anteriormente com os fungos *A. niger* (substância **An17** e **An18**), *C. lunata* (substância **Cl24**), *C. echinulata* e *C. elegans* (substância **Ce9**).

O metabólito **Ce9** foi isolado e identificado como ácido *ent*-3β-acetoxi,6,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico (**Figura 34,** página 76), seus espectros estão apresentados nos **Apêndices 66** a **70**, a mesma substância foi isolada da biotransformação com *C. echinulata*. Seu rendimento molar com *A. phoenicis* foi de 5,6% o que é inferior ao obtido anteriormente.

A substância **An17** (ácido *ent*-3β,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico, (**Figura 38**, página 84, **Apêndices 71** a **75**) teve um rendimento molar de 4,98% também inferior ao obtido com *A. niger*.

A substância **Ap23** (**Figura 43**) também foi produzida pelo fungo *A. niger* como um dos metabólitos minoritários, diferentemente do ocorrido com *A. phoenicis* que demonstrou na triagem ser o produto majoritário desse processo, como podemos observar na **Figura 42** e o rendimento molar que foi de 17,92%.



Fórmula Molecular: $C_{22}H_{36}O_5$

***m/z* [M+Na]$^+$ encontrada:** 403,2447 (**Apêndice 60**)

***m/z* [M+Na]$^+$ calculada:** 403,2460

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 33,5min.

Nome químico: ácido *ent*-3β-acetoxi,13-hidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico

Figura 43: Estrutura química do derivado **Ap23** obtido pela biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelo fungo *A. phoenicis*

As análises espectroscópicas deste metabólito (**Ap23**) permitiram identificar como sendo o diterpeno ácido *ent*-3β-acetoxi,13-hidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico, cuja a estrutura química proposta é inédita na literatura até o momento e foi confirmada na análise do espectro

de massas de alta resolução obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (*m/z* 403,2447 $[M+Na]^+$), correspondente a molécula sodiada e a fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_5$. Os dados de RMN estão apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e HMBC obtidos em CD_3OD referentes à substância **Ap23** (*δ=ppm*)

Posição	*δ* ^{1}H, *multiplicidade*, (*J* Hz), integral	*δ* ^{13}C/HMQC	HMBC
1		37,9	
2		25,3	
3	4,50 *dd* (10,5;5,8) 1H	82,4	17,0;25,3;28,7;39,2;172,9
4	-	39,2	
5		56,1	
6		25,0	
7		39,1	
8	-	149,1	
9		58,4	
10	-	40,5	
11		19,1	
12		41,9	
13	-	72,5	
14	2,44 *s-l* 2H	46,3	27,3;41,9;72,5
15	-	175,5	
16	1,27 *s* 3H	27,3	41,9;46,3;72,5
17	a) 4,62 *s-l* 1H; b) 4,84 *s-l* 1H	107,8	39,1;58,4;149,1
18	0,88 *s* 3H	28,7	17,0;39,2;56,1;82,4
19	0,88 *s* 3H	17,0	28,7;39,2;56,1;82,4
20	0,75 *s* 3H	15,0	37,9;40,5;56,1;58,4
21	-	172,9	
22	2,03 *s* 3H	21,1	172,9

No espectro de RMN de ^1H (**Apêndice 55**) da substância **Ap23** verifica-se sinais que também foram observados no espectro de RMN do ácido 3β-acetoxi-copálico, tais como: dois simpletos largos em δ_H 4,84 e 4,62, integrados para 1H cada, atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-17a e b. Um sinal em δ_H 4,50 (*dd*) (J= 10,5 e 5,8 Hz), integrado para um

hidrogênio, o qual no mapa de contornos HMQC aparece ligado ao carbono em δ_C 82,4, integrado para um hidrogênio, pode ser atribuído ao hidrogênio H-3. Ainda no espectro de RMN de ^{1}H verifica-se a presença de cinco sinais (simpletos integrados para 3H cada) em δ_H 0,75, 0,88, 0,88, 1,27 e 2,03 que foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos metílicos ligados nos carbonos C-20, C-19, C-18, C-16 e a do grupamento –$OCOCH_3$.

Pode-se destacar no RMN de ^{13}C (**Apêndice 56**) um carbono quaternário com deslocamento químico em δ_C 72,5, que sugere a presença de grupo hidroxílico, o qual foi atribuído ao carbono C-13 e confirmado com as análises do mapa de contorno HMBC (**Apêndice 57**).

Foi possível também observar a presença de 22 sinais que foram caracterizados com auxílio dos dados obtidos no espectro de ^{13}C-DEPT 135 como sendo: cinco metílicos, oito metilênicos, três metínicos e seis quaternários. Os carbonos carbonílicos em δ_C 175,5 e 172,9 que foram atribuídos aos carbonos C-15 e C-21, respectivamente, e confirmados com as análises do mapa de contornos HMBC juntamente com os carbonos olefínicos em δ_H 149,1 e 107,8, atribuídos respectivamente aos carbonos C-8 e C-17.

4.4.7 Biotransformação pelo fungo *A. alliaceus* ATCC 10060

As análises dos cromatogramas (**Figura 44**) permitiram detectar 5 metabólitos, dos quais dois minoritários não foram produzidos em escala ampliada.

Em 24 horas de biotransformação o substrato foi consumido quase por completo não alterando o perfil cromatográfico no 5º e 10º dia de monitoramento. Nesses dias ocorreu a diminuição da concentração do metabólito majoritário e aumento dos metabólitos **30** e **An17**, mas em concentrações muito baixas. Portanto, optou-se por realizar o aumento de escala no 1º dia do processo.

O metabólito majoritário foi identificado como ácido 3β-hidroxi-copálico (**Ab5**) e apresentou rendimento molar de 18,13%, rendimento este superior aos obtidos nos processos com os fungos *A. brasiliensis* e *C. lunata*.

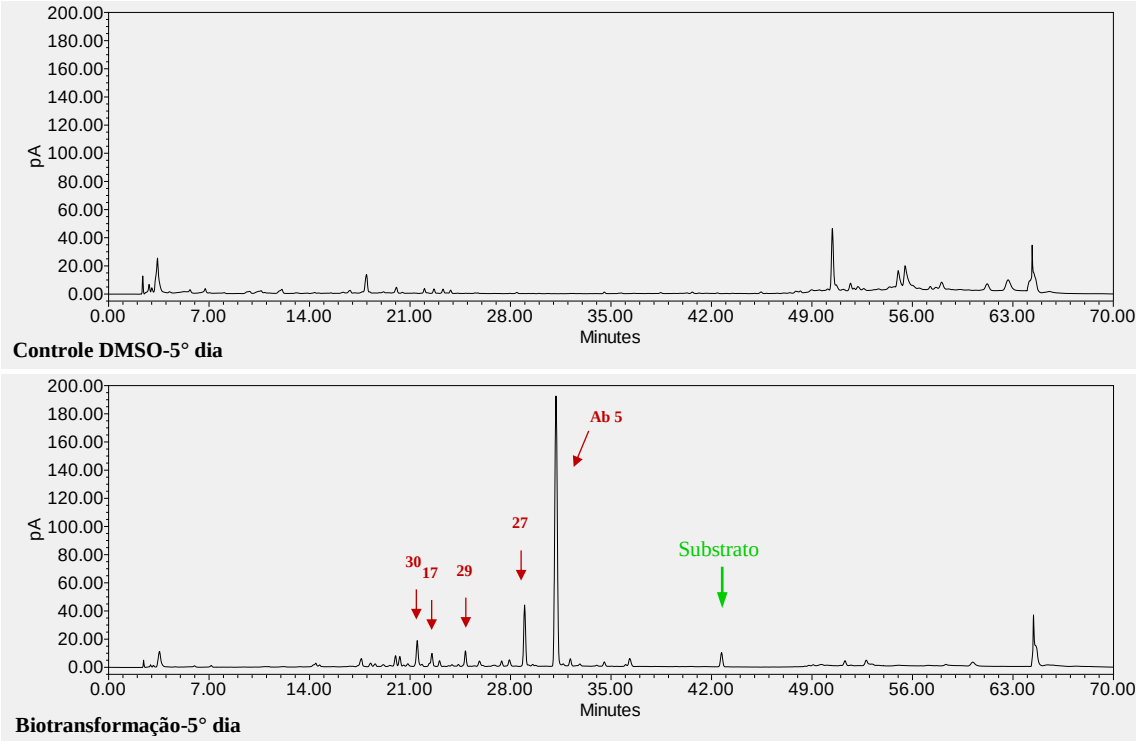


Figura 44: Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com *A. phoenicis*, 1° dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)

4.4.8 Biotransformação pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159

A correlação entre os produtos advindos da biotransformação de *B. bassiana* com o metabolismo humano é relatado por Paula e colaboradores em 2015 que biotransformou clonazepam, um medicamento utilizado como anticonvulsivo, relaxante muscular e ansiolítico, em um único metabólito, o 7-amino clonazepam que também foi identificado no estudo de metabolismo *in vivo* realizado por outros autores (Acikgoz *et al*., 2009; Acikgoz *et al*., 2012; Andresen *et al*., 2013).

Em nossos estudos analisando os cromatogramas da **Figura 45**, no processo apresentado, podemos observar que o diterpeno foi detectado em grande quantidade até o 5º dia de análise e no 10º dia do estudo foi consumido quase por completo. Portanto, o último dia do estudo foi o escolhido para o aumento de escala.

Os produtos detectados nos processos realizados com *B. bassiana* foram isolados anteriormente com outros fungos filamentosos com rendimentos superiores aos apresentados com essa linhagem.

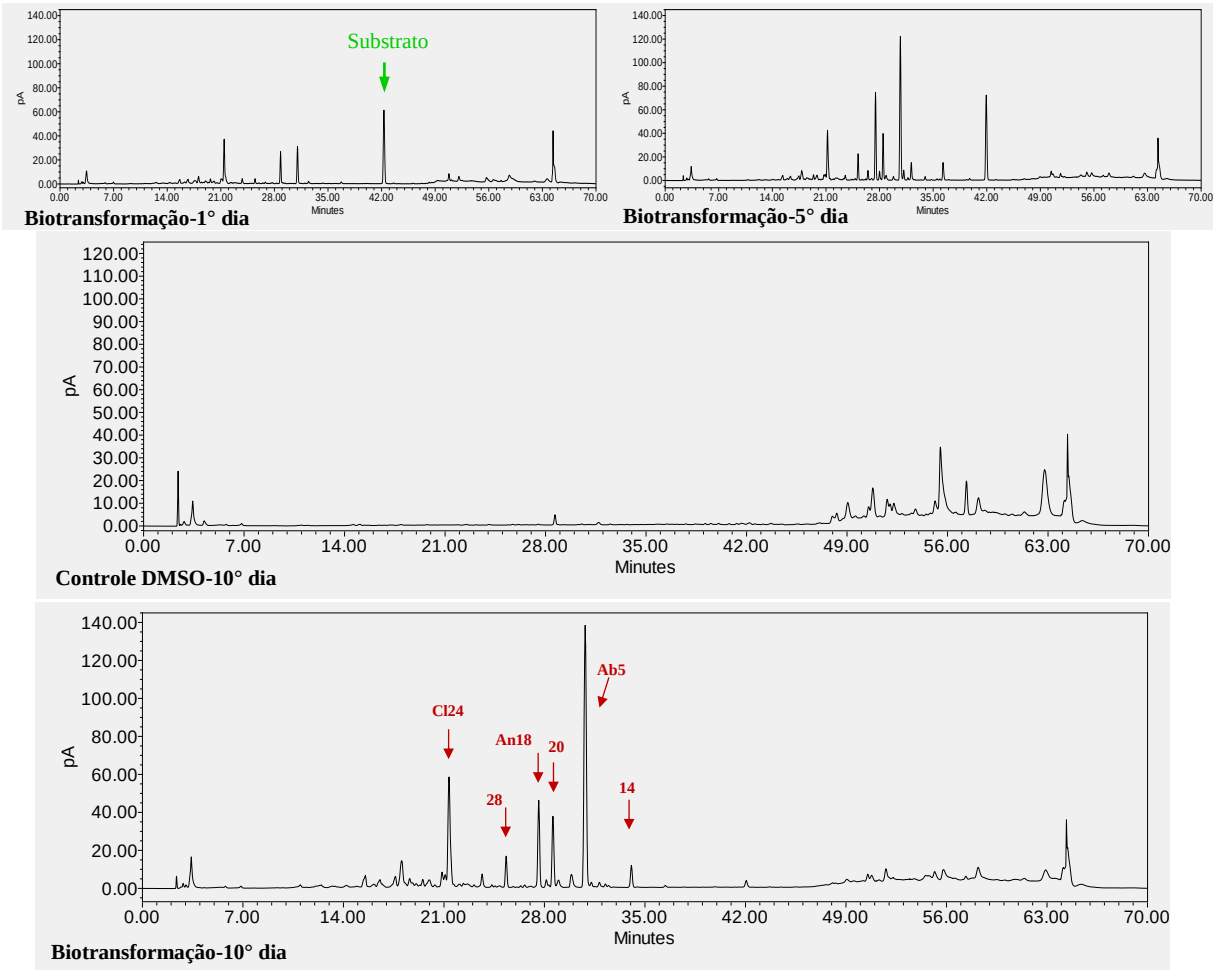


Figura 45: Cromatogramas dos extratos brutos do controle com DMSO e das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com *B. bassiana*, 1º, 5º e 10º dia obtidos por HPLC-CAD. Coluna C_{18} de fase reversa Kromasil (Varian®)

O ácido 3β-hidroxi-copálico (**Ab5**) foi o produto majoritário, com rendimento molar de 14,28%, assim como ocorreu com a biotransformação pelo fungo *A. alliaceus*. O ácido *ent*-3β,18-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (**Cl24**) foi produzido com rendimento molar de

3,2%, rendimento inferior ao apresentado no processo com o fungo *C. lunata*, na qual foi o produto majoritário.

O ácido *ent*-3β-acetoxi,1-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (**An18**), anteriormente isolado, foi produzido com rendimento molar de 2,98%, também inferior ao realizado com o fungo *A. niger*.

Todos os metabólitos identificados nos processos das biotransformações do ácido 3β-acetoxi-copálico com os fungos filamentosos estão apresentados na **Figura 46** com seus respectivos rendimentos.

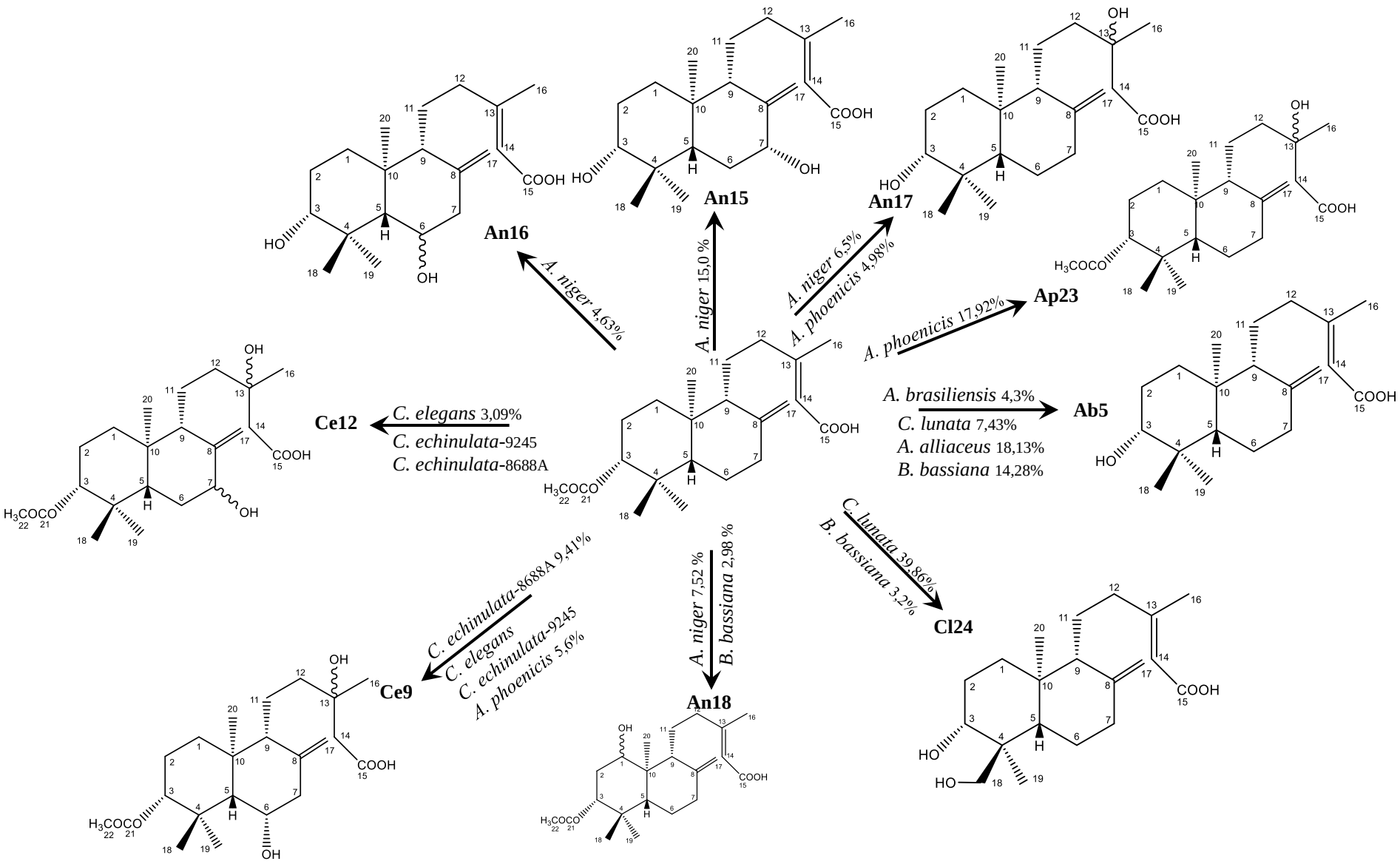


Figura 46: Estrutura química dos metabólitos isolados da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelos fungos filamentosos

4.4.9 Biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico pelas bactérias do trato gastrointestinal

Na etapa de triagem dos processos de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com as bactérias do trato gastrointestinal *L. acidophilus*-ATCC, *B. longum*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* e *E. coli*, cultivada em aerobiose e anaerobiose, não foram detectados picos referentes a possíveis produtos de biotransformação nas análises realizadas por HPLC-CAD.

Entretanto, corroborando com os trabalhos de Sekirov e colaboradores (2010) que descrevem o papel da microbiota intestinal foi possível observar na triagem inicial que *L. acidophilus* CHR Hansen foi capaz de biotransformar o diterpeno em produtos menos polares, sendo um metabólito com tempo de retenção (T_R) de 57,5 minutos (**Figura 47**). As misturas bacterianas e *Bifidobacterium* sp também foram capazes de biotransformar o diterpeno em dois metabólitos majoritários (T_R de 54,8 e 55,9 minutos) (**Figura 48**). Esses processos foram desenvolvidos em escala ampliada, mas isso não foi suficiente para obter essas substâncias em quantidade suficiente para dar prosseguimento a etapa de isolamento.

Com o objetivo de aumentar os rendimentos dos processos de biotransformação com as bactérias o meio de cultura utilizado nos processos foi alterado para o caldo anaeróbico GIFU e para o caldo MRS suplementado com inulina e o inóculo inicial foi aumentado. Essas novas condições de cultivo foram também empregadas para as bactérias que não biotransformaram nas condições anteriores.

Aumentando a concentração do inóculo e suplementando o meio MRS com inulina foram detectados os mesmos metabólitos que haviam sido detectados antes das alterações, porém agora em maiores concentrações (**Figuras 47 e 48**).

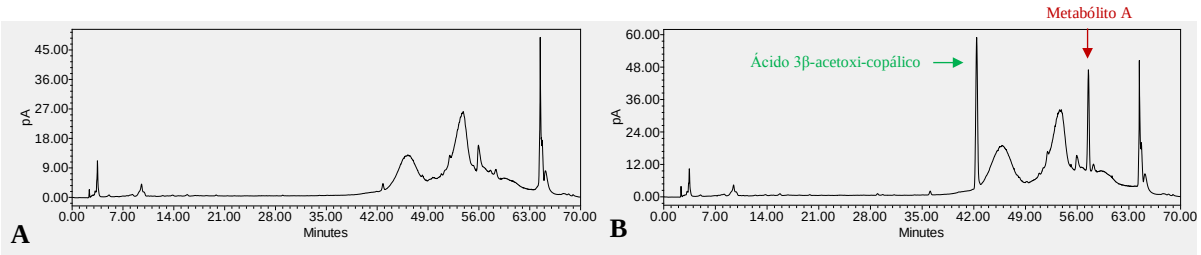


Figura 47: Cromatogramas dos extratos da biotransformação com *L. acidophilus* no meio de cultivo MRS suplementado com glicose e Inulina, após 1 hora da adição do substrato, obtidos por HPLC-CAD; **A)** Cromatograma do extrato controle; **B)** Cromatograma do extrato da biotransformação.

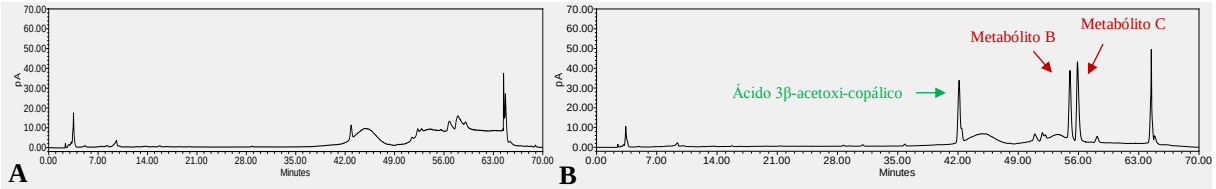


Figura 48: Cromatogramas dos extratos da biotransformação com *Bifidobacterium* sp no caldo MRS suplementado com inulina, após 3 horas da adição do substrato, obtidos por HPLC-CAD; **A)** Cromatograma do extrato controle; **B)** Cromatograma do extrato da biotransformação

As análises realizadas nas novas condições nos processos de biotransformações com as bactérias *Bifidobacterium* sp e *L. acidophilus* indicam que o diterpeno não foi ainda totalmente modificado pela ação das enzimas bacterianas, sendo possível observar altas concentrações do diterpeno nos extratos dos meios de cultivo, o que sem dúvida é um dos fatores que contribuíram para os baixos rendimentos destes processos.

Nas novas condições realizadas nos processos de biotransformação aumentando a concentração do inóculo, suplementando o meio MRS e MH com inulina e utilizando também o meio GIFU não foram detectados nenhum novo metabólito após 24 horas de monitoramento. Não foram detectados nos processos desenvolvidos com o meio Gifu os metabólitos detectados anteriormente, não obtendo assim sucesso nas alterações realizadas para a maioria das bactérias avaliadas.

Visando o isolamento dos produtos de biotransformação majoritários detectados nos processos de biotransformação, os processos foram desenvolvidos em escala ampliada com concentrações finais de substrato e de inóculo idênticas as que foram padronizadas na triagem.

No processo de ampliação da escala com *Bifidobacterium* sp no meio MRS foram utilizados 90 mg do substrato sendo obtidos 204 mg de extrato bruto. Para propiciar o isolamento dos produtos, o extrato foi pré-fracionado utilizando cartuchos de SPE, contendo 1 g de fase estacionária composta por sílica modificada C_{18}, o qual foi eluído com volumes de 6 mL de fase móvel composta por metanol e água em diferentes proporções (iniciando com 100% de água até 100% de metanol com aumento de 10% do solvente orgânico a cada eluição). Para auxiliar na eluição da fase móvel foi utilizado um sistema a vácuo (VISIPREP-SPE, SUPELCO®).

Após fracionamento e análise das frações foram detectados produtos de biotransformação apenas na fração obtida com 90% de metanol. Para o isolamento desses metabólitos foi utilizado o Cromatógrafo Waters® no modo semi-preparativo acoplado ao detector CAD.

A partir de 10mg da fração escolhida para o isolamento foram obtidos 0,2 mg da substância **B** e 0,6 mg da substância **C**, inviabilizando as análises de RMN nas condições disponíveis na FFCLRP-USP.

Nos cromatogramas dos demais extratos brutos foram detectados produtos da biotransformação, mas a concentração do substrato, embora tenha diminuído, ainda permaneceu elevada. Os extratos obtidos desses processos foram também analisados por LC-MS devido a maior sensibilidade desse detector e também para auxiliar na identificação desses possíveis metabólitos. Os cromatogramas e os espectros estão apresentados nas **Figuras 49** a **51**.

Nas novas análises foram detectados diversos metabólitos não detectados anteriormente nas análises por HPLC-CAD. Para todas as bactérias avaliadas foram realizadas as análises dos controles com DMSO como branco e assim detectou-se os íons que não eram de interesse. Em todas as amostras foi também detectado o ácido 3β-acetoxi-copálico (substrato) em altas concentrações, demostrando que grande parte do mesmo não foi consumido.

No cromatograma obtido por LC-MS apresentado na **Figura 49** da biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico com *B. longum* foram detectados possíveis produtos de biotransformação com T_R de 1,56, 1,81, 2,99, 3,75, 4,71 minutos, os quais não foram detectados no extrato controle. Quatro principiais íons precursores (*m/z* 165, *m/z* 319, *m/z* 317, *m/z* 299) estão apresentados na **Tabela 20**.

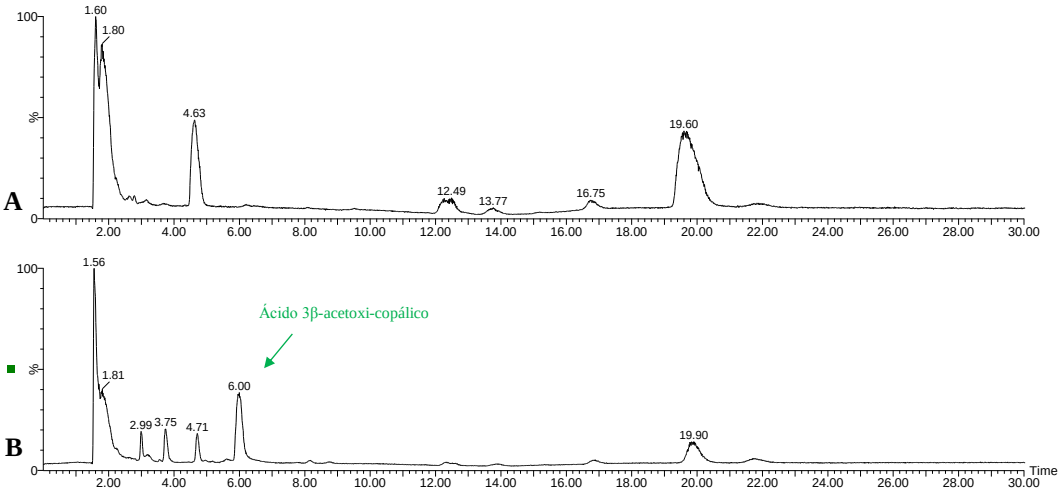


Figura 49: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 24 horas obtidos por LC-MS, Tic; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *B. longum*

Diversas substâncias minoritárias foram detectadas após 6 horas de biotransformação com *Bifidobacterium* sp (**Figura 50**) e quatro produtos em maiores concentrações foram detectados com T_R de 2,82, 3,09, 4,38, 4,64 minutos (*m/z* 319, *m/z* 374, *m/z* 295, *m/z* 299).

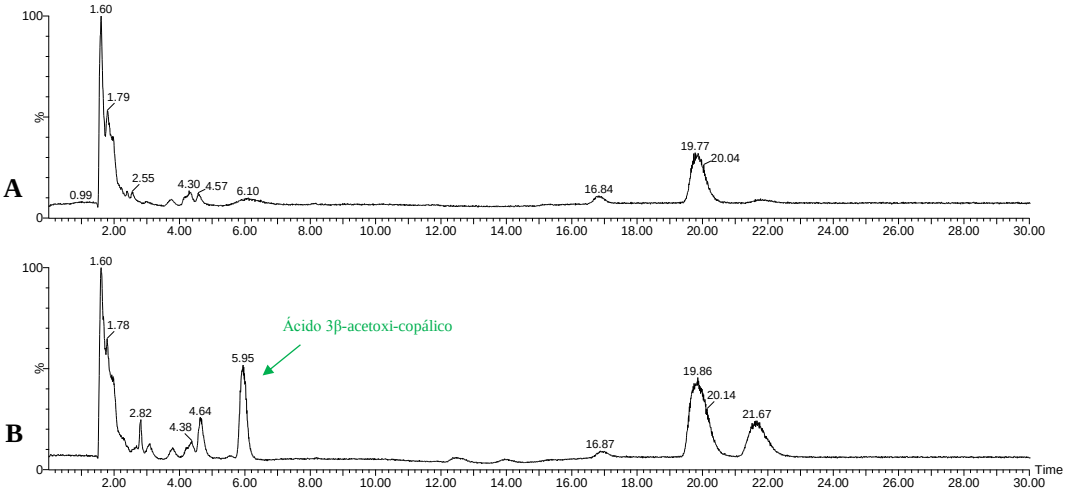


Figura 50: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 6 horas obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *Bifidobacterium* sp

No processo de biotransformação realizado com a bactéria *E. coli* em anaerobiose e aerobiose foram detectadas sete substâncias (**Figura 51**) com T_R de 1,63, 1,81, 1,82, 2,79, 2,88, 3,11 e 3,48 minutos (*m/z* 319, 335, 333, 319, 377, 291 e 339, respectivamente).

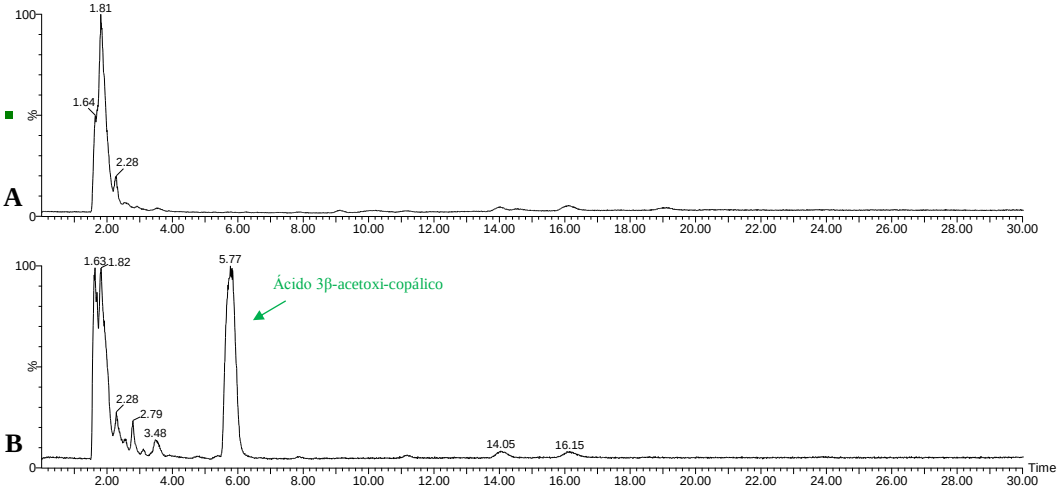


Figura 51: Cromatogramas dos extratos brutos no tempo de 24 horas obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *E. coli*

Na biotransformação com a bactéria *L. rhamnosus* foram detectados quatro produtos (**Figura 52**) das reações com T_R de 3,21, 3,63, 3,78 e 5,6 minutos que não foram detectados no extrato controle. Essas substâncias nos espectros de massas apresentaram sinais de *m/z* 291, *m/z* 319, *m/z* 317 e *m/z* 363, respectivamente.

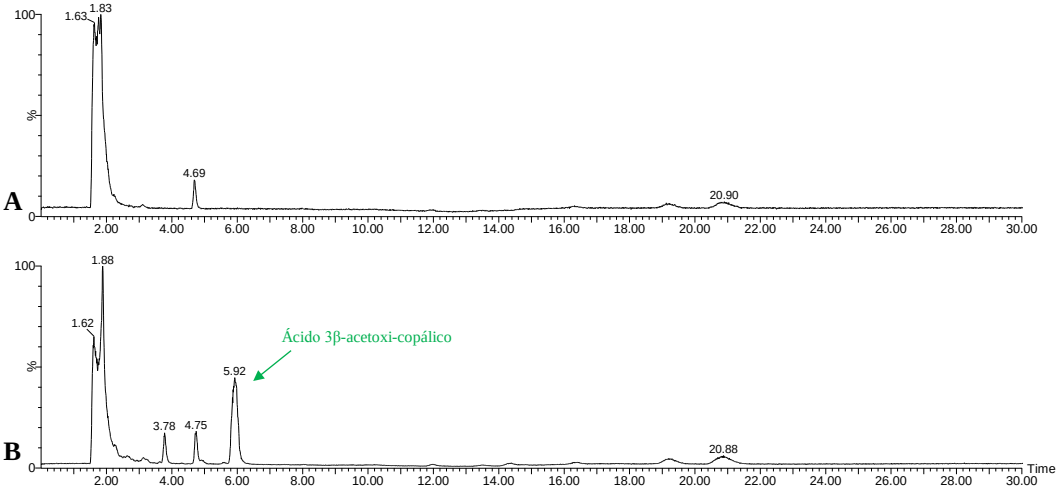


Figura 52: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas, obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *L. rhamnosus*.

Nas análises anteriores realizadas por HPLC-CAD dos processos realizados com a bactéria *L. acidophilus* provenientes da CHR Hansen com 1 hora de reação foi detectado apenas um produto quando comparado com o extrato controle (**Figura 53A**). Os mesmos extratos foram analisados por LC-MS e detectou-se sete produtos que não estavam presentes no controle (**Figura 53B**). Esses produtos nos espectros apresentaram sinais de *m/z* 333, *m/z* 319, *m/z* 291, *m/z* 317, *m/z* 353, *m/z* 421 e *m/z* 363 (**Tabela 20).**

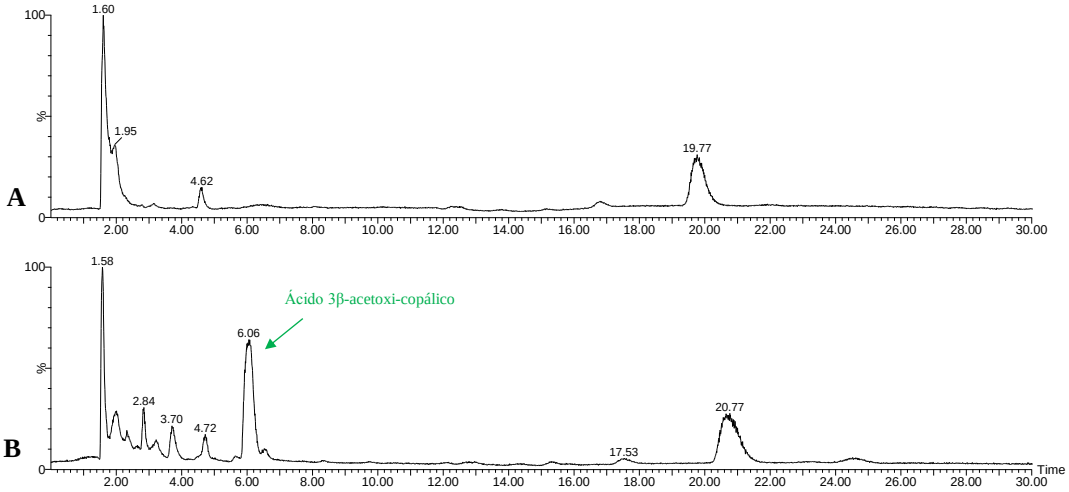


Figura 53: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 1 hora, obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *L. acidophilus*.

Os perfis obtidos com as linhagens de *L. acidophilus* foram similares qualitativamente sendo detectados na biotransformação com *L. acidophilus* ATCC 53544 (**Figura 54**) seis metabólitos e destes apenas o que apresentou *m/z* 299 não foi produzido anteriormente por *L. acidophilus* da CHR Hansen. Nos espectros obtidos foram observados os sinais de *m/z* 291, 319, 299, 421, 363 e a substância majoritária de *m/z* 317, com T_R de 3,28, 3,69, 4,85, 6,1, 5,7 e 3,85 minutos, respectivamente.

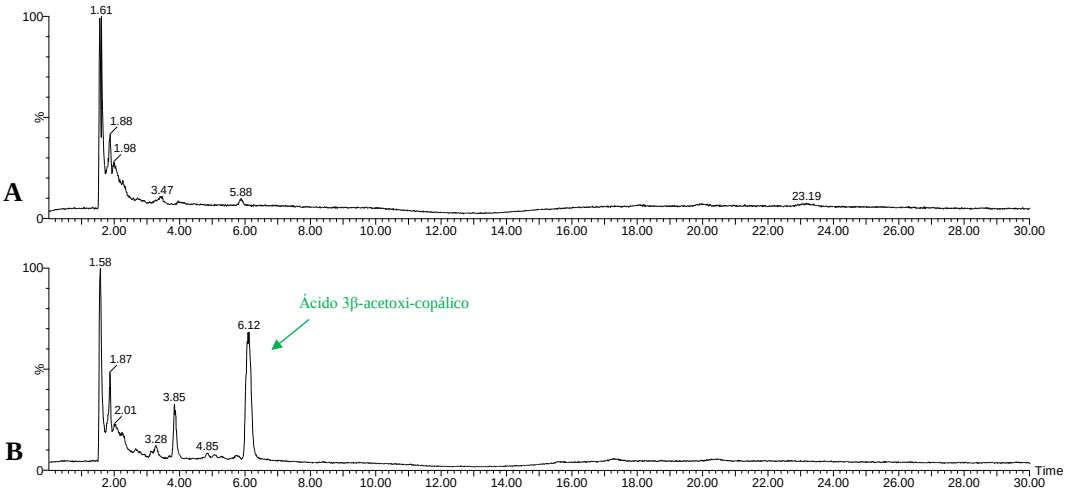


Figura 54: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas, obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *L. acidophilus* ATCC 53544

Na biotransformação com *L. johnsonii* foram detectados seis produtos, sendo que um deles foi detectado somente nos experimentos realizados com esse micro-organismo (*m/z* 349, T_R 2,17 minutos) (**Figura 55**). Os picos do cromatograma com os tempos de retenção em 3,11, 3,6, 3,76, 5,9, 5,54 minutos, que não foram encontrados no cromatograma do controle, apresentam íons de *m/z* 291, 319, 317, 421 e 363, respectivamente.

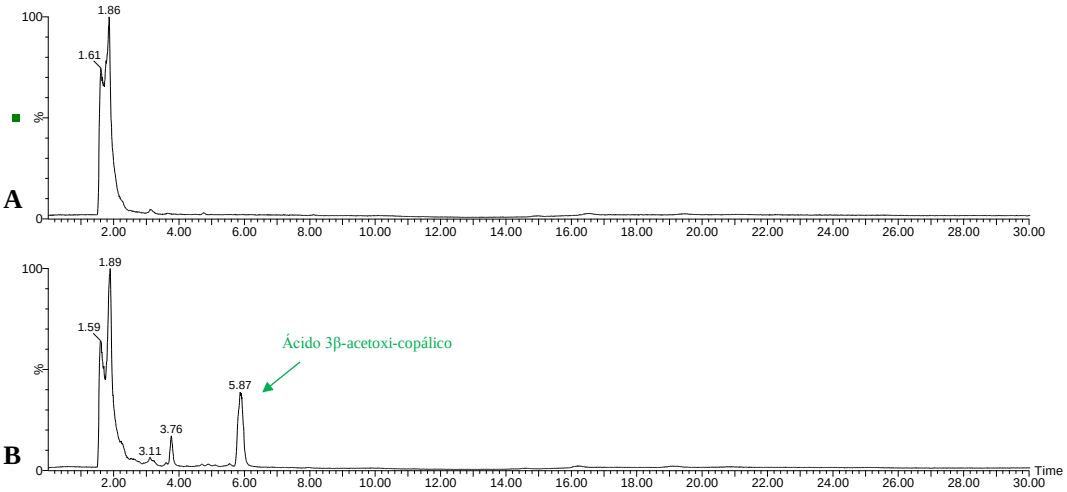


Figura 55: Cromatogramas dos extratos brutos, tempo 24 horas; obtidos por LC-MS; **A)** Controle com DMSO; **B)** Biotransformação com *L. johnsonii*.

Os extratos foram analisados em espectrômetro Xevo equipado com fonte de ionização por *electrospray* e analisador do tipo quadrupolo. Argônio foi usado como gás de colisão em energias de colisão variando de 20 a 40 eV.

Os espectros de massas obtidos estão apresentados na **Figura 57** e os íons diagnósticos que possibilitaram sugerir a presença de certos grupos nas estruturas químicas propostas para os produtos de biotransformação obtidos com as bactérias do trato gastrointestinal estão apresentados na **Figura 56.** Outros metabólitos foram também detectados, porém não foi possível propor as estruturas químicas apenas com base nos dados obtidos neste trabalho.

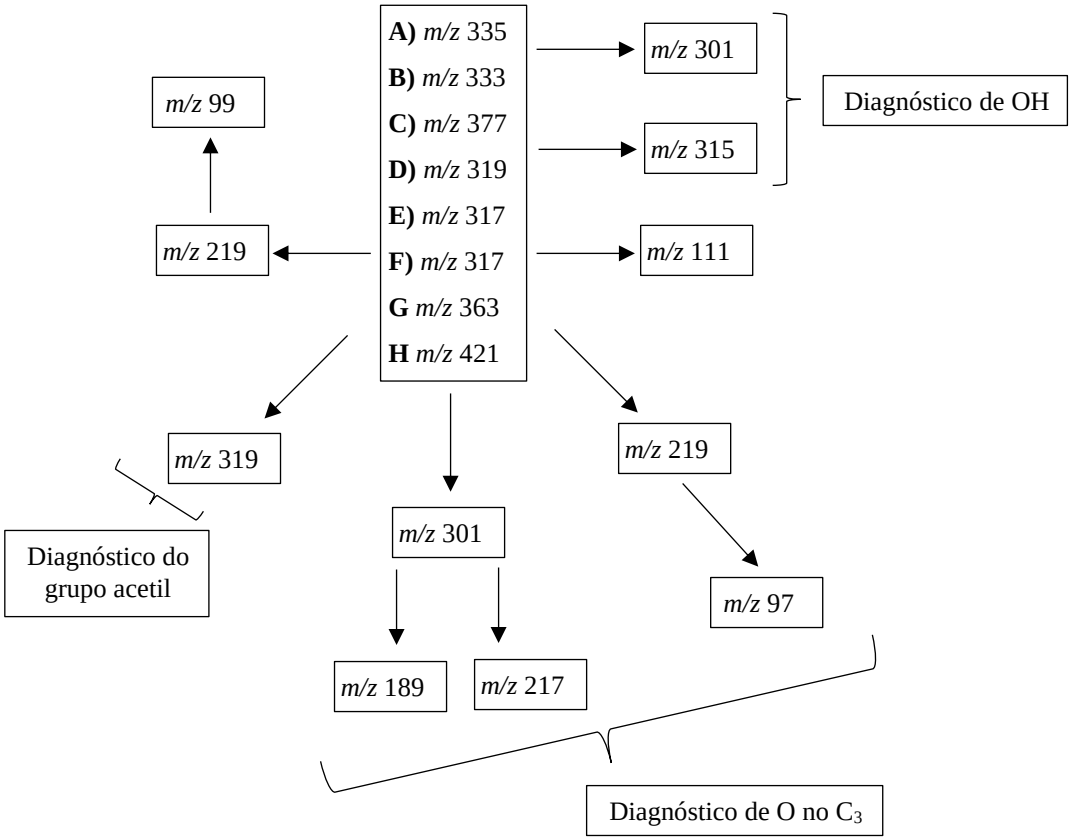


Figura 56: Correlações estrutura-fragmentação utilizadas para a identificação de alguns grupos funcionais das estruturas dos produtos de biotransformação do ácido 3β-acetoxi-copálico promovida por *L. johnsonii*.

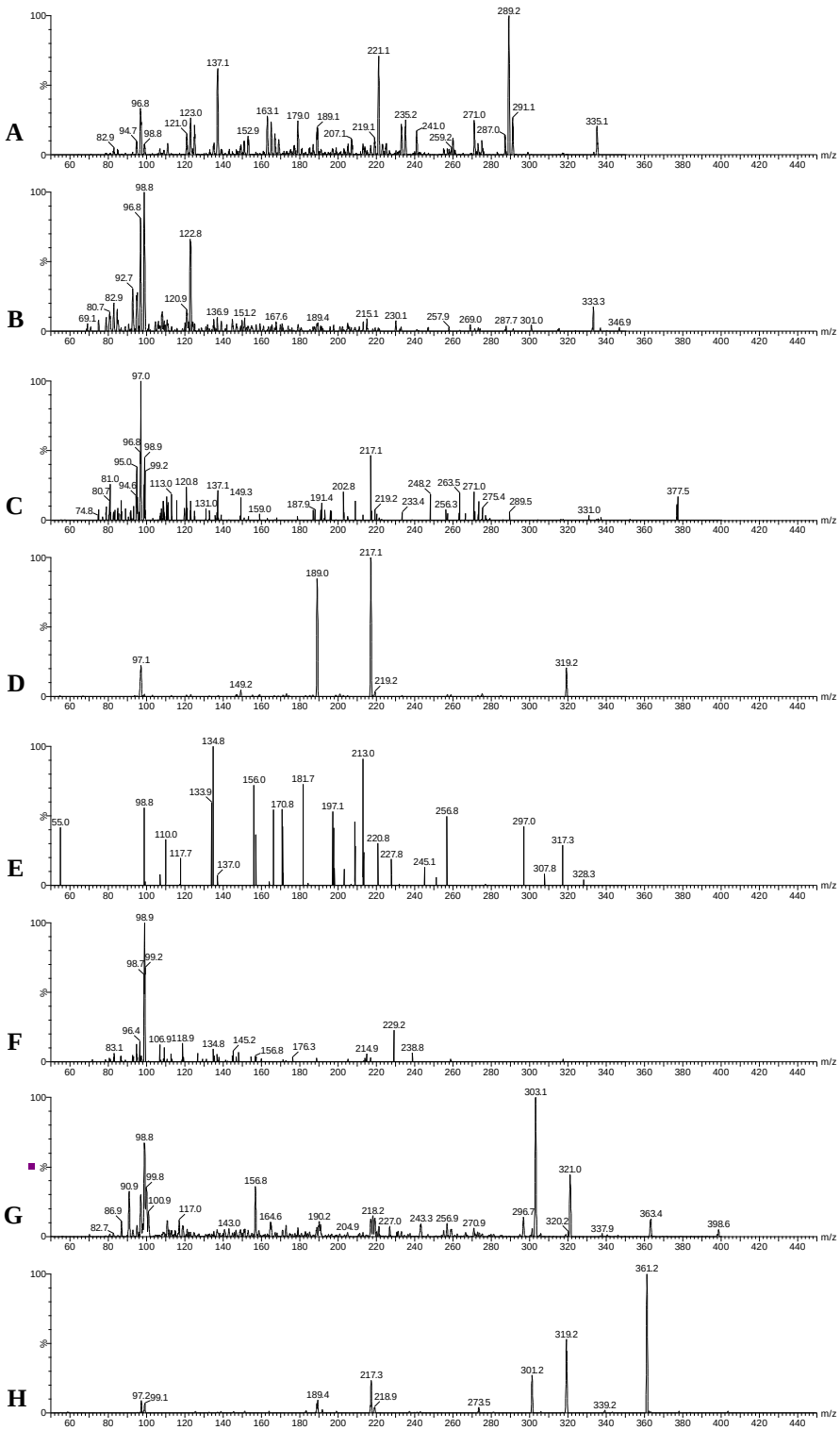


Figura 57: Espectros de massas obtidos com ionização por electrospray no modo negativo dos íons precursores de **A)** *m/z* 335 (27eV), **B)** *m/z* 333 (29eV), **C)** *m/z* 377 (40eV), **D)** *m/z* 319 (35eV), **E)** *m/z* 317 (35eV), **F)** *m/z* 317 (33eV), **G** *m/z* 363 (35eV), **H** *m/z* 421 (35eV).

Neste trabalho, a identificação dos produtos de biotransformação baseou-se no estudo sistemático sobre a fragmentação de diterpenos do tipo labdano isolados de oleorresinas de espécies de *Copaifera* ionizados por eletrospray empregando espectrometria de massas sequencial, realizado pelo grupo do prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti (FFCLRP-USP). As modificações na estrutura do ácido 3β-acetoxi-copálico promovidas por *L. johnsonii*, propostas na **Tabela 20**, foram sugeridas a partir das estruturas químicas dos íons fragmentos propostos pelo grupo do prof. Crotti. Segundo este estudo, os íons fragmentos de *m/z* 219 e *m/z* 99 os íons fragmentos de *m/z* 219 e *m/z* 99 podem ser considerados diagnósticos dos diterpenos do tipo labdano. Esses íons foram observados em todos os espectros e a proposta para a formação destes íons está apresentada na **Figura 58**.

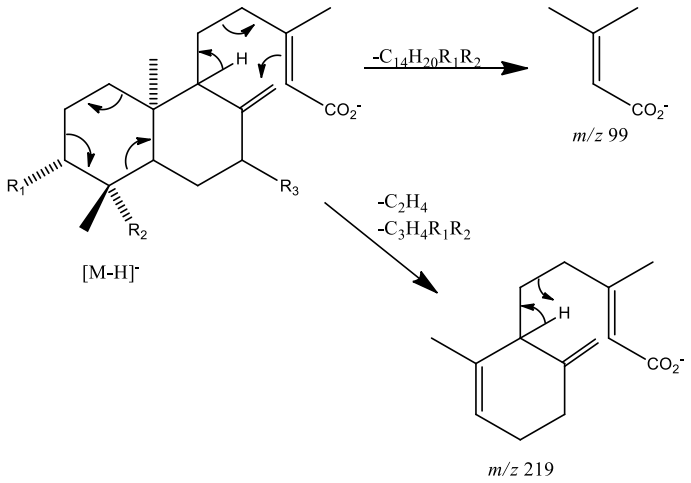


Figura 58: Proposta para a formação dos íons produtos de (*m/z* 219) e de (*m/z* 99)

Nas substâncias identificadas como **B** e **F** o íon de *m/z* 99 é o pico base nos espectros apresentados.

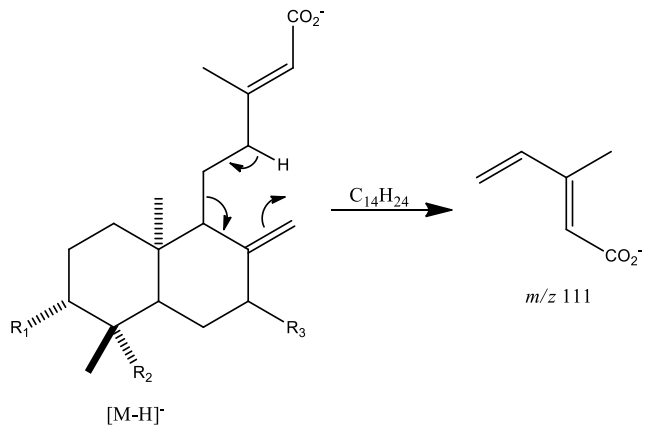


Figura 59: Proposta para a formação do íon produto de *m/z* 111

O íon fragmento de *m/z* 319 pode estar associado ao grupo acetoxi presente nas substâncias.

Os íons produtos de *m/z* 217, *m/z* 189 e *m/z* 97 sugerem a presença de átomo de oxigênio na posição 3 e pelo menos um deles foi detectado nas substâncias cujas estruturas químicas foram propostas.

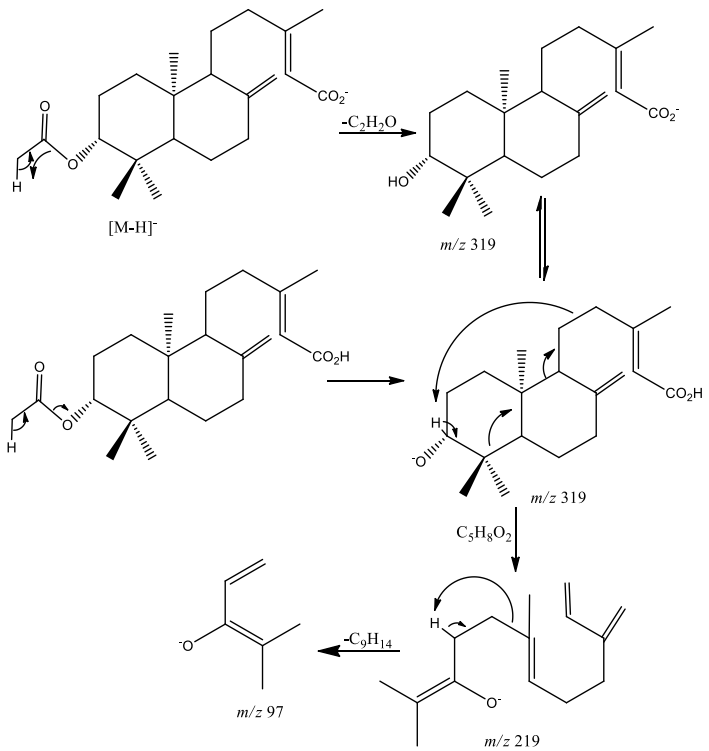


Figura 60: Proposta para a formação dos íons produtos de *m/z* 319 e de *m/z* 97

O íon de *m/z* 97 é o pico base das substâncias **C**, **B,** porém possui intensidade relativa muito baixa nos espectros da maioria das substâncias identificadas. Por sua vez, o íon de *m/z* 217 foi detectado nos espectros de massas das substâncias **D**, **H**,**C**, **G**, **A** e **B.**

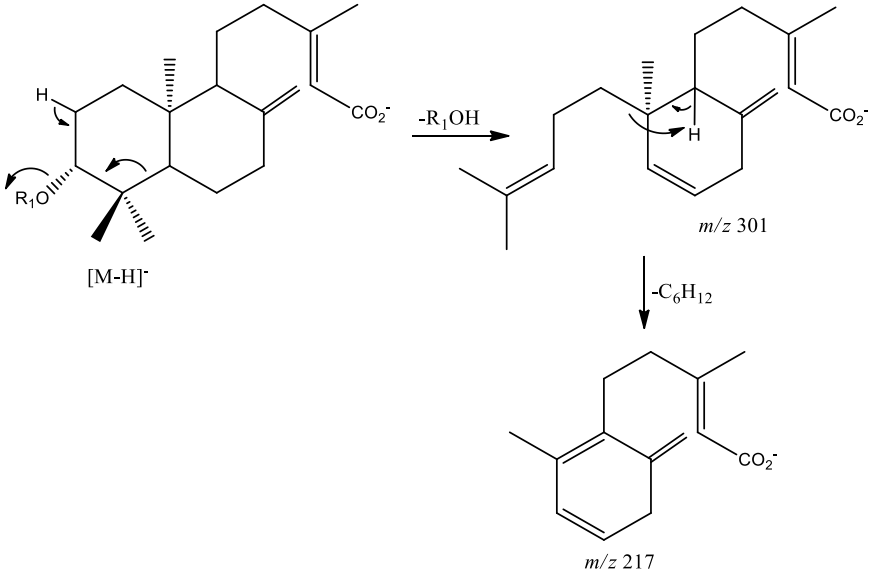
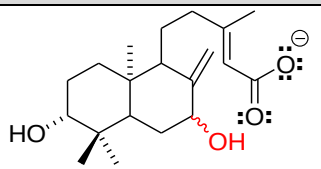
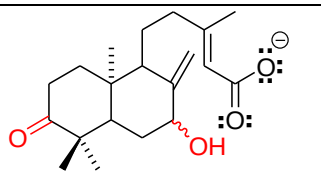
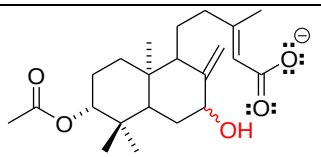
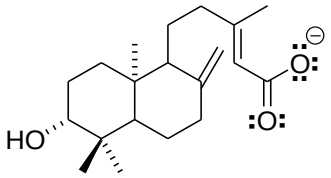
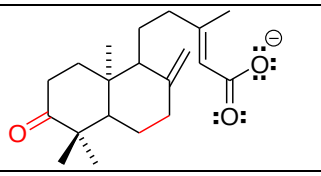
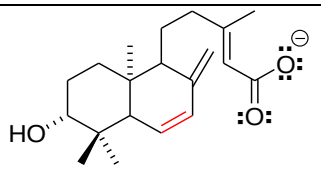
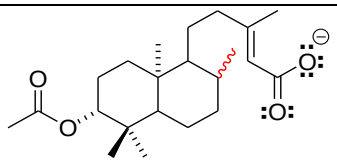
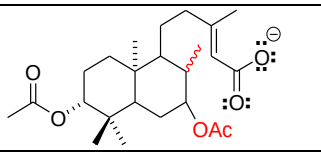


Figura 61: Proposta para a formação do íon produto de *m/z* 217

Tabela 20: Íons produtos obtidos na fragmentação dos produtos de biotransformação detectados nos extratos dos processos realizados com bactérias do trato gastrointestinal e estruturas químicas propostas.

T_R (min)	IES-MS (íon precursor)	IES-MS/MS	Estrutura química	Nome Químico	Bactérias
1.8	335	289 (100), 221 (61), 137 (72), 97 (33)		**A)** Ácido *ent*-3β,7-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico	*E. coli* em anaerobiose e aerobiose
2,3	333	123 (65), 99 (100), 97 (82)		**B)** Ácido *ent*-3-oxo,7-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico	*L. acidophilus* *E. coli*
2,8	377	217 (45) (**A**-AcOH), 97 (100)		**C)** Ácido *ent*-3β-acetoxi,7-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico	*E. coli*
2,9	319	217 (100), 189 (87), 97 (22)		**D)** Ácido *ent*-3β-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico	*B. longum* *Bifidobacterium* sp *E. coli* *L. rhamnosus* *L. acidophilus* *L. johnsonii* *L. acidophilus* ATCC53544
3.7	317	297 (41), 257 (51), 213 (90), 197 (53), 181 (75), 156 (73), 135 (100), 99 (56)		**E)** Ácido *ent*-3-oxo-labda-8(17),13-dieno-15-óico	*L. rhamnosus* *L. acidophilus* *L. johnsonii* *B. longum*
3.8	317	229 (21), 99 (100)		**F)** Ácido *ent*-3β-hidroxi-labda-6,8(17),13-trieno-15-óico	*B. longum* *L. acidophilus* ATCC53544
5,6	363	321 (45) (**A**-C_2H_2O), 303 (100) (**A**-AcOH), 99 (69), 91 (31)		**G)** Ácido *ent*-3β,7α-diidroxi-labda-13-eno-15-óico	*L. rhamnosus* *L. acidophilus* *L. johnsonii* *L. acidophilus* ATCC 53544 *Bifidobacterium* sp
6,0	421	361 (100) (**A**-AcOH), 319 (51) (**A**-AcOH-C_2H_2O), 301 (30) (**A**-AcOH-AcOH), 273, 217 (22), 99 (4), 97(5)		**H)** Ácido *ent*-3β,7-diacetoxi-labda-13-eno-15-óico	*L. acidophilus* *L. johnsonii* *B. longum* *L. acidophilus* ATCC53544

A = $[M-H]^-$

Os metabólitos ácido *ent*-3β,7-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (**A**) e ácido *ent*-3β-hidroxi-copálico identificados nas biotransformações com algumas bactérias foram isolados nos processos realizados com os fungos filamentosos, sendo codificadas anteriormente como **An15** e **Ab5**, respectivamente. As estruturas químicas destas substâncias foram identificadas por análises de RMN e confirmadas por espectrometria de massas de alta resolução (**Apêndices 30** e **5**, respectivamente).

A substância proposta codificada como **E** (*m/z* 317) já foi descrita anteriormente na literatura como ácido 3-oxo-anti-copálico isolada da oleorresina e galhos de *Pinus strobus* e *Pinus pumila* (Zinkel & Magee, 1987; Shpatov, *et al*., 2013). No entanto, a maioria das estruturas químicas propostas para as substâncias detectadas nos processos de biotransformação com as bactérias não foram descritas na literatura, exceto as substâncias **A** e **E**.

A bactéria *E. coli* foi o único micro-organismo que produziu metabólitos diferentes considerando os produtos de biotransformação obtidos com as demais bactérias.

4.5 Avaliação do potencial citotóxico do ácido 3β-acetoxi-copálico e dos metabólitos obtidos nos processos de biotransformação

Há poucos relatos de estudos citotóxicos de oleorresinas de espécies de *Copaifera* que são utilizadas pela população com fins terapêuticos. Assim, são necessárias maiores investigações nesse âmbito.

Sobre os efeitos citotóxicos da oleorresina de *Copaifera*, Leandro e colaboradores (2012) reportaram atividades mutagênica e citotóxica da oleorresina de Copaíba e de substâncias majoritárias, assim como Lotufo e colaboradores (2002) que também avaliaram os efeitos do diterpeno ácido caurenóico, isolado da oleorresina de *C. langsdorffii*, em embriões de ouriço do mar, o potencial hemolítico desta substância em eritrócitos humanos e de camundongos e utilizando o teste MTT verificaram a inibição do crescimento de células

tumorais das linhagens MCF-7 (câncer de mama), HCT-8 (câncer de cólon) e CEM (leucemia) apresentando um potencial efeito citotóxico, porém inespecífico.

Diferentemente dos autores anteriormente citados Almeida e colaboradores (2012) em seus estudos *in vivo* realizaram o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de camundongos, concluindo que a oleorresina e as frações voláteis e resinosa não apresentaram efeitos genotóxicos ou mutagênicos.

Em nossos estudos utilizando o ensaio de citotoxidade XTT (**Tabela 21**), o ácido 3β-acetoxi-copálico apresentou efeito citotóxico na concentração de 245,6 µM frente a linhagem normal e na concentração de 179,9 µM frente a célula tumoral MCF-7 com índice de seletividade de 1,36. De acordo com Suffness & Pezzuto (1991), considera-se significativo um índice de seletividade maior ou igual a 2,0, ou seja, onde a substância testada é duas vezes mais citotóxica para a linhagem de células tumorais do que para as células normais.

O metabólito **Ab5**, identificado como ácido 3β-hidróxi-copálico, produzido na biotransformação, apresentou CI_{50} de 317,6 µM frente a linhagem normal e de 494,9 µM frente a célula tumoral, apresentando menor atividade citotóxica que o ácido 3β-acetoxi-copálico. Considerando as linhagens avaliadas, o ácido 3β-hidróxi-copálico apresentou maior efeito citotóxico frente a linhagem normal (MCF-10A).

Corroborando com os resultados obtidos, nos estudos realizados *in vitro* em linfócitos normais humanos e em linhagens tumorais de câncer gástrico (AGP-01), cólon retal (HCT116), mama (MCF-07), ovário (NIHOVCAR), melanoma (SKAMELL-4) e glioblastoma humano (SF-295), Vargas e colaboradores (2015) concluíram que seis diterpenos ácidos (os ácidos copálico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico, hardwickiico, colávico-15-metil éster e caurenóico) isolados de oleorresina de *Copaifera* sp., não apresentaram efeitos citotóxicos frente a linhagem celular normal e as células tumorais testadas em concentrações únicas de 20 µM. Os diterpenos também não ocasionaram alterações significativas na viabilidade celular.

Masson-Meyers (2013) verificaram a viabilidade celular e a proliferação de células 3T3 na presença de oleorresina de *C. langsdorffii* em concentrações acima de 100µg/mL e concluíram que as células permaneceram viáveis.

Vargas e colaboradores (2015) também realizaram ensaios com a linhagem de fibroblastos 3T3L1 e observaram que os diterpeno majoritários da oleorresina de *Copaifera* testados na concentração de 5 mg/mL não apresentaram redução significativa na viabilidade dessas células em comparação com o grupo contendo células não tratadas, após o período de 24 horas.

Vargas e colaboradores (2015) também relataram que frente a linhagem AGP01 os ácidos 3-hidróxi-copálico e 3-acetoxi-copálico apresentaram citotoxidade. Para as linhagens HCT-116 e NIHOVCAR apenas o ácido 3-acetoxi-copálico foi citotóxico. Quanto a linhagem SF-295, esta mostrou-se a mais sensível, na qual os diterpeno ácidos 3-hidróxi-copálico e 3-acetóxi-copálico apresentaram citotoxidade em torno de 20 %. Os diterpeno avaliados não foram citotóxicos para as linhagens MCF-07 e SKAMELL 4.

Os resultados obtidos nos ensaios do XTT apresentados na **Tabela 21** demonstraram que apenas o metabólito **An16** não apresentou atividade citotóxica frente as linhagens avaliadas nas concentrações testadas.

Entre os produtos das biotransformações avaliados o metabólito **Ce9** foi o mais ativo para a linhagem tumoral (MCF-7) e apresentou índice de seletividade de 1,18, apresentando assim maior toxicidade frente as células cancerígenas. O que apresentou menor efeito tóxico as células normais, mas com atividade frente a linhagem tumoral foi o metabolito **An17** com IS de 1,02.

As substâncias **An15**, **An16**, **An17** e **An18** produzidas por *A. niger* foram as que apresentaram menor atividade citotóxica frente as linhagens avaliadas e as que apresentaram maior citotoxidade a linhagem normal foram o ácido 3β-acetoxi-copálico e os metabólitos**Ab5** e **Ce9**.

As substâncias **Ab5**, **Ce12**, **An15** e **Cl24** apresentaram maior citotoxidade frente a linhagem normal do que frente a linhagem tumoral, como podemos observar na **Tabela 21** com os valores do índice de seletividade. Não foi possível calcular o IS do metabólito **An16**, pois esta substância não apresentou atividade citotóxica nas concentrações avaliadas.

Todos os metabólitos do ácido 3β-acetoxi-copálico obtidos por biotransformação apresentaram menor citotoxidade frente as linhagens avaliadas do que o próprio substrato.

Tabela 21: Valores de CI_{50} e IS obtidos para o ácido 3β-acetoxi-copálico e seus metabólitos frente as linhagens celulares normais e tumorais

Substâncias	CI_{50} (µM)		Índice de seletividade (IS)
	MCF-10A (Linhagem normal)	**MCF-7** (Linhagem tumoral)	**MCF-7**
Ácido 3β-acetoxi-copálico (Substrato)	245,6 ±2,1	179,9 ±2,0	1,36
Ácido *ent*-3β-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (An5)	317,6 ±2,3	494,9 ±2,1	0,64
Ácido *ent*-3β-acetoxi,6,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico (Ce9)	363,9 ±2,0	307,3 ±1,5	1,18
Ácido *ent*-3β-acetoxi,7,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico (Ce12)	823,2 ±1,2	1149,3 ±3,1	0,71
Ácido *ent*-3β,7α-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (An15)	2346,9 ±2,3	2544,1 ±3,6	0,92
Ácido *ent*-3β,6-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (An16)	>2974,2	>2974,2	-
Ácido *ent*-3β,13-diidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico (An17)	2696,8 ±2,8	2626,8±2,9	1,03
Ácido *ent*-3β-acetoxi,1-hidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (An18)	2247,5 ±4,5	2097,6±5,0	1,07
Ácido *ent*-3β-acetoxi,13-hidroxi-labda-8(17)-eno-15-óico (Ap23)	616,2±3,1	476,5±2,2	1,29
Ácido *ent*-3β,18-diidroxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (Cl24)	1397,9±2,3	1746,4±2,4	0,80

4.6 Avaliação dos processos de biotransformação do β cariofileno

Nas triagens anteriormente realizadas com o β-cariofileno com todos os micro-organismos não foram detectados o substrato nos controles e também nenhum produto de biotransformação. Por isso, experimentos foram realizados com uma maior concentração do substrato a fim de verificar se a não detecção tinha como causa a baixa concentração do próprio substrato para captação por microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace.

O aumento da concentração do substrato possibilitou a detecção do mesmo em todas as análises realizadas no modo headspace em altas concentrações, mas nenhum metabólito foi detectado.

O monitoramento dos perfis químicos visando avaliar a influência do tempo de incubação nos processos de biotransformação foi de 5 dias para os fungos filamentosos e de 6, 12 e 24 horas para as bactérias, após a adição do substrato. As análises foram realizadas por GC/MS.

Não foram detectados produtos de biotransformação do β-cariofileno com as bactérias quando os perfis das amostras foram comparados com os perfis dos controles.

Com relação aos processos realizados com os fungos filamentosos, possíveis produtos de biotransformação foram detectados em concentrações significativas nos extratos brutos hexânicos obtidos por partição líquido-líquido dos caldos das culturas. Nos extratos obtidos em acetato de etila não foram detectados o substrato e possíveis produtos de biotransformação.

4.6.1 Biotransformação do β cariofileno pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*

No extrato obtido da cultura controle do β-cariofileno no meio de cultivo (Koch's K1) sem o micro-organismo observou-se um aumento na concentração do óxido de cariofileno e diminuição da concentração do β cariofileno, o que também foi evidenciado nos perfis dos

extratos obtidos dos experimentos de biotransformação. Nos micélios também foram detectadas as duas substâncias, porém o β-cariofileno foi detectado em maior concentração (**Figura 62**). O óxido de cariofileno também é detectado no padrão utilizado, pois é formado a partir da oxidação da ligação dupla do β-cariofileno.

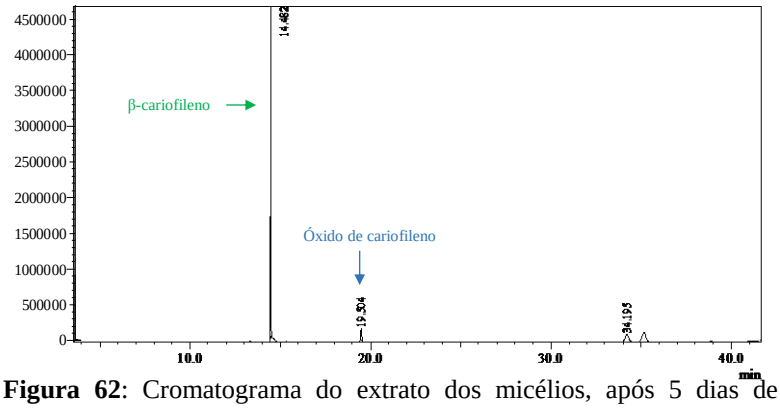


Figura 62: Cromatograma do extrato dos micélios, após 5 dias de biotransformação do **β cariofileno** obtido por GC-MS

Os perfis cromatográficos obtidos dos extratos dos processos de biotransformação do 1° ao 5° dia são similares, sendo possível detectar possíveis metabólitos indicados na **Figura 63 B** por setas vermelhas**.** Os espectros de massas obtidos dos metabólitos e do substrato são diferentes entre si, porém as bibliotecas Wiley e NIST identificam todos os metabólitos com os tempos de retenção diferentes como sendo β-cariofileno ou óxido de cariofileno, devido a similaridade entre os espectros de massas. A comparação com os controles propicia sugerir que o que não foi detectado nos controles são produtos de biotransformação. Na tentativa de diferenciar melhor os sinais dos espectros de massas mudou-se a energia de ionização de 70eV para 50eV, 35eV e 20eV, mas os espectros obtidos foram similares.

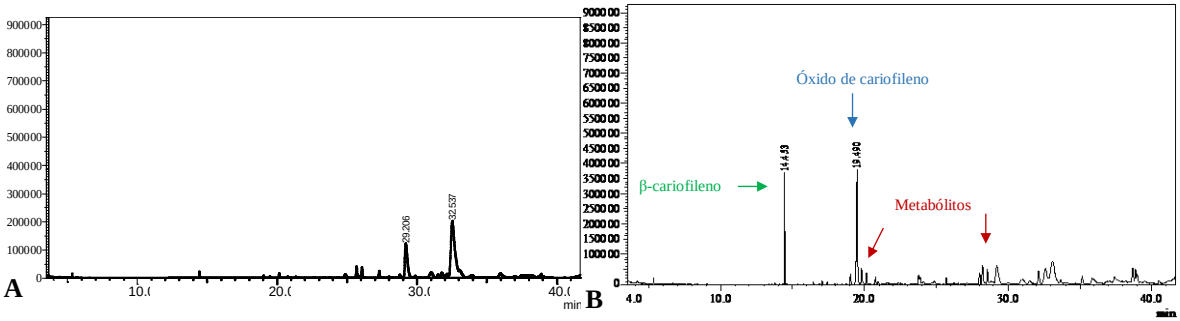


Figura 63: Cromatogramas dos extratos n-hexânicos, obtidos por GC-MS após 5 dias da adição do substrato; **A)** Cromatograma do extrato controle (etanol); **B)** Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno.

4.6.2 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 9245)

As substâncias majoritárias detectadas no perfil cromatográfico da amostra obtida no modo headspace da cultura de biotransformação do β cariofileno por *C. echinulata* var. *elegans* corresponderam pelas análises de seus espectros de massas ao β-cariofileno e ao óxido de cariofileno (**Figuras 64)** e o perfil é similar ao obtido do extrato do controle do substrato com o meio fermentativo (**Figura 65B**).

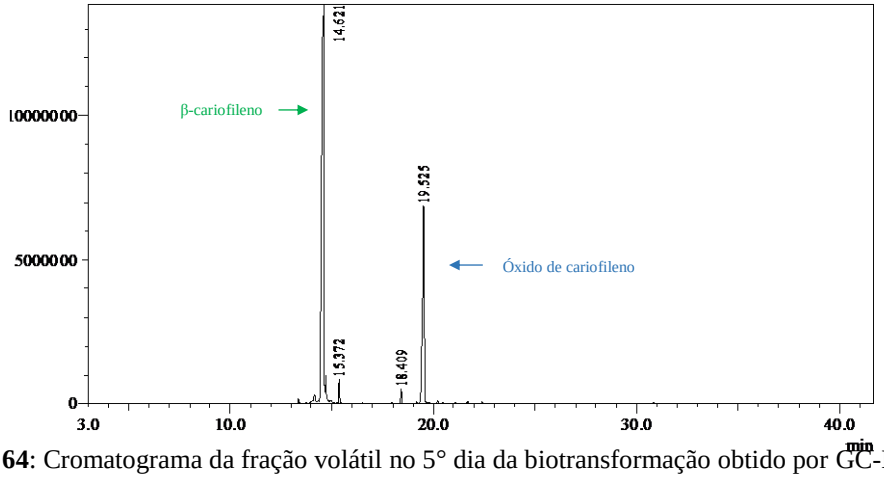


Figura 64: Cromatograma da fração volátil no 5° dia da biotransformação obtido por GC-MS

Considerando as elevadas concentrações de β-cariofileno e de óxido de cariofileno detectadas nas análises realizadas por GC-MS após a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace das amostras de biotransformação e controle, pode-se sugerir que grande parte

do substrato de interesse não encontra-se em solução no caldo da cultura. Este fato evidencia que o contato do substrato com o micro-organismo é baixo, o que dificulta a obtenção de produtos de biotransformação com bons rendimentos para o isolamento dos produtos.

Embora o isolamento não seja possível, observa-se pelas análises que o fungo *C. echinulata* ATCC 9245 produziu 6 metabólitos majoritários, sendo esses identificados na biblioteca como sendo todos óxido de cariofileno devido à grande similaridade entre os espectros de massas.

Nos espectros obtidos que estão apresentados na **Figura 66** podemos observar que há uma grande semelhança entre eles, mas apresentam íons moleculares diferentes. Foi modificada a energia de ionização tentando aumentar a intensidade desses íons, mas nos espectros obtidos não houve alteração. Estas análises sugerem que as substâncias formadas devam ser bem semelhantes.

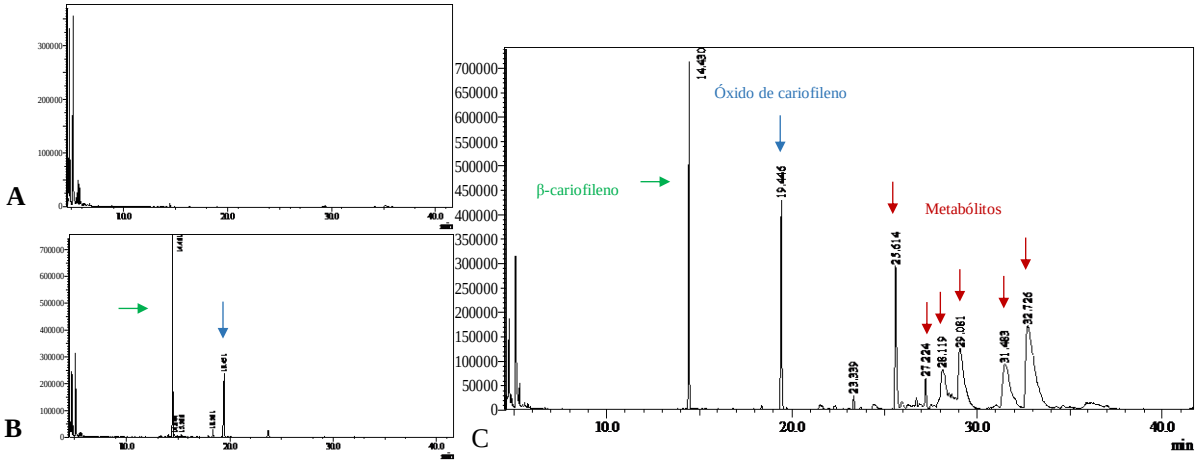


Figura 65: Cromatogramas dos extratos n-hexânicos obtidos por GC-MS após 3 dias da adição do substrato; **A)** Cromatograma do extrato controle (etanol); **B)** Cromatograma do extrato do controle do β-cariofileno com o meio de cultura (Koch's 1); **C)** Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno

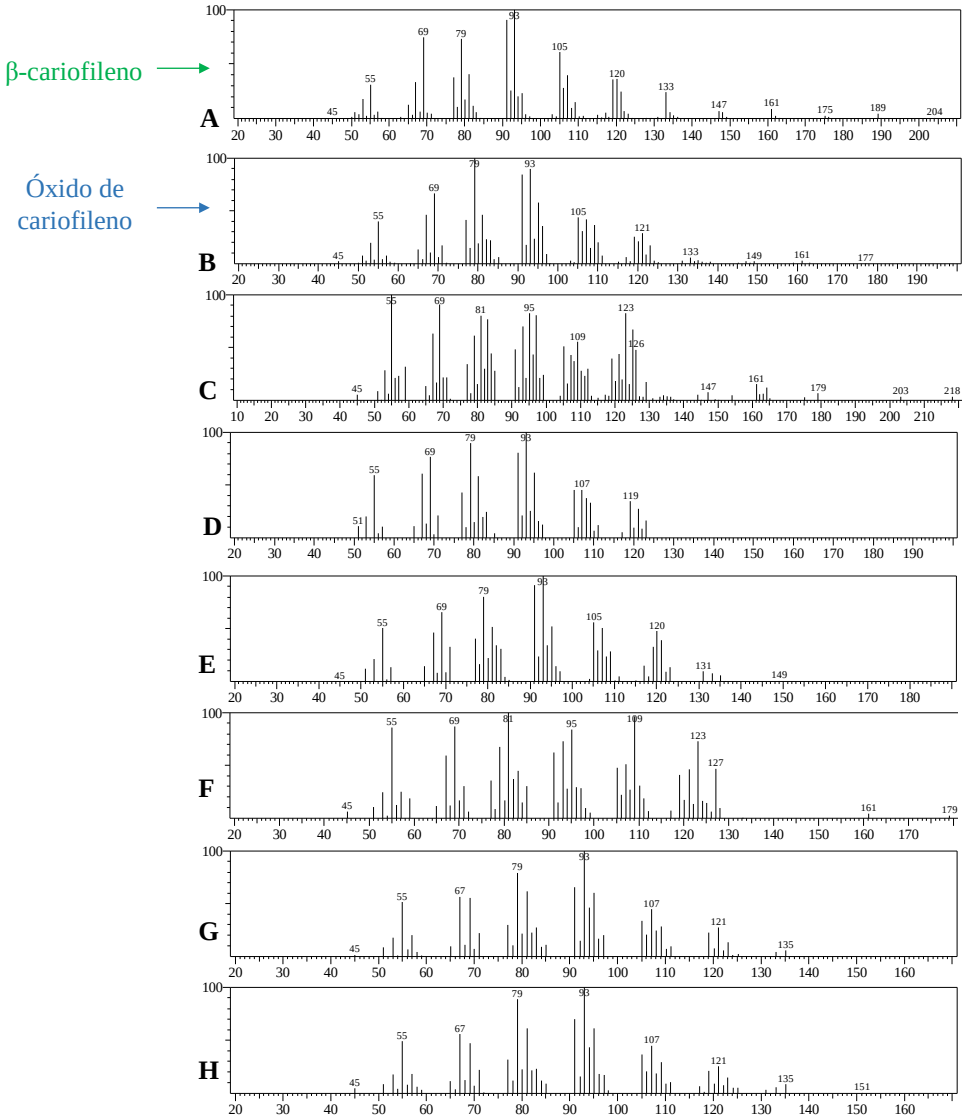
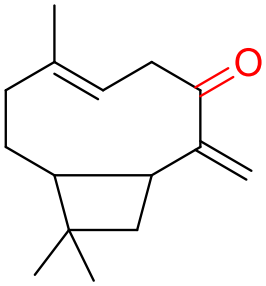


Figura 66: Espectros de massas das substâncias majoritárias da figura 65C. A) T_R=14,4; B) T_R=19,4; C) T_R= 25,6; D) T_R= 27,2; E) T_R= 28,1; F) T_R= 29,1; G) T_R= 31,5; H) T_R= 32,7 minutos.

Com o auxílio do Prof. Dr. Antônio Eduardo, com os dados obtidos foi possível apenas elaborar uma proposta para o produto de biotransformação de massa molecular 218, oriundo da biotransformação com *C echinulata* 9245. A estrutura química proposta para este produto está apresentada na **Figura 67** e as propostas para a formação de alguns íons fragmentos estão apresentadas na figura **Figura 68**.



Fórmula Molecular: $C_{15}H_{22}O$

Tempo de retenção (HPLC-CAD): 25,6 min.

Figura 67: Substância proposta do metabólito majoritário da biotransformação com β-cariofileno

Na **Figura 68** estão as propostas para a formação de alguns íons fragmentos que foram observados em seu espectro.

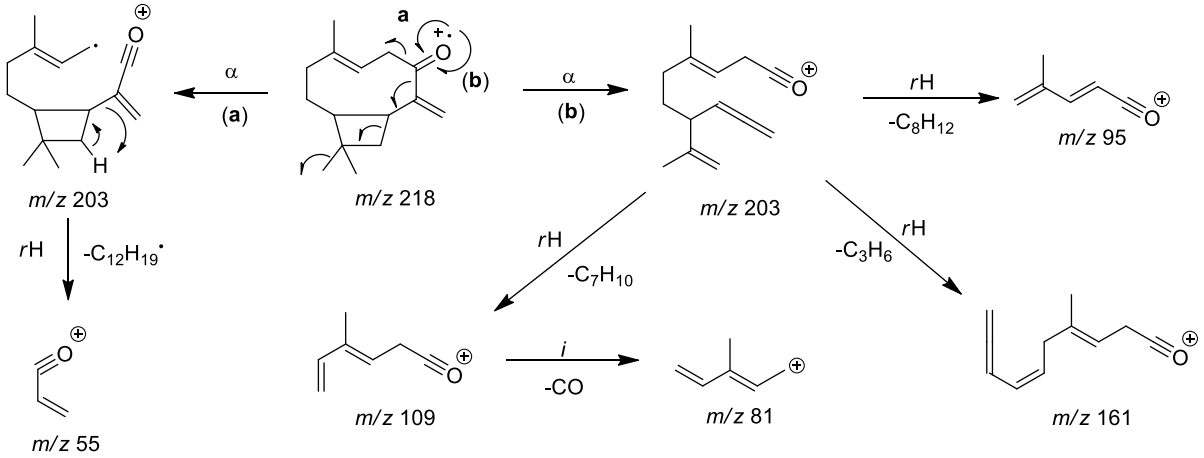


Figura 68: Proposta para a formação dos íons de *m/z* 109, *m/z* 81, *m/z* 95 a partir do íon molecular de *m/z* 218 (T_R 25,6 minutos)

4.6.3 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella elegans* (ATCC 10028b)

Na biotransformação do β-cariofileno com *C. elegans* ATCC 10028b foram detectados 6 metabólitos com T_R iguais aos observados na biotransformação com *C. echinulata* var. *elegans* ATCC 9245. Entretanto, esses produtos apresentam concentrações diferentes, sendo as substâncias majoritárias com T_R de aproximadamente 32,7 e 27,2 minutos. Dois metabólitos

diferentes ao processo anterior foram também detectados com tempos de retenção de aproximadamente 18,4 e 26,7 minutos.

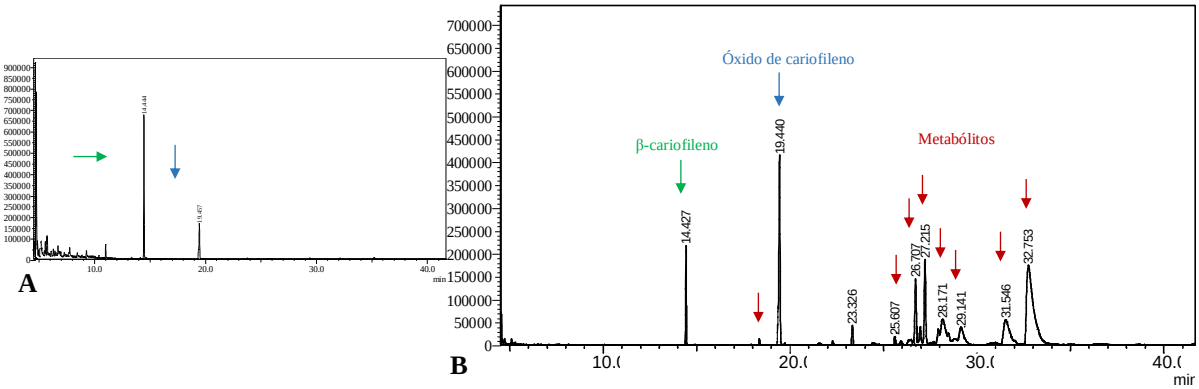


Figura 69: Cromatogramas dos extratos n-hexânicos obtidos por GC-MS após 4 dias da adição do substrato;

A) Cromatograma do extrato do controle do β-cariofileno com o meio de cultura (Koch's K1);

B) Cromatograma do extrato da biotransformação do β-cariofileno.

Os oito metabólitos detectados e apresentados na **Figura 69** foram identificados pelas bibliotecas, com base nos espectros de massas, como sendo óxido de cariofileno. As substâncias produzidas diferentes das demais da biotransformação com *C. echinulata* ATCC 9245 com T_R de 18,4 e 26,7 minutos apresentam espectro de massas com íons moleculares diferentes dos metabólitos anteriormente formados (**Figura 70**).

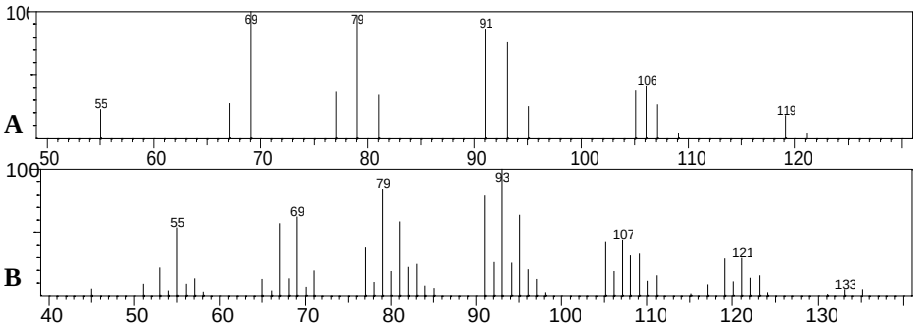


Figura 70: Espectros de massas. **A)** T_R de 18,4 minutos; **B)** T_R de 26,7 minutos.

Na análise da fração volátil captada no 2° dia de biotransformação foi detectada alta concentração do substrato e um possível metabólito com T_R de aproximadamente 18,4 minutos, identificado pelo espectro de massas como sendo óxido de cariofileno. No cromatograma do

extrato, obtido por partição líquido-líquido, no T_R de 18,4 foi observado esse metabólito como minoritário, apresentando concentração maior na fração volátil (**Figura 71**).

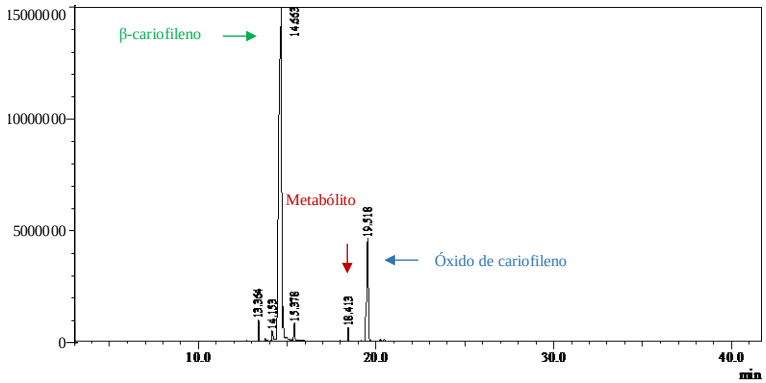


Figura 71: Cromatograma da fração volátil no 2° dia da biotransformação obtido por GC-MS

4.6.4 Biotransformação do β cariofileno por *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 8688A)

Na triagem da biotransformação do β cariofileno com *C. echinulata* realizada por 5 dias foram detectados 7 metabólitos (**Figura 72**). O metabólito majoritário com T_R de aproximadamente 16,6 minutos foi identificado pela biblioteca como sendo β-cariofileno, mas seu espectro de massas (**Figura 73**) é diferente do espectro obtido do substrato. Os demais metabólitos foram identificados como óxido de cariofileno pela semelhança entre os espectros de massas.

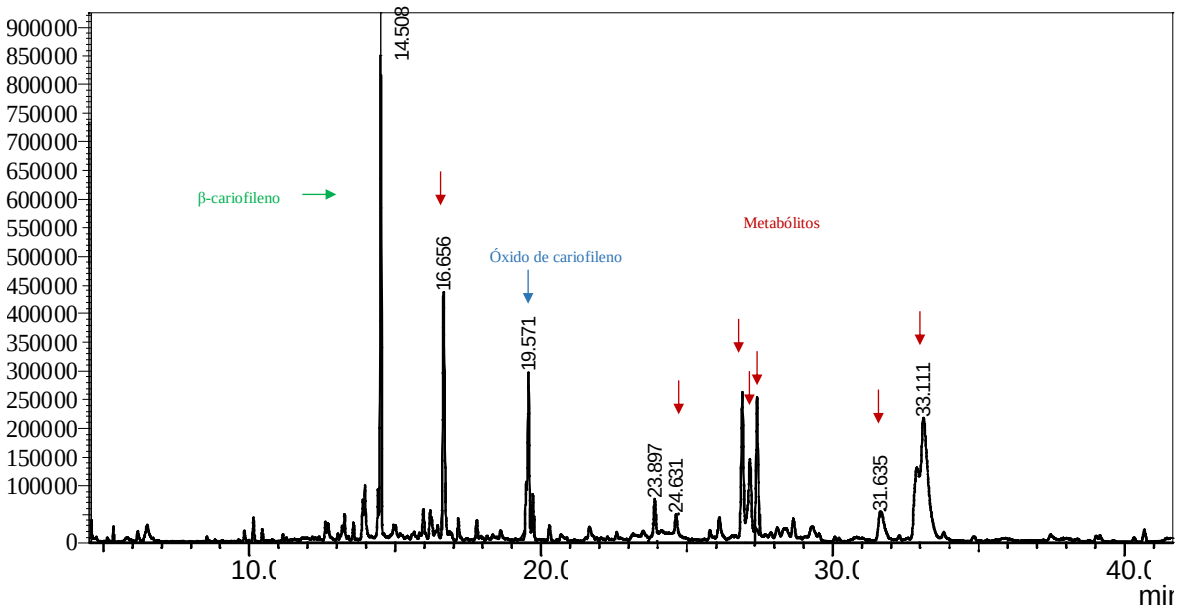


Figura 72: Cromatograma do extrato n-hexânico da biotransformação do β-cariofileno, após 5 dias da adição do substrato, obtido por GC-MS.

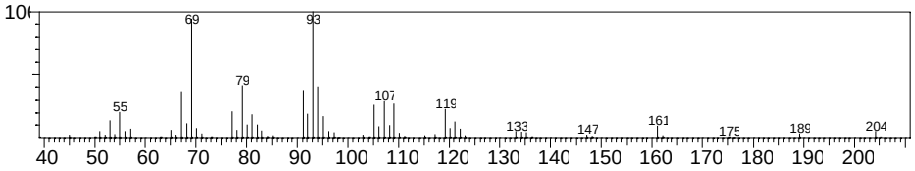


Figura 73: Espectro de massas do produtos de biotransformação com tempo de retenção de 16,6 minutos.

Nas frações voláteis (**Figura 74**) foram detectados o β-cariofileno e o metabólito com Tr de 18,4 minutos que não foi observado nos extratos n-hexânico e acetato de etila obtidos posteriormente por partição líquido-líquido.

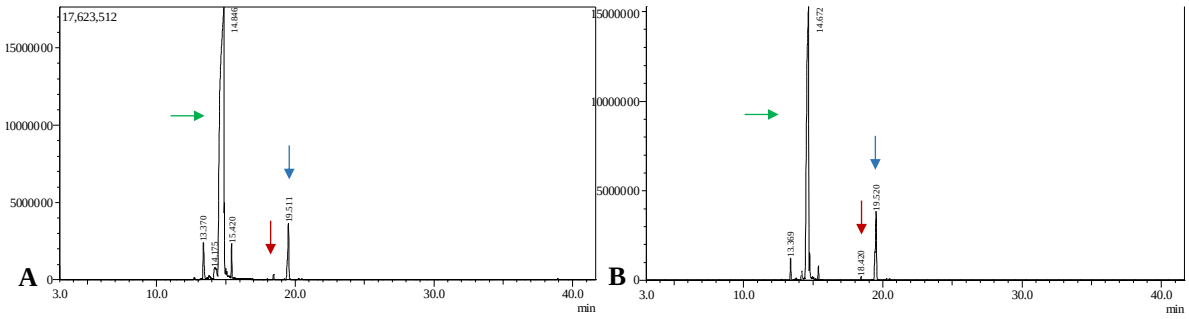


Figura 74: Cromatogramas das frações voláteis da biotransformação do β-cariofileno por *C. echinulata* . **A)** 1° dia, **B)** 2° dia

4.6.5 Biotransformação por *Aspergillus niger*

O fungo *A. niger* biotransformou o β-cariofileno, no período de cinco dias da triagem, em 3 metabólitos majoritários (**Figura 74**) que pelas bibliotecas devido a semelhança entre os espectros de massas foram identificados como óxido de cariofileno.

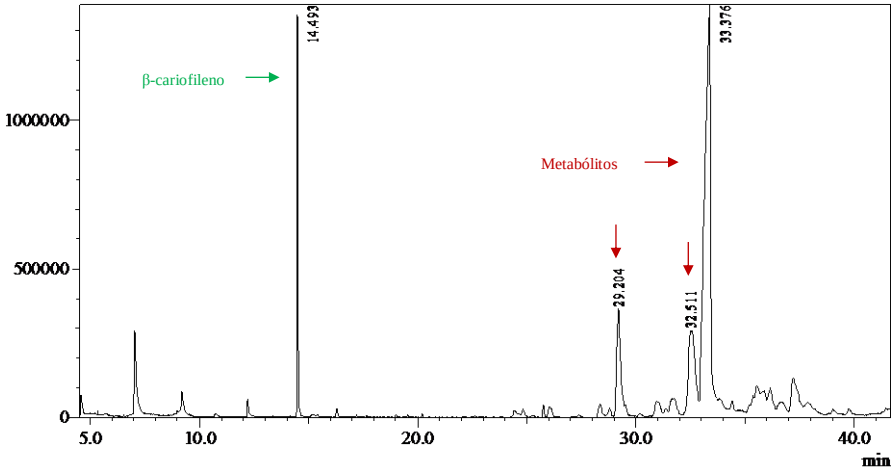


Figura 75: Cromatograma do extrato em acetato de etila da biotransformação do β-cariofileno, no 1° dia do processo, obtido por GC-MS

Na fração volátil podemos observar mais um metabólito com T_R muito próximo ao do substrato (**Figura76 B**). As bibliotecas disponíveis identificam esse metabólito também como β-cariofileno. Esse metabólito não foi detectado nos extratos hexânico e acetato de etila obtidos das amostras monitoradas por cinco dias.

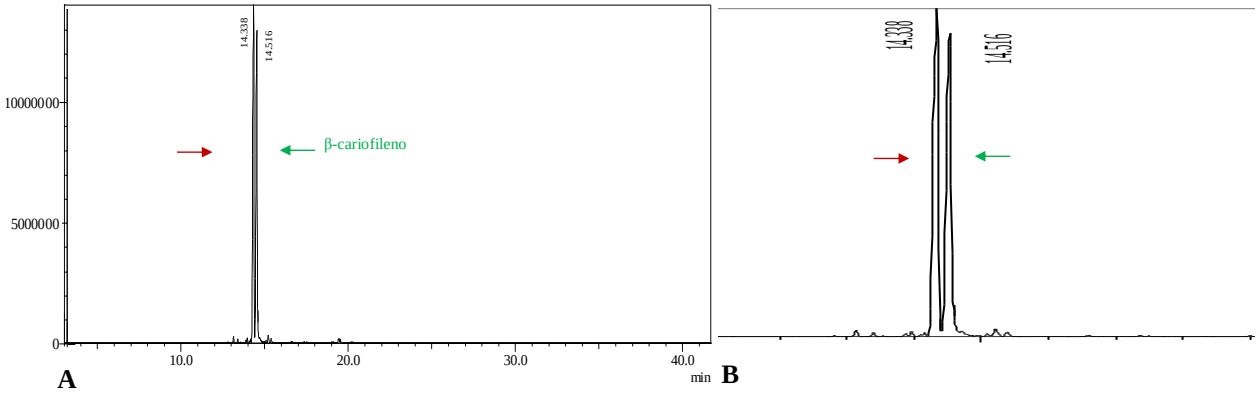


Figura 76: Cromatograma da fração volátil da biotransformação do β-cariofileno no 5° dia, obtido por GC-MS. **A)** Cromatograma completo; **B)** Ampliação do cromatograma nos picos majoritários

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os processos realizados utilizando cromatografia líquida sob pressão reduzida foram eficientes e propiciaram o isolamento do ácido 3β-acetoxi-copálico após uma etapa de purificação.

Foi possível estabelecer as condições de cultivo e a padronização do crescimento dos micro-organismos, o que possibilitou a adição dos terpenos estudados na fase estacionária de crescimento.

Os ensaios de concentração inibitória mínima permitiram a utilização das concentrações máximas dos substratos, sem comprometer a viabilidade dos micro-organismos.

As reações ocorridas com o diterpeno foram influenciadas pelo meio de cultura, pois as mesmas bactérias não produziram os metabólitos quando modificado o meio fermentativo utilizado nos processos. A ampliação da concentração do inóculo também influenciou essas reações promovendo um aumento da concentração dos produtos de biotransformação.

Nos estudos de biotransformações com o ácido 3β-acetoxi-copálico todos os micro-organismos foram capazes de biotransformar o diterpeno, já com o β-cariofileno apenas os fungos filamentosos, demonstrando assim que as bactérias do trato gastrointestinal e os fungos filamentosos utilizados são promissores em promover reações em terpenos.

Nos processos de biotransformações também foram observadas semelhanças nas atividades enzimáticas produzidas por bactérias e fungos filamentosos.

As análises realizadas por GC-MS dos extratos advindos dos processos realizados com o β-cariofileno não possibilitaram a identificação dos metabólitos produzidos nas reações por comparação com os dados das bibliotecas disponíveis.

Em todos os processos utilizando as bactérias do trato gastrointestinal realizados com o diterpeno foram detectados metabólitos com baixos rendimentos, não sendo possível o isolamento e com o sesquiterpeno não se obteve sucesso, pois a maior parte do substrato foi

detectada na fração volátil das culturas. Esses resultados demonstram que as ferramentas analíticas utilizadas precisam ser aperfeiçoadas para possibilitar a identificação de produtos de biotransformação produzidos com baixos rendimentos.

Na avaliação da atividade citotóxica frente as linhagens celulares de glândulas mamárias normais e de adenocarcinoma mamário realizadas com os nove metabólitos isolados, dos quais seis não foram descritos na literatura até o momento, sendo todos advindos dos processos do ácido 3β-acetoxi-copálico com os fungos filamentosos, todos esses produtos não apresentaram toxicidade frente as células de mamíferos testados, apresentando menor citotoxidade do que o próprio substrato.

Esses estudos de transformações microbianas são importantes para a predição do metabolismo de xenobióticos e para a obtenção de derivados com potencial atividade biológica.

Referências

6 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.

ABRAHAM, W.R.; ERNST, L.; STUMPF, B. Biotransformation of caryophyllene by *Diplodia gossypina*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 115-120, 1990.

ABRAHAM, W.R.; W.R.; ERNST, L.; ARFMANN, H.A. Rearranged caryophyllenes by biotransformation with *Chaetomium cochliodes*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 757-763, 1990.

AKIHISA, T.; HAMASAKI, Y.;TOKUDA, H.; UKIYA, M.KIMURA,Y., NISHINO, H. Microbial transformation of isosteviol and inhibitory effects on *Epstein-barr* virus activation of the transformation products. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 407-410, 2004.

ACIKGÖZ, A.; GIRI, S.; BADER, A. Detection of nanolevel drug metabolites in an organotypic culture of primary human hepatocytes and porcine hepatocytes with special reference to a two-compartment model. **Internacional Journal of Nanomedicine**, 7, p. 5859-5872, 2012.

ACIKGÖZ, A.; KARIM, N.; GIRI, S.; SCHMIDT-HECK, W.; BADER, A. Two compartment model of diazepam biotransformation in an organotypical culture of primary human hepatocytes. **Toxicology and applied pharmacology**, 243, p.179-191, 2009.

ADAMUSIAK, R.K.; STRUB,D.; LOCHYNSKI, S. Application of microorganisms towards synthesis of chiral terpenoid derivatives. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 95, p. 1427-1436, 2012.

AGUIAR JCD, SANTIAGO GMP, LAVOR PL, VERAS HNH, FERREIRA YS, LIMA MAA. Chemical Constituents and Larvicidal Activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1977-1980, 2010.

ALMEIDA, M.R.; DARIN, J.D.C.; HERNANDES, L.C.; RAMOS, M.F.S. ANTUNES, L.M.G.; FREITAS, O. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, 664-672, 2012.

ANDRESEN, H.; AUGUSTIN, C.; STREICHERT, T. Toxicogenetics - cytochrome P450 microarray analysis in forensic cases focusing morphine/codeine and diazepam. **Internacional Journal of Medicine**, 127(2), p. 395-404, 2013.

ARANDA, G.; KORTBI, M.S.E.; LALLEMAND, J.Y. Microbial transformation of diterpenes: hydroxylation of sclareol, manool and derivatives by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 47, p. 8339-8350, 1991.

ASAKAWA, Y.; ISHIDA, T.; TOYOTA, M.; TAKEMOTO, T. Terpenoid biotransformation in mammals IV Biotransformation of (+)-longifolene, (-)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)-dehydroabietic acid in rabbits. **Xenobiotica**, v. 16, p.753-767, 1986.

ASHA S.; VIDYAVATHI M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, 27, p. 16-29, 2009.

BALUNAS, MJ; KINGHORN, AD. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARTH, T., CONTI, R.; PUPO, M.T.; OKANO, L.T.; BONATO, P.S. Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-Odesmethyl donepezil in culture medium: application to fungal Biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 257-266, 2012.

BARREIRO, E.J.; SILVA, J.F.M. FRAGA, C.A.M. Noções básicas do metabolism de fármacos. **Quimica Nova**, v. 19, p. 641-650, 1996.

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.

BHATTI, H.N.; KHERA, R.A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, p 70-104, 2014.

BOHLMANN,F. KNOLL, K.H.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Neue α-santalen- und labdan-derivate. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1997-2002, 1979.

BRAUN, B.; BREITENBACH, H. Strukturauflärung einer neuen diterpensäure aus metasequoia glyptostroboides mit hilfe der ^{13}C NMR Spektroskopie, **Tetrahedron**, v. 33, p.145-150, 1977.

CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology advances**, v. 24, p. 134-142, 2006.

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

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO L.V.; MORAES M.O.; BURBANO R.R.;. SILVEIRA E.R; CUNHA K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. V. 5, p. 37–40, 2002.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; MCLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; COOK, M.B.; QUENZER, V.K; FERGUSON, R.M. GILMAN, R.H. Rapid, Low-Technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis i*solates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.362-366, 1998.

CANDEIAS, L.P.; MACFARLANE, D.P.S; MCWHINNIE, S.L.W.; MAIDWELL, N.L.; ROESCHLAUB, C.A.; SAMMES, P.G.; WHITTLESEY, R. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 2333-2334, 1998.

COLLINS, L.; FRANZBLAU, S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p. 1004-1009, 1997.

CHARNEY, W.; HERZOG, H.L. Microbial transformation of steroids: a handbook. New York: Academic Press, 1967.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal Dairy Technology**, v. 51, p. 123-136, 1998.

CHOU, B. H.; YANG, L. M.; CHANG, S.F.; HSU, F.L.; LO, C.H.; LIAW, J.H.; LIU, P.C.; LIN. S.J. Microbial transformation of isosteviol lactone and evaluation of the trnaformation products on androgen response. **Journal Natural Products**, 71, 602-607, 2008.

CHOU, B. H.; YANG, L. M.; CHANG, S.F.; HSU, F.L.; LO, C.H.; LIN, W.K; WANG, L.H; LIU, P.C.; LIN. S.J. Fungal transformation of isosteviol lactone and its biological evaluation for inhibiting the AP-1 transcription fator. **Phytochemistry**, 70, 759-764, 2009.

CHOU, B. H.; YANG, L. M.; CHANG, S.F.; HSU, F.L.; WANG, L.H; LIN, W.K., LIU, P.C.; LIN. S.J. Transformation of isosterol lactam by fungi and the suppressive effects of its transformed products on LPS-induced iNOS expression in macrophages. **Journal Natural Products**, v. 74, p.1379-1385, 2011.

CLAVEL, T.; BORRMANNA, D.; BRAUNEA, A.; DORE, J.; BLAUT, M. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. **Anaerobe**, v.12, p. 140-147, 2006.

COSTA, F.B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspillioides* with trypanomicidal activity. **Planta Medica**, v. 62, p. 557-559, 1996.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. approved standard CLSI document M38-A, v.22, n.16. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, 2005.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-A6, v.23, n.2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2005.

CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. M11-A8, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

DAVIS, B.G., BOYER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. **Natural Products Reports**, v. 18, 618–640, 2001.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, 2ª. West Sussex, Inglaterra, John Wiley & Sons, 2002.

DI SOTTO A, MAZZANTI G, CARBONE F, HRELIA P AND MAFFEI F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v 699, p 23-28, 2010.

DING, W. J.; DENG, Y.; FENG, H.; LIU, 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 Gastroenterology**, v. 15, p.1518-1523, 2009.

DUKE, J. A. Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities, *CRC Press: Boca Raton.*, 1992

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

ELIAS, B.C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M.T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum*. **Microbiology Research**, v. 161, p. 273-280, 2006.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry. Berlin, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 402, 1997.

FAIGLE, J. W. Drug Metabolism in the Colon Wall and Lumen. In: BIECK, P. R., ed. Colonic drug absorption and metabolism. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 29 - 54, 1993.

FARIAS, L.A.; FÁVARO, D.I.T. Vinte anos de qúimica verde: conquista e desafios. **Química Nova**, v. 34, p.1089-1093, 2011.

FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI,F. Terpenoids from *Copaifera langsdorfii*. **Phytochemistry**, v.10, p.905-907, 1971.

FINKELSTEIN, D.B.; BALL, C. Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. **Butterworth-Heinemann**, 2002.

FRANKEN NAP, RODERMOND HM, STAP J, HAVEMAN J, VAN BREE C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.

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

GADEN-JUNIOR, E.L. Fermentation process kinects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, p 629-635, 2000.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 175-199, 2001.

GONÇALVES,C.C.S.; MARSAIOLI,A.J. Fatos e tendências da biocatálise. **Química nova**, v.36, p.1587-1590, 2013.

GUPTA, S.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from Bacillus subtilisRCK under solid-state fermentation using statistical approach. **Bioresource Technology**, v.99, p. 937-945, 2008.

HAHN, V.; SÜNWOLDT, K.; MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Two different primary oxidation mechanisms during biotransformation of thymol by gram-positive bacteria of the genera *Nocardia* and *Mycobacterium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1289-1297, 2013.

HANSON JR. Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v.21, p.785-793, 2004.

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

HANSON, J.R., 1992. The microbial transformation of diterpenoids. **Natural Products Reports** v. 9, p.139–152, 1992.

HARIDY, M.S.A.; AHMED, A.A.; DOE, M. Microbiological transformation of two labdane diterpenes, the main constituents ofMadiaspecies, by two fungi. **Phytochemistry**, v. 67, p.1455-1459, 2006.

HEGAZY, M.E.F.; MOHAMED, T.A.; ELSHAMY, A.I.; MOHAMED, A.E.H.A.; MAHALEL, U.A.; REDA, E.H.; SHAHEEN, A.M.; TAWFIK, W.A.; SHAHAT, A.A.; SHAMS, K.A.; ABDEL-AZIM, N.S.; HAMMOUDA, F.M. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p.17-33, 2015.

HENCH, P.S.; KENDALL, E.C.; SLOCUMB, C.H.; POLLEY, H.F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone:compound E and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. **Mayo Clinic Proc**, v. 24, p. 181-197, 1949.

HIRSCHMANN, G.S.; ASTUDILLO, L.; PALENZUELA, J.A. Biotransformation of solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 93-97, 2004.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 42, p. 320 – 323, 2006.

ISHIDA, T. Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant cultured cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p.569-590, 2005.

JACKSON, M.; KARWOSWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW, G.J.; TANAKA, S. K.; Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. **The journal of Antibiotics**, v. 46, p. 34-38, 1993

JACOBSON, M. Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents, *CRC Press: Boca Raton.*, 1990.

JAKUPOVIC, J., BARUAH, R.N.; BCHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H. New alicyclic dlterpenes and ent-labdanes from *Gutierre zia solbrigh*. **Tetrahedron**, v. 41, p. 4537-4544, 1985.

JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42 p. 228-240, 2013.

KANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M. J.; JABER, H.; NAKATSU, T. Vietnamese culinary herbs in the United States. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v.40, p. 2328-2332, 1992.

KAPER J.B, SPERANDIO V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v.73, p.3197–3209, 2005

KEELER, R. F.; TU A. T. Toxicological of Plant and Fungal Compounds. **Handbook of Natural Toxins**, *Marcel Dekker: Nova York*, p. 665, 1991.

KHAN AL, HUSSAIN J, HAMAYUN M, GILANI SA, AHMAD S, REHMAN G. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. **Molecules**, v.15, p. 1562-1577, 2010.

KIHAMPA, C.; NKUNYA, M.H.H.; JOSEPH, C.C.; MAGESA, S.M.; HASSANALI, A.; HEYDENREICH, M. Antimosquito and antimicrobial clerodanoids and a chlorobenzenoid from *Tessmannia* species. **Natural Product Communications**, v.5,p.175-178, 2010.

KIM, T.D.; LEE, J.Y.; CHO, B.J.; PARK, T.W.; KIM, C.J. The Analgesic and anti-inflammatory effects of 7-oxosandaracopimaric acid isolated from the roots of *Aralia cordata*. **Archives of Pharmacal Research**, v.33, p. 509-514, 2010.

KOUZI, S.A.; MCCHESNEY, J.D. Microbial models of mammalian metabolismo: fungal metabolismo of the diterpene sclareol by *Cunninghamella* species. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 483-490, 1991.

KUTRZEBA, L. M.; KARAMYAN, V. T.; SPETH, R. C.; WILLIAMSON, J. S.; ZJAWIONY, J. K. *In vitro* studies on metabolism of salvinorin A. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1078 -1084, 2009.

LAHTI, L.; SALONEN, A.; KEKKONEN, R.A.; SALOJÄRVI, J.; JALANKA-TUOVINEN, J.; PALVA, A.; OREŠIČ, M.; DE VOS, W.M. Associations between the human intestinal microbiota, Lactobacillus rhamnosus GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. **PeerJ**.v 26;p 1-32, 2013.

LAMM, A.S.; REYNOLDS, W.F.; REESE, P.B. Bioconversion of *Stemodia marítima* diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. elegans and *Phanerochaete chrysosporium*. **Phytochemistry**, v. 67, 1088-1093, 2006.

LEANDRO, L.M. ; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.S.C.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Review: Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from *Copaiba* (Copaiferaspp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LEHMAN, L.R.; STEWART, J.D. Filamentous Fungi: Potentially Useful Catalysts for the Biohydroxylations of Non-Activated Carbon Centers. **Current Organic Chemistry**, 5, 439-470 439, 2001.

LERESCHE, J.E.; MEYER, H.P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Org. Proc. Res. Dev**., v. 10, p. 572-580, 2006.

LIMA NETO, J. S; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova***;* v.31, p. 1078-1080, 2008.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

LIN, S.J.; ROSAZZA, J.P.N.; Microbial transformations of isocupressic acid. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 922-926, 1998.

LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.;VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA,C.; MORAES, M.O. SILVEIRA, E.R.; GRAMOS, N.V. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, aditerpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAHATO, S.B.; MAJUMDAR, I. Current trends in microbial steroid biotransformation. **Phytochemistry**, v. 34, p. 883-898, 1993.

MARQUINA, S.; PARRA, J.L.; GONZÁLEZ, M.; ZAMILPA, A.; ESCALANTE, J.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; ÁLVAREZ,L. Hydroxylation of the diterpenesent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, 70 2017-2022, 2009.

MARTÍNEZ, M.R.; MEDINA, F.G; MARRERO, J.G.; ROBLES, S.O. Biotransformation of diterpenes. **RSC Advances**, 4, 10627-10647, 2014.

MASSON-MEYERS, D.S.; ANDRADE, T.A,M.;, LEITE, S.N.; FRADE, M.A.C. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**. v. 3, p.10-20, 2013.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.D. Drug design based on natural products. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; NICOLAUS, B.; POLI, A. ORLANDO, P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v.18, p.280-285, 2012.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The Isolation and in vivo Potent Antitumor Activity of Clerodane Diterpenoid from the Oleoresin of the Brazilian Medicinal Plant, *Copaifera langsdorfii* Desfon. *Bioorganic & Medicinal* **Chemistry Letters**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

LENNERNAS H.; ABRAHAMSSON B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.273–285, 2005.

QI-HE, C., JING, L.; HAI-FENG, Z.; GUO-QING, H.; MING-LIANG, F. The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 45, p. 175 - 180, 2009.

PAIVA L. A. F.; RAO V. S. N.; GRAMOSA N. V.; SILVEIRA E. R. Gastro-protective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73-78, 1998.

PELLETIER, S.W.; CHOKSHI, H.P.; DESAI, H.K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of natural products**, v. 49, p. 892–900, 1986.

PETERSON, D.H.; MURRAY, H.C.J. Microbial oxigenation of steroids at carbono 11. **Journal American Chemical Society**, v. 74, p. 741-871, 1952.

PIO CORRÊA M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. 2, p. 370-375, 1984.

PORTO, T.S.; RANGEL, R.; FURTADO, N.; CARVALHO, T.C.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S. Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial Activity against Oral Pathogens. **Molecules**, v. 14, p. 191-199, 2009.

RAIMONDI, S.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M. AMARETTI, A.; LEONARDI, A.; PAGNONI, U. M.; ROSSI, M. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, p. 943 – 950, 2009.

RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; GUIMARÃES, A. C.; RIBEIRO, J. E. L. S. Essencial oils from oleoresins of *Protium* spp. Of the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v.150, p.383, 2000.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P**.** Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Microbiol Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROMERO, A.L.; BAPTISTELLA, L. H. B. IMAMURA, P.M. Absolute Configuration of some Dinorlabdanes from the Copaiba Oil. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1036-1040, 1009.

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

SANTOS, A.O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA-JÚNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 59-64, 2013.

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

SANTOS, R.C.; ALVES, C.F.S.; SCHNEIDER, T.; LOPES, L.Q.; AURICH, C.; GIONGO, J.L.; BRANDELLI, A.; VAUCHER, R.A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 265-8, 2012.

SCHMEDA-HIRSCHMANN.G.; ARANDA, C.; KURINA, M.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Biotransformations of Imbricatolic Acid by *Aspergillus niger* and *Rhizopus nigricans* cultures. **Molecules**, v. 12, p. 1092-1100, 2007.

SEKIROV, I, RUSSELL, S.L; ANTUNES, L.C.M; FINLAY, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v.90, p.859-904, 2010.

SEVERIANO, M.E.; SIMÃO, M.R.; RAMOS, H.P.; PARREIRA, R.L.T.; ARAKAWA, N.S.; SAID, S.; FURTADO, N.A.J.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; GREGÓRIO, L.E.; TIRAPELLI, C.R.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5870-5875, 2013.

SHIMIZU, M. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 2283-2287, 1990.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA JUNIOR, O. M.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflamatory-realted activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.57-69, 1999.

SIMEÓ, Y.; SINISTERRA, J.V. Biotransformation of terpenoids: A green alternative for producing molecules with pharmacological activity. **Mini Review in Organic Chemistry**, v. 6, p. 128-134, 2009.

SOUSA, S. ‘A. A.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Constituintes de óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pio IX – Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, p. 1-3, 2006.

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.

SOUSA, R.B.; SILVA, R.A.O.; MARQUES, L.G.A.; MORAIS, L.S.; SANTOS, M.R.M.C.; PESSOA, C.Ó. Aplicações do óleo resina de *Copaifera* L. na medicina popular: uma prospecção tecnológica. **Revista Geintec (Gestão, Inovação e Tecologias)**, v. 3, p.144-155, 2012.

SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.G.; SOUZA, M.G.M.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; SOUSA, J.P.B.; ROCHA, E.M.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.;

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 3–39, 2003

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J.M., Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. Academic Press, London, pp. 71–133, 1990.

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

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.236-40, 2004.

VALLIM, M.A.; BARBOSA, J.E.; CAVALCANTI, D.N.; PAULA, J.C.; SILVA, V.A.G.G.; TEIXEIRA, V.L. *In vitro* antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p.2379-82, 2010.

VALOTTO, C.F.; SILVA, H.H.; CAVASIN, G.; GERIS, R.; RODRIGUES FILHO, E., SILVA, I.G. Ultrastructural alterations in larvae of *Aedes aegypti* subject to labdane diterpene isolated from *Copaifera reticulata* (Leguminosae) and a fraction enriched with tannins of *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p.194-200, 2011.

VANHAECKE, L.; VERCRUYSSE, F.; BOON, N.; VERSTRAETE, W.; CLEENWERCK, I.; WACHTER, M.; VOS, P.; WIELE, T. V. Isolation and characterization of human intestinal

bacteria capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridine. **Applied and Evironmental Microbiology**, v. 74, p.1469-1477, 2008.

VARGAS, F.S; ALMEIDA, P.D.O.; ARANHA, E.S.P.; BOLETI, A.P.A.; NEWTON, P.

VASCONCELLOS, M.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; LIMA, E.S. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, 6194-6210, 2015.

VANDAMME T. F.; LENOURRY A.; CHARRUEAU C.; CHAUMEIL J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrates Polymers**, v.48, p.219 - 231, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de Copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.20, p. 612-615 1997.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Haynea comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.248-254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p.273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Review: Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 153-167, 2003.

VÉZINA, C. Biotransformation. In: Basic Biotechnology. Bu´lock, J. and KRISTIANSEN, B. (eds). Academic Press, 463-482, 1987.

ZHENG, C.J.; HUANG, B.K.; WANG, Y.; YE, Q.; HAN, T.; ZHANG, Q.Y. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.175-81, 2010.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. **Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.

ZHENG, X.; ZHAO, A.; XIE, G.; CHI, Y.; ZHAO, L.; LI, H.; WANG, C.; BAO, Y.; JIA, W.; LUTHER, M.; SU, M.; NICHOLSON, J.K.; JIA, W. Melamine-Induced Renal Toxicity Is Mediated by the Gut Microbiota. **Science Translational Medicine**, v. 5, p 172ra22, 2013.

MONTALTO, M.;ONOFRIO, F.D.; GALLO, A.; CAZZATO, A.; GASBARRINI,G. Intestinal microbiota and its functions. **Digestive and Liver Disease**, v. 3, p.30-34, 2009.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A.C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p.107-111, 2010.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro*/*in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 1 - 15, 2002.

PAULA, N.C.; CORDEIRO, K.C.F.A.; SOUZA, P.L.M.; NOGUEIRA, D.F.; SOUSA, D.B.S.; COSTA, M.B.; NOËL, F.; OLIVEIRA, F. Biosynthesis of human diazepam and clonazepam metabolites**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1026-1102, 2015.

YANG, L.M.; HSU, F.L. CHANG, S.F.; CHENG, J.T; HSU, J.Y, HSU, C.Y.; LIU, P.C.; LIN, S.J. Microbial metabolism os stevio and steviol-16α, 17-epoxide. **Phytochemistry**, v. 68, p. 562-570, 2007.

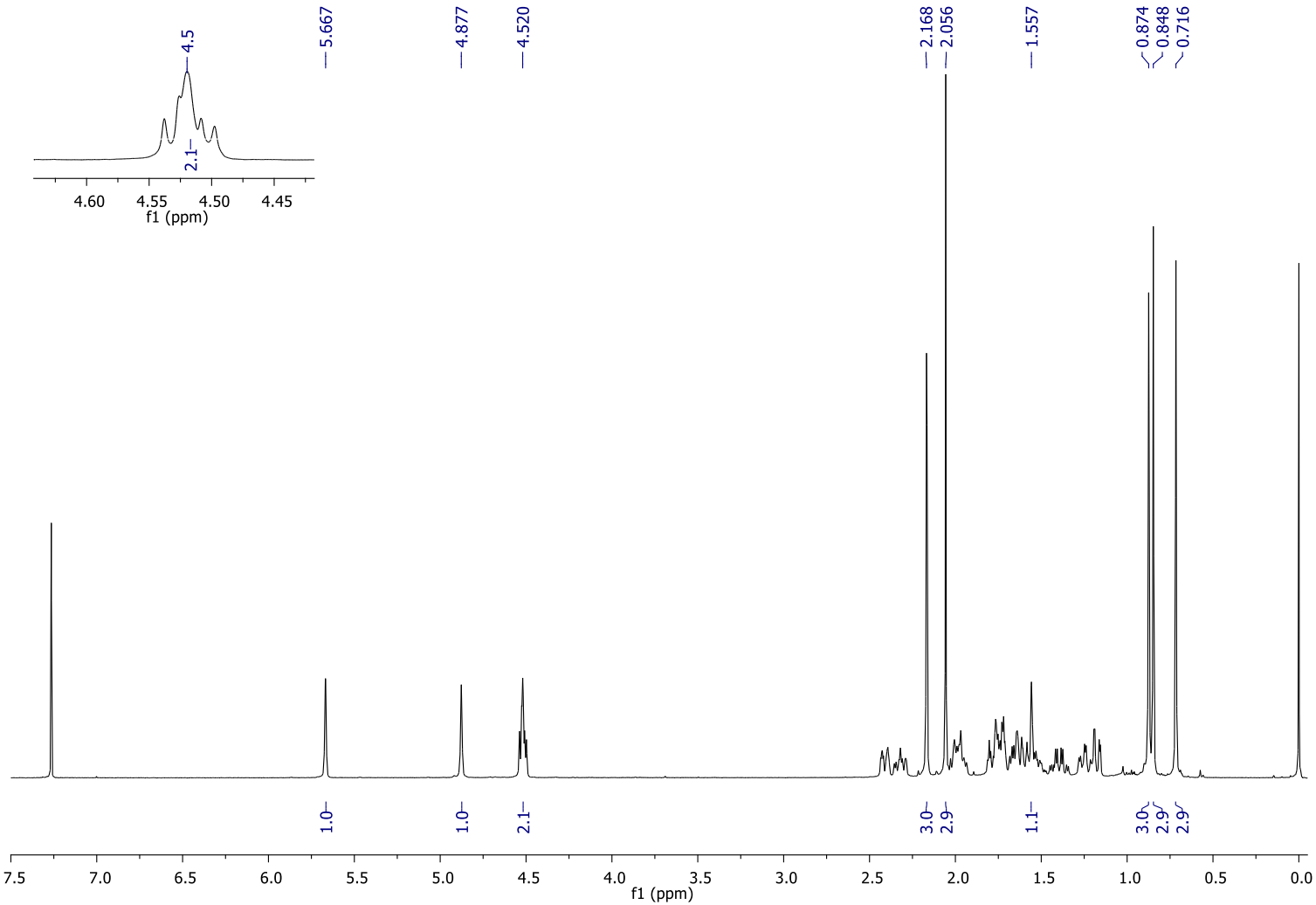
GRANADOS, A.G.; WTINEZ, A.; ORTIZ, A. Microbial transformation of tetracyclic diterpenes: conversion of *ent*-kaurenones by Curvularia and R*hizopus* strains. **Journal of Natural Products**, v. 53, p441-450, 1990.

ZINKEL, D.F.; MAGEE, T.V. Diterpene resin acids from the needle oleoresin of *Pinus strobus*. **Phytochemistry**, v. 26, p.769, 774, 1987.

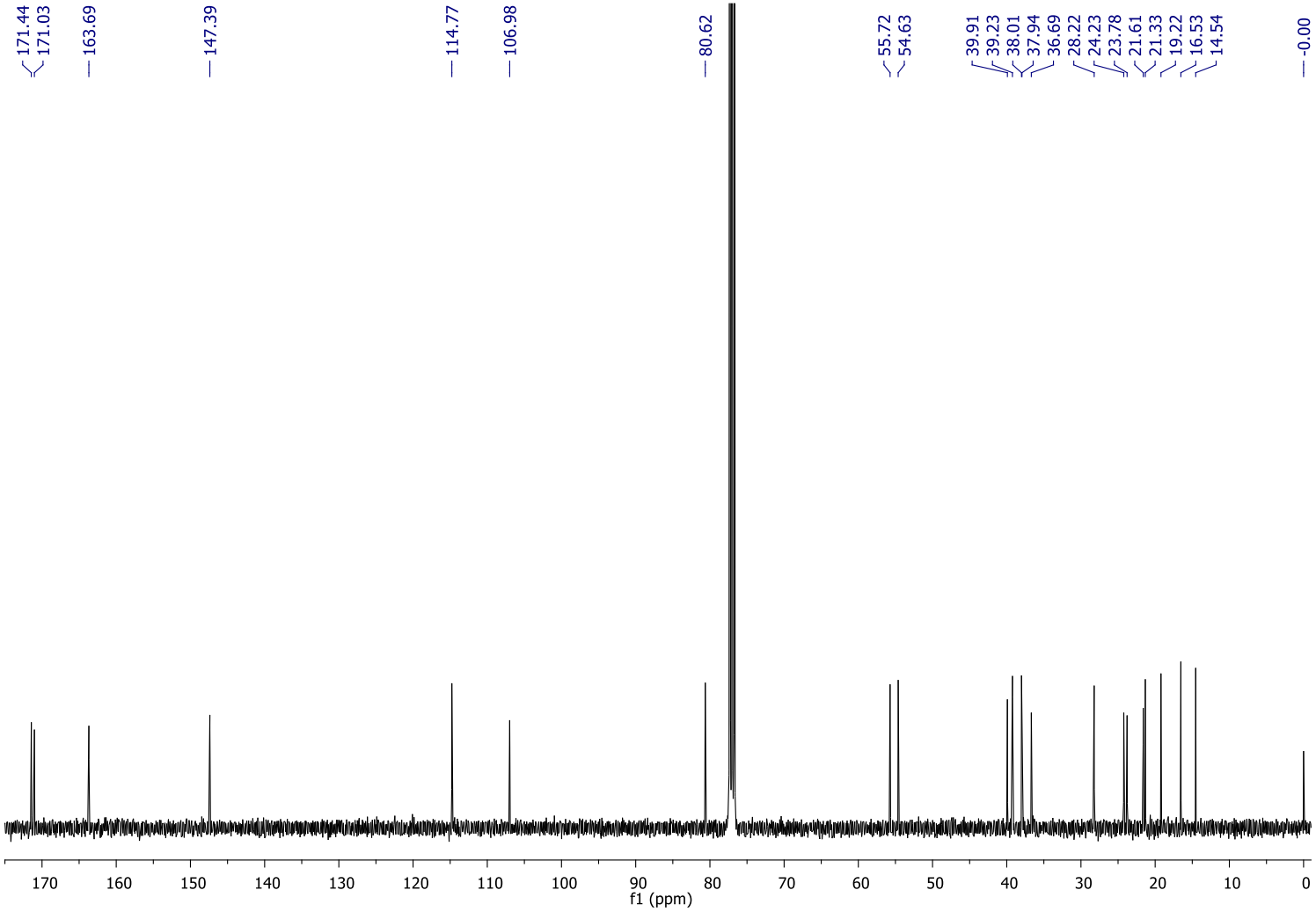
Apêndices

7 APÊNDICES

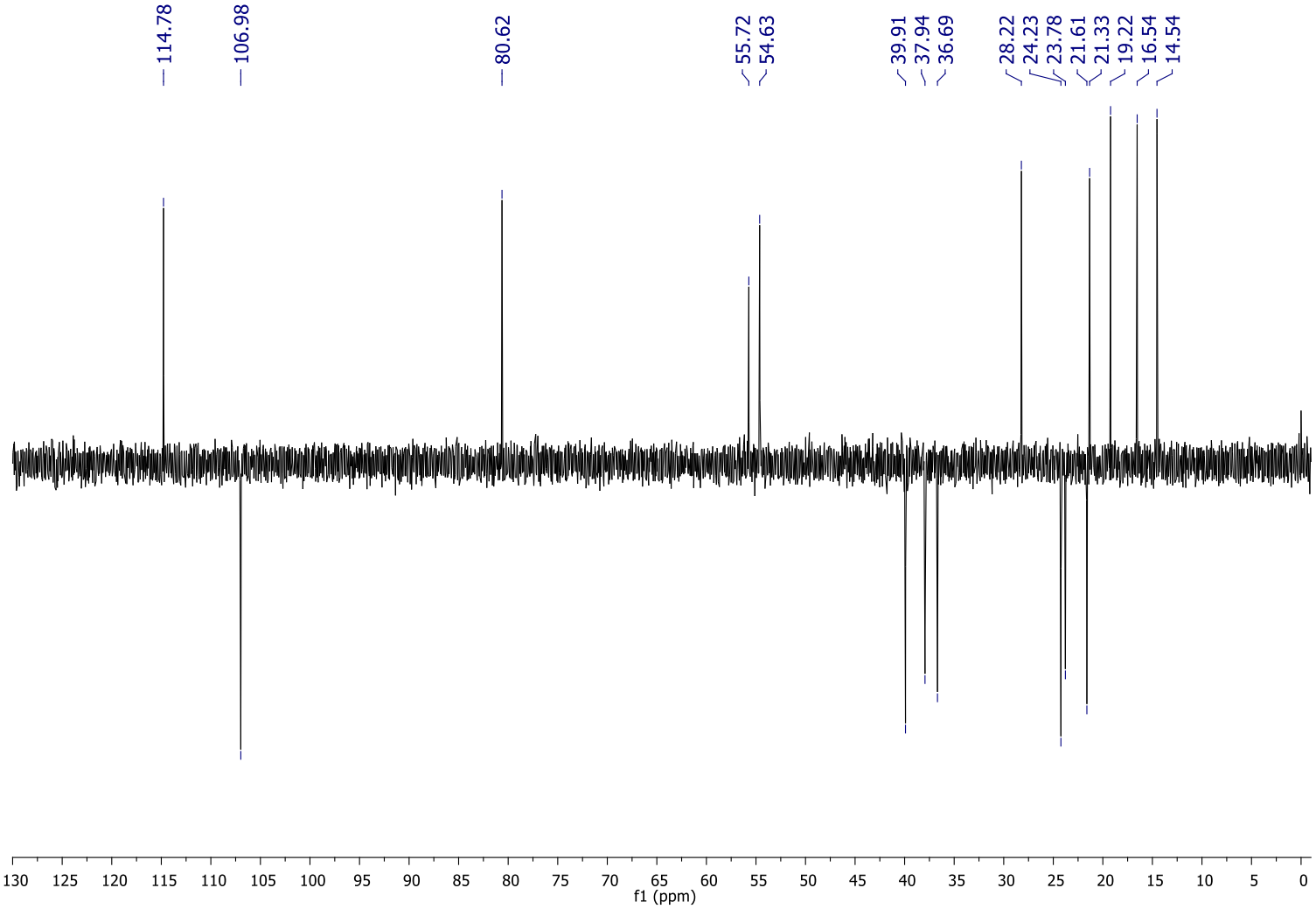
APÊNDICE 1: Espectro de RMN de ^{1}H da substância A ($CDCl_3$, 400 MHz)



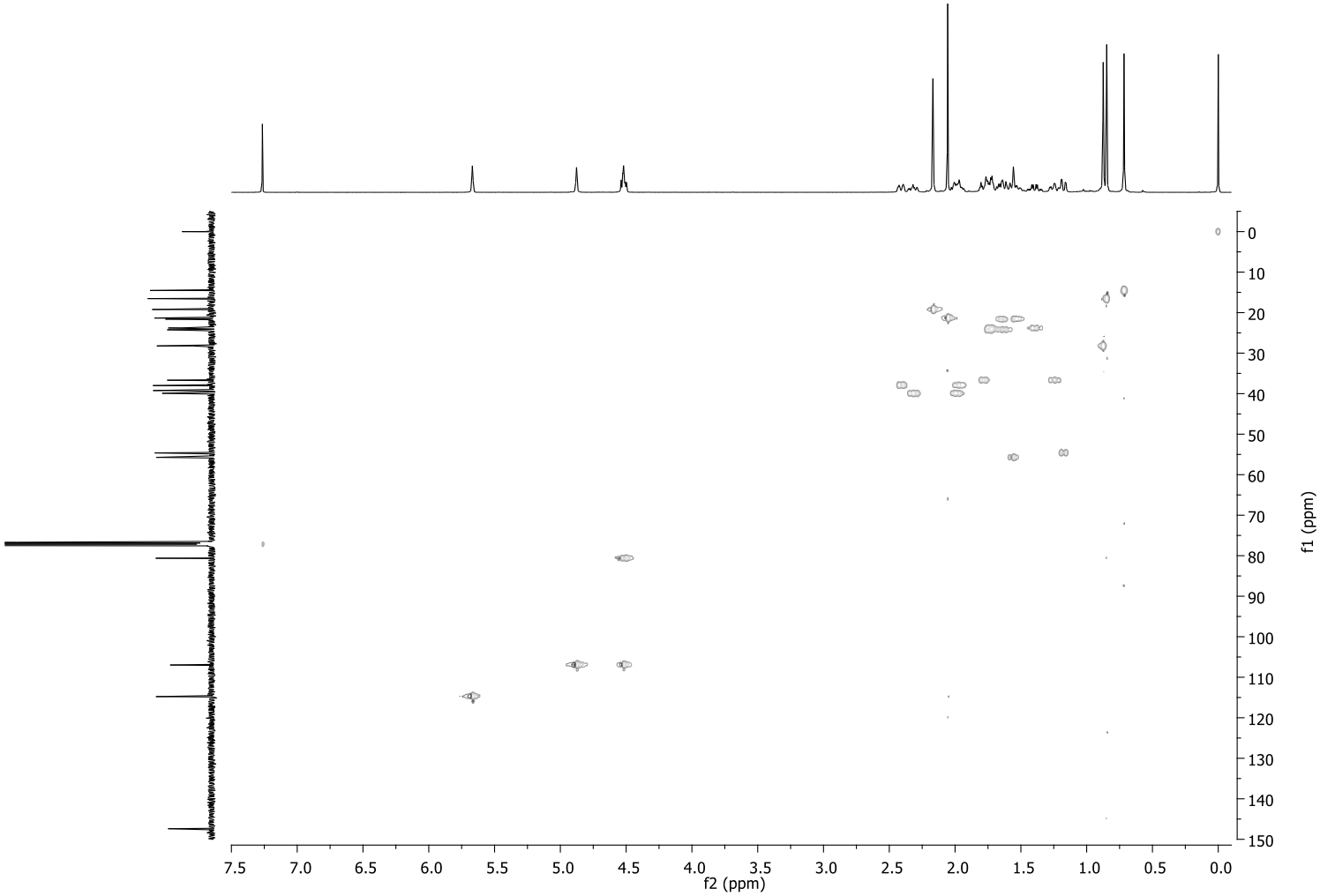
APÊNDICE 2: Espectro de RMN de ^{13}C da substância A ($CDCl_3$, 100 MHz)



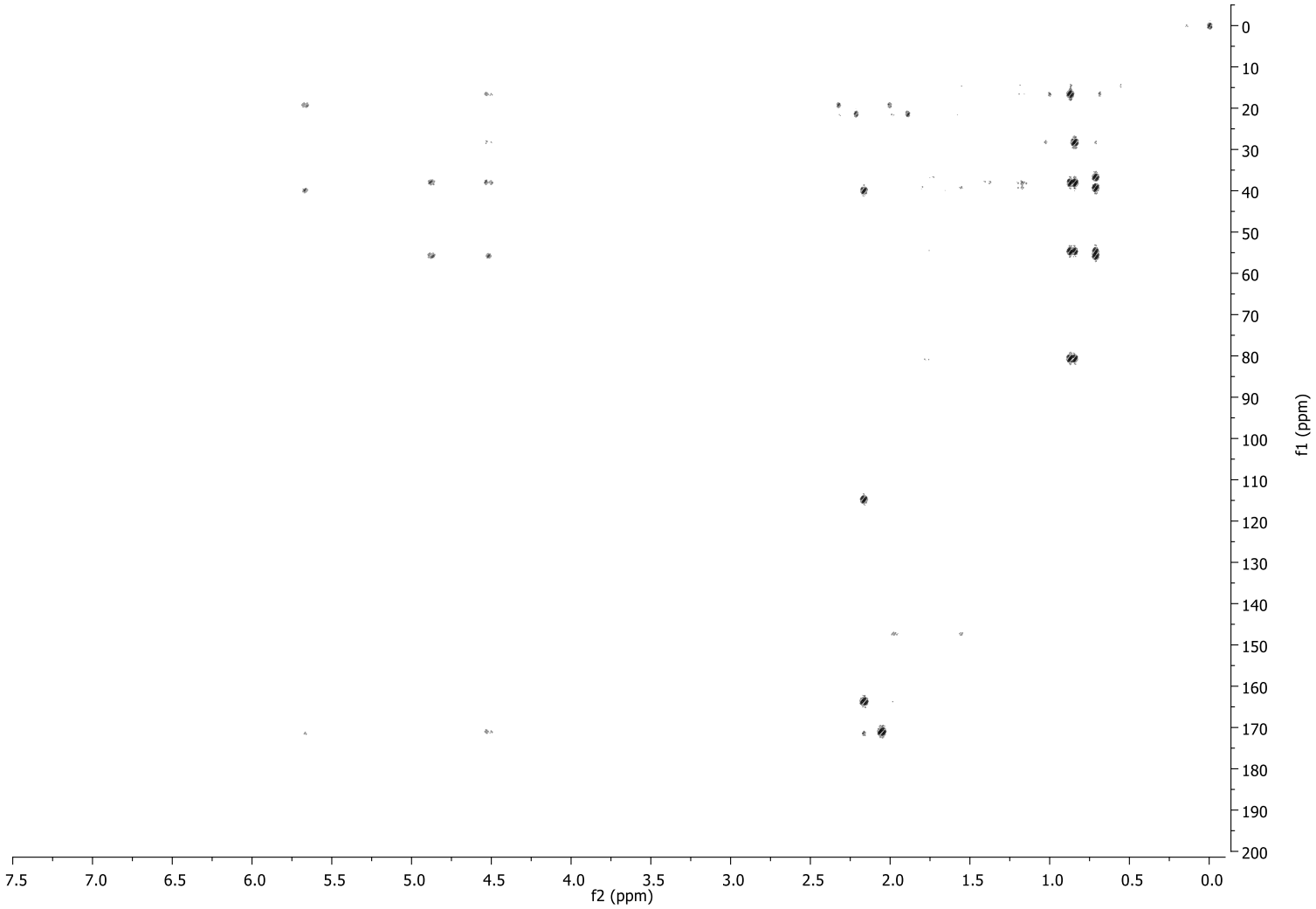
APÊNDICE 3 Espectro de DEPT 135° da substância A ($CDCl_3$, 100 MHz)



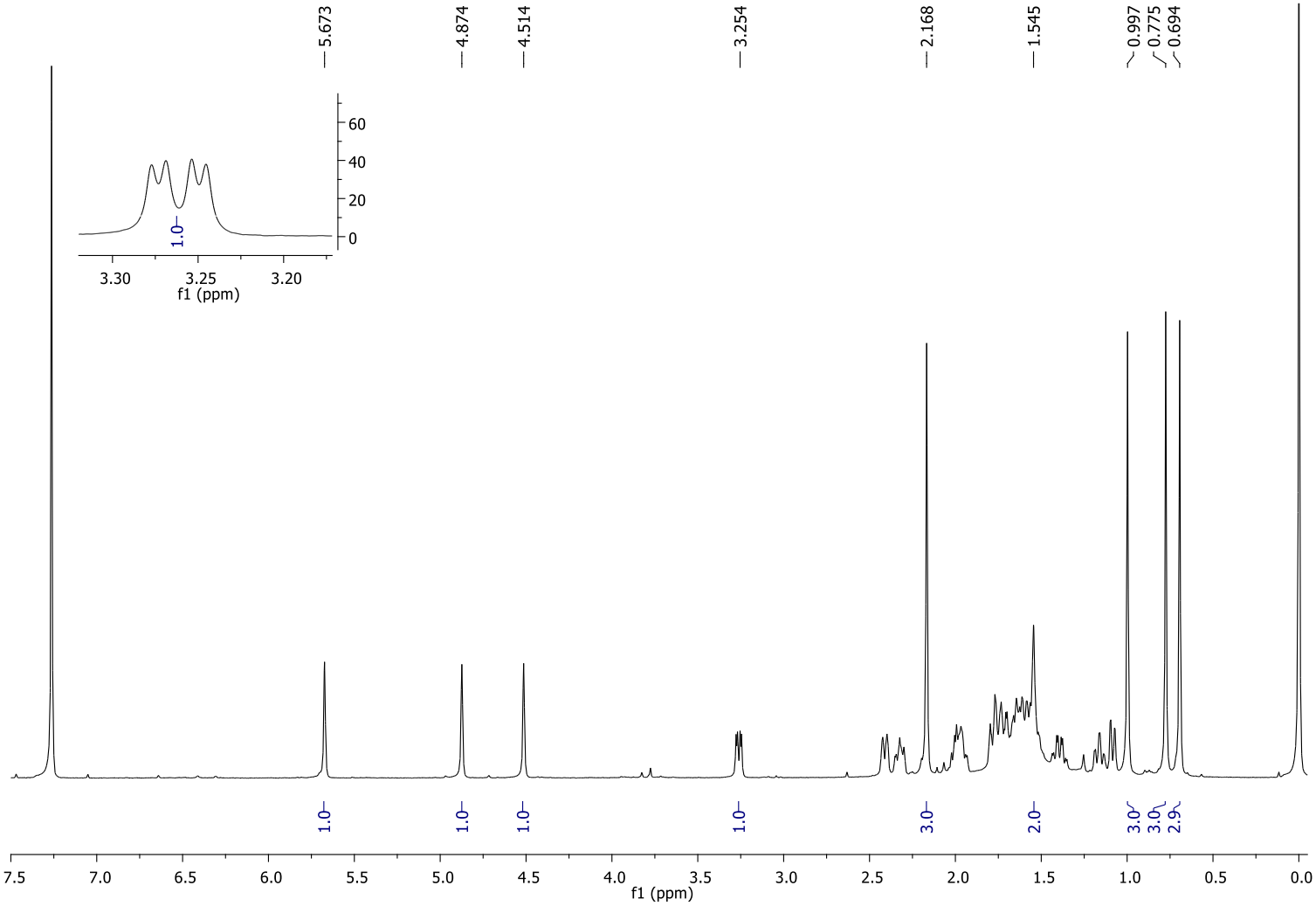
APÊNDICE 4: Mapa de contornos HMQC da substância A ($CDCl_3$, 400 MHz/^{1}H;100 MHz/^{13}C)



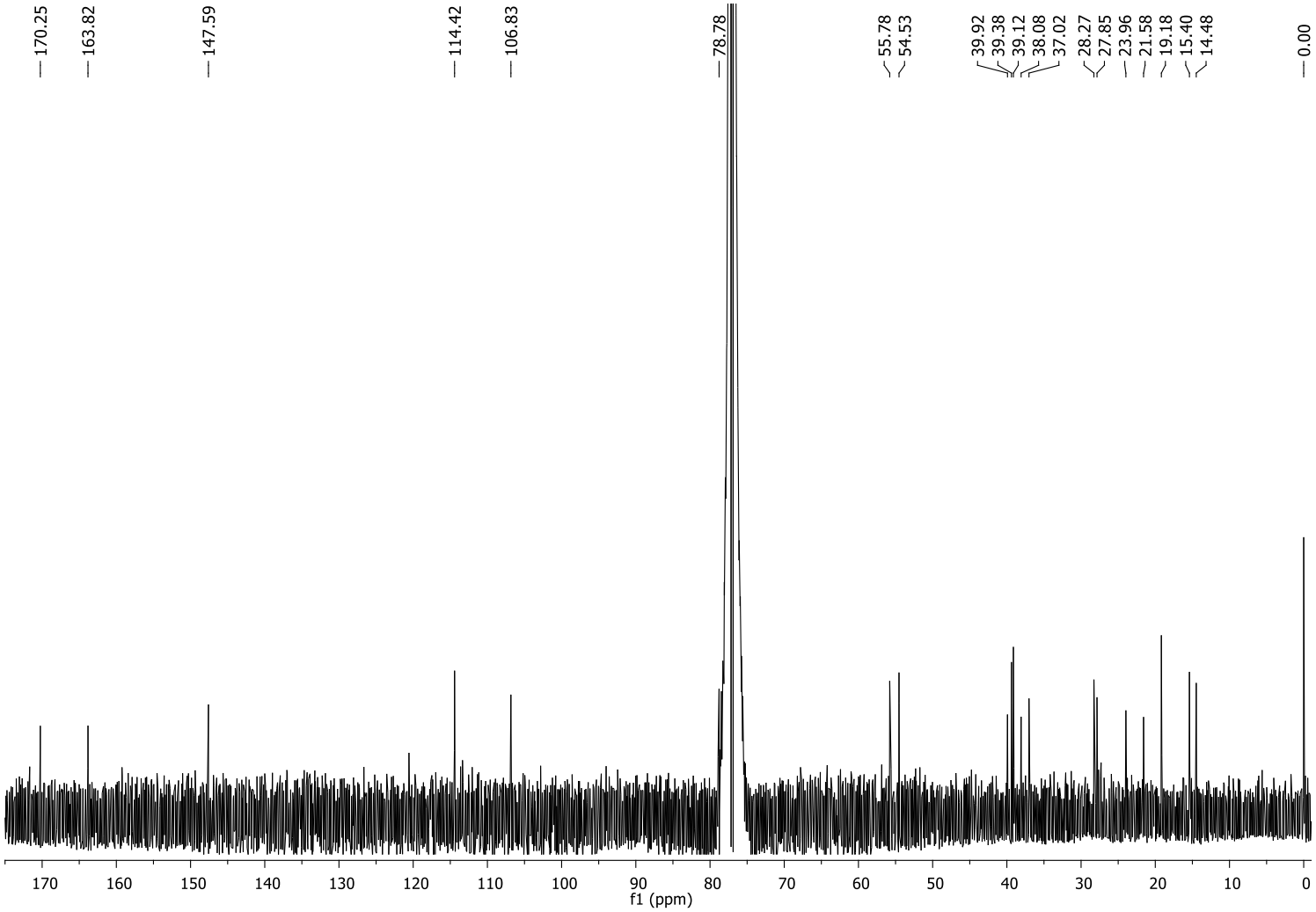
APÊNDICE 5: Mapa de contornos HMBC da substância A ($CDCl_3$, 400 MHz/^{1}H;100 MHz/^{13}C)



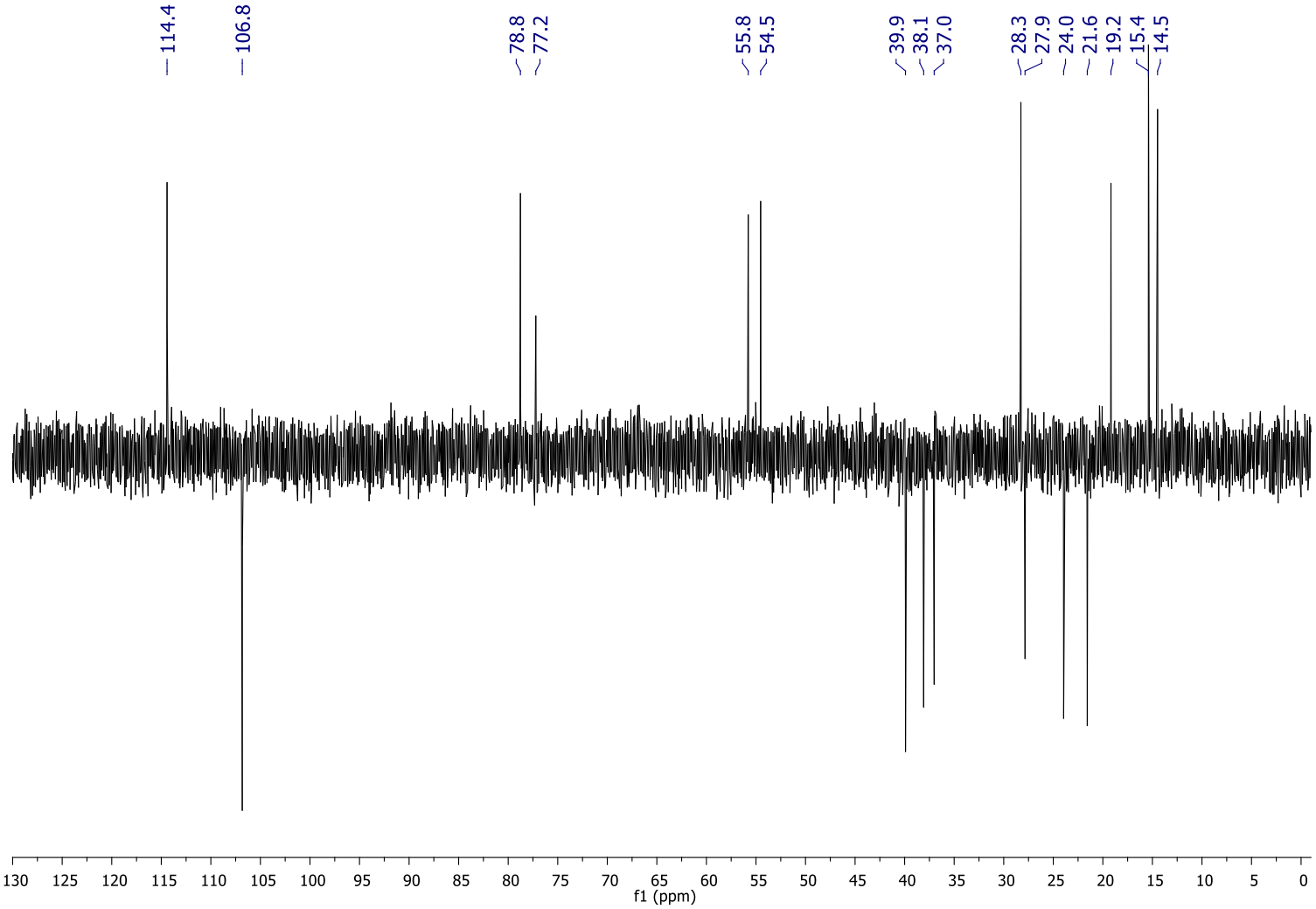
APÊNDICE 6: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Ab5 ($CDCl_3$, 500 MHz)



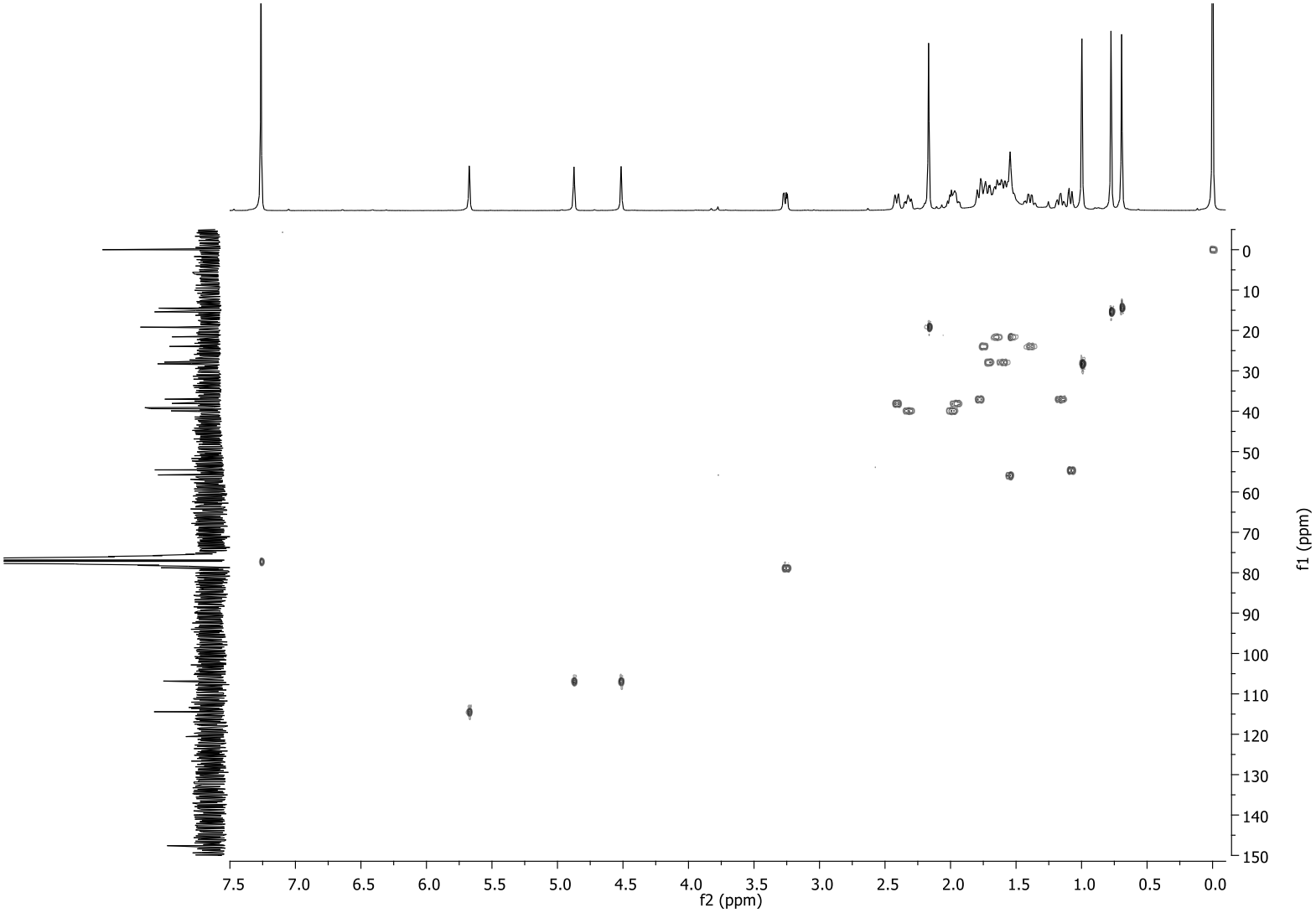
APÊNDICE 7: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Ab5 ($CDCl_3$, 125 MHz)



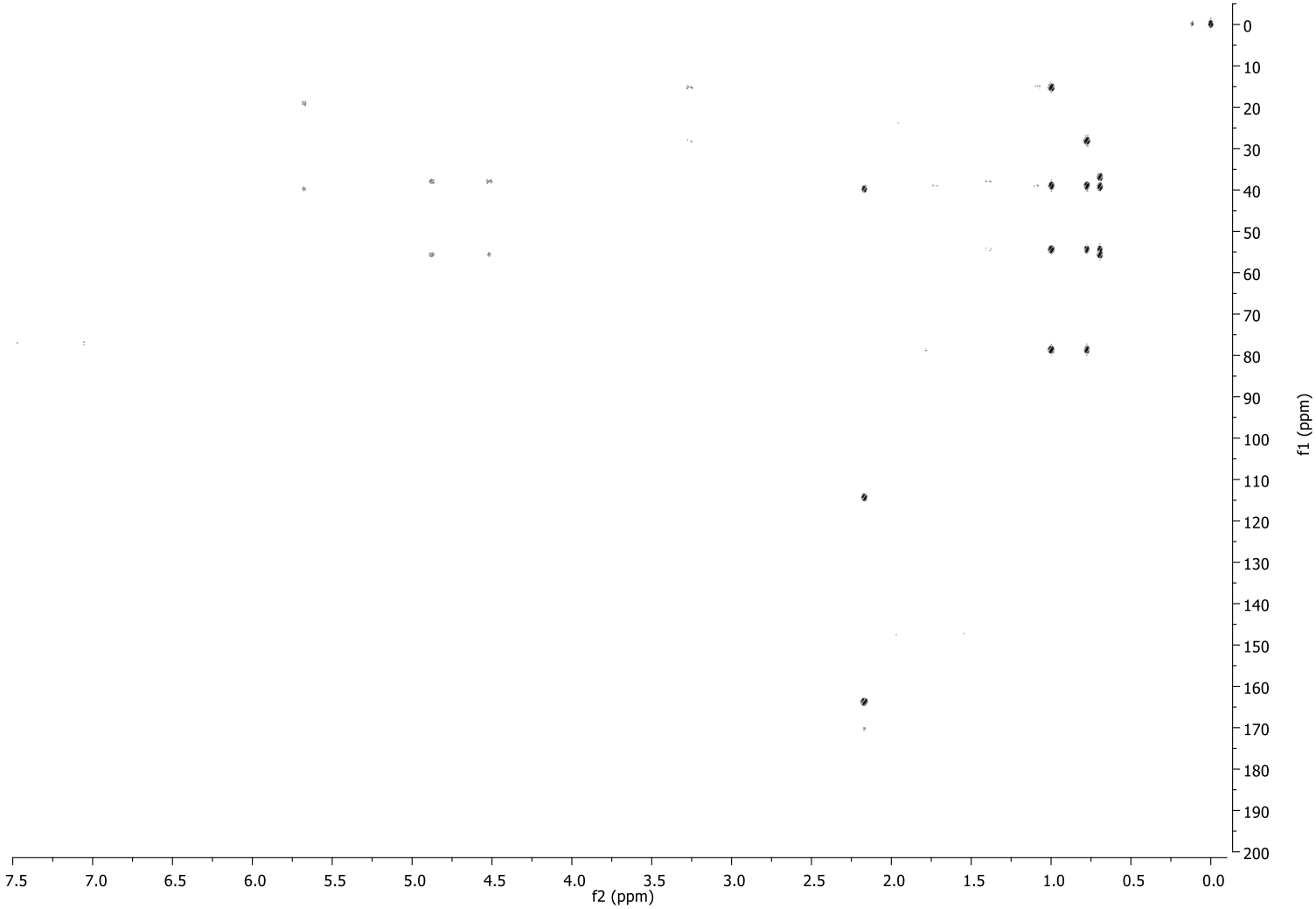
APÊNDICE 8: Espectro de DEPT 135° do derivado Ab5 ($CDCl_3$, 125 MHz)



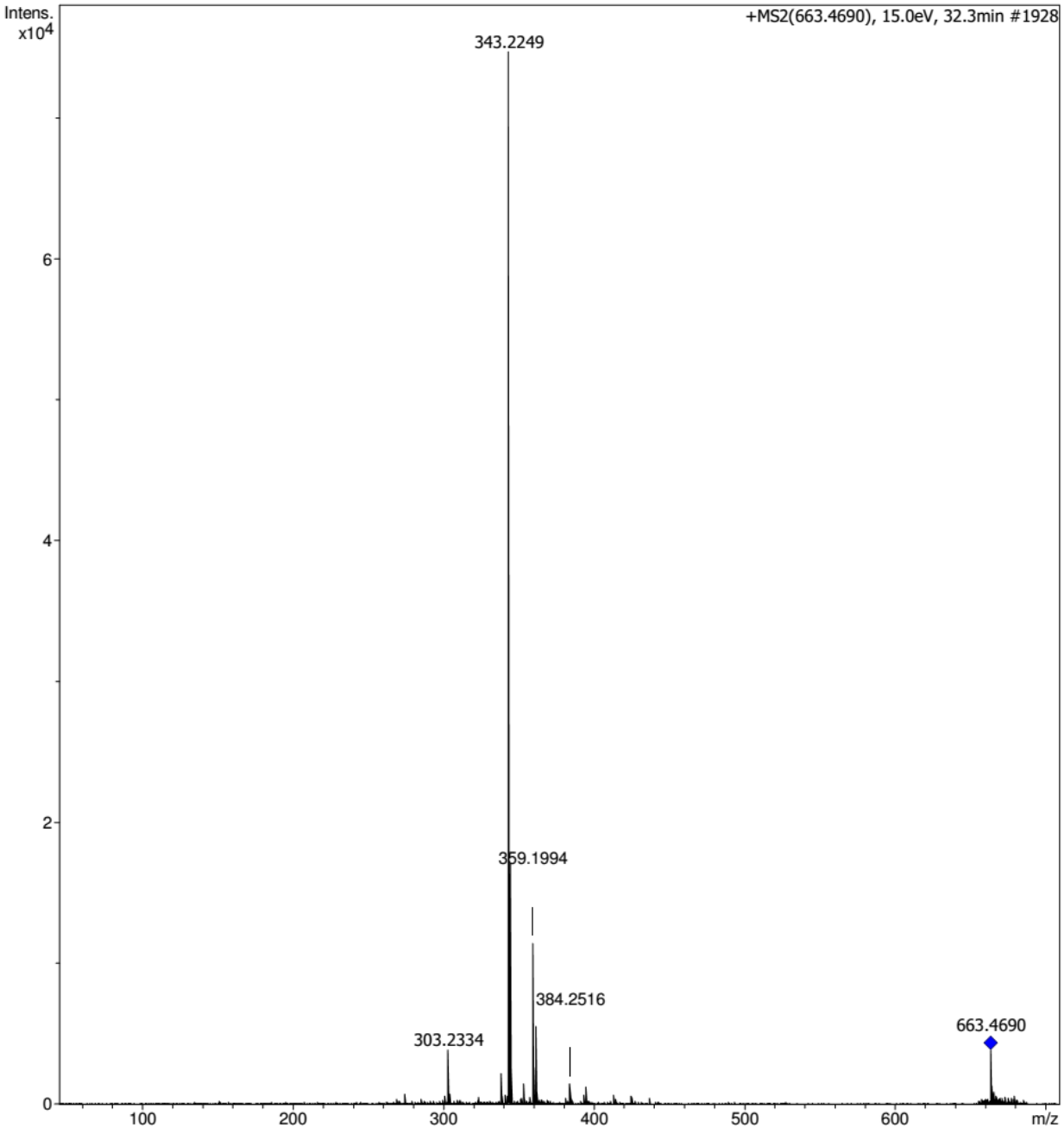
APÊNDICE 9: Mapa de contornos HMQC do derivado Ab5 ($CDCl_3$, 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



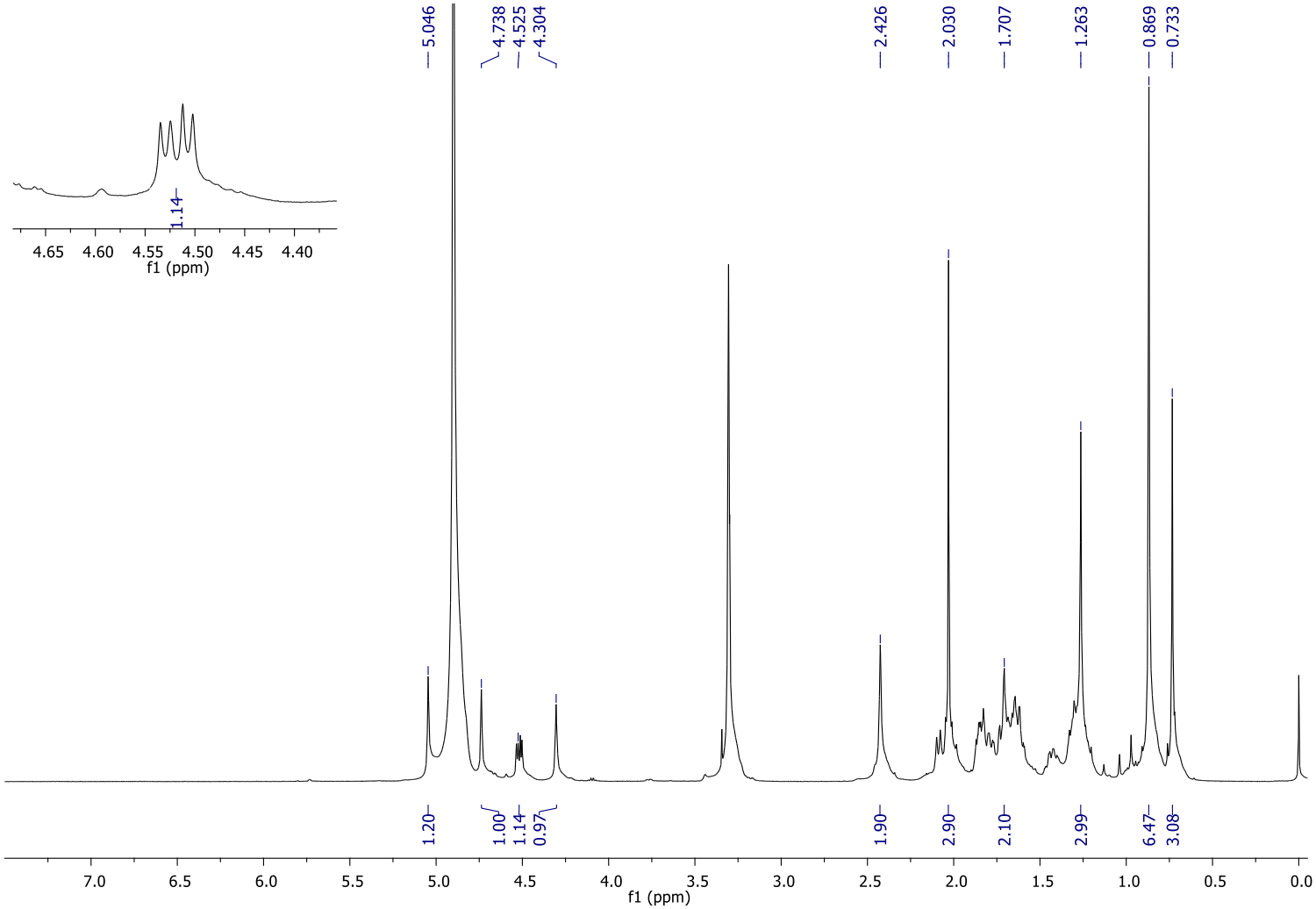
APÊNDICE 10: Mapa de contornos HMBC do derivado Ab5 ($CDCl_3$, 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



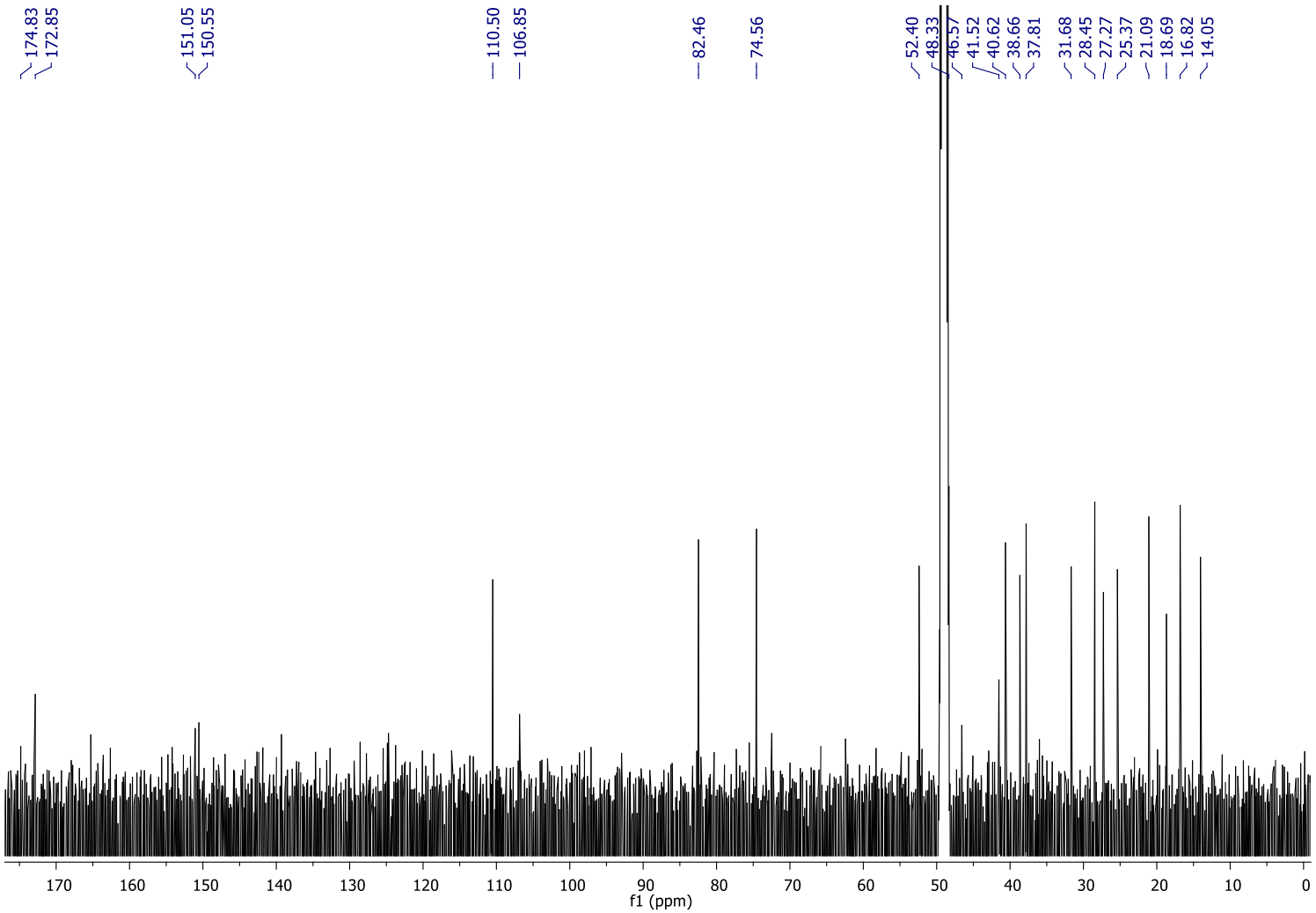
APÊNDICE 11: Espectro de massas de alta resolução do derivado Ab5



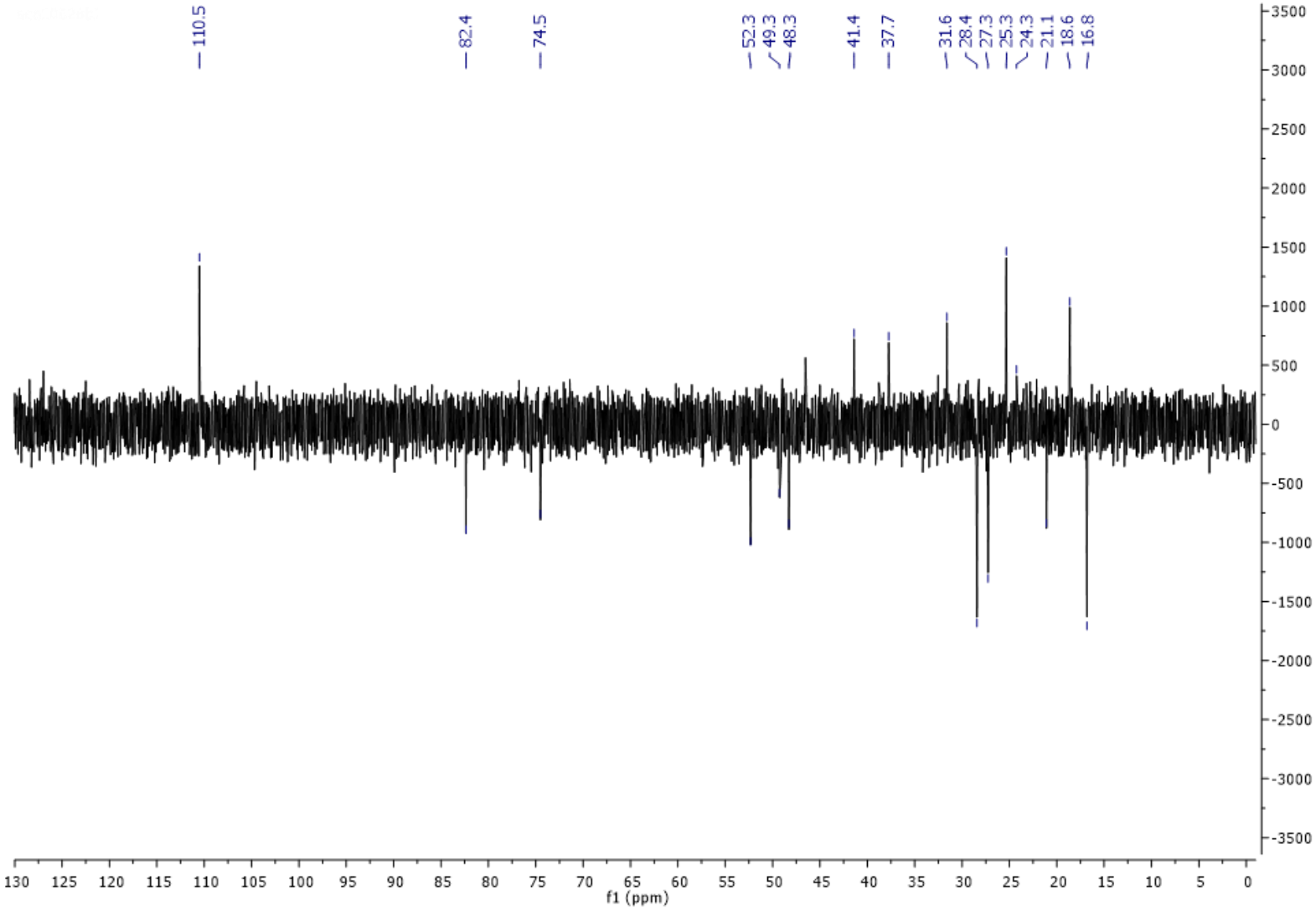
APÊNDICE 12: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Ce12 (CD_3OD, 500 MHz)



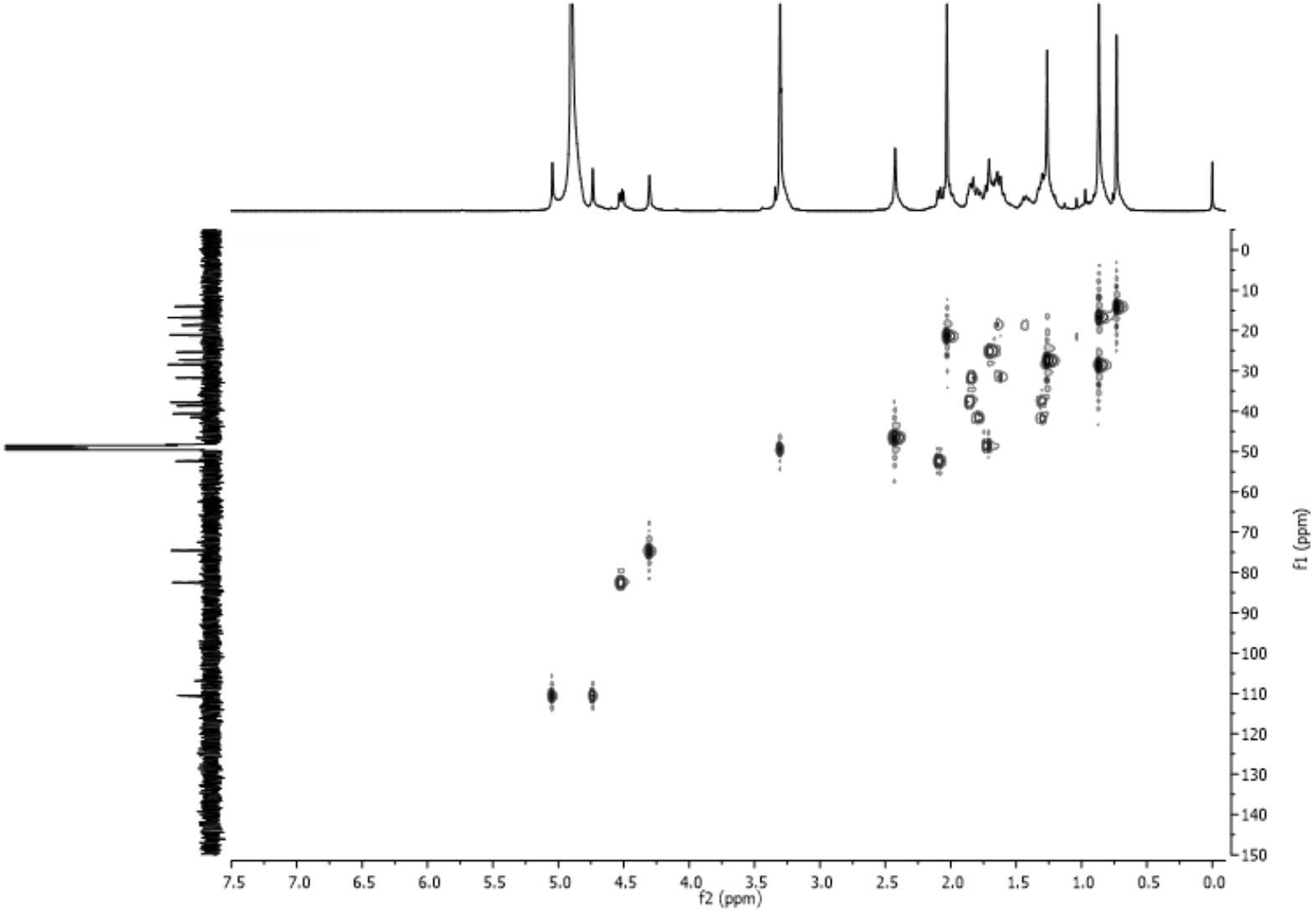
APÊNDICE 13: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Ce12 (CD_3OD, 125 MHz)



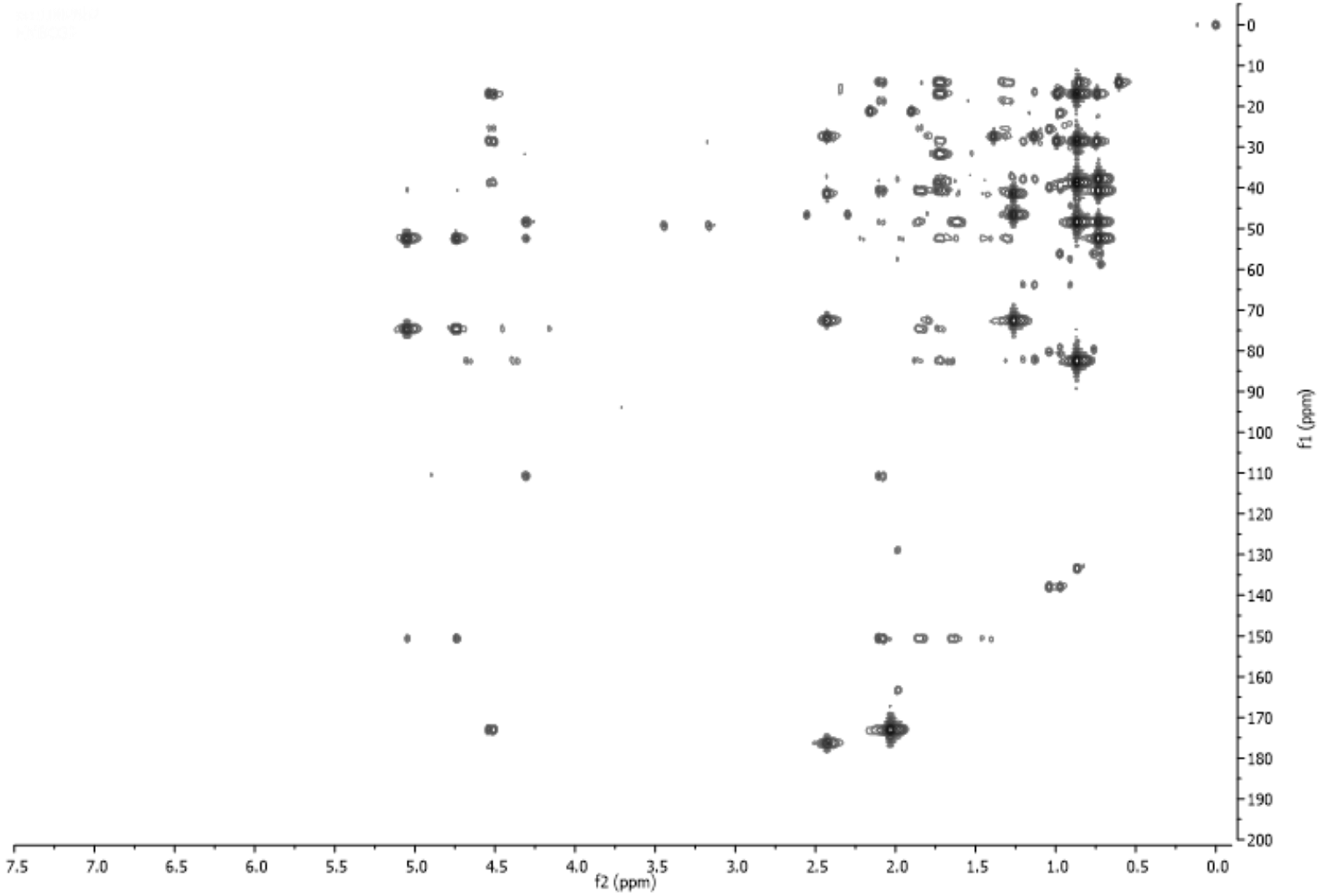
APÊNDICE 14: Espectro de DEPT 135° do derivado Ce12 (CD_3OD, 125 MHz)



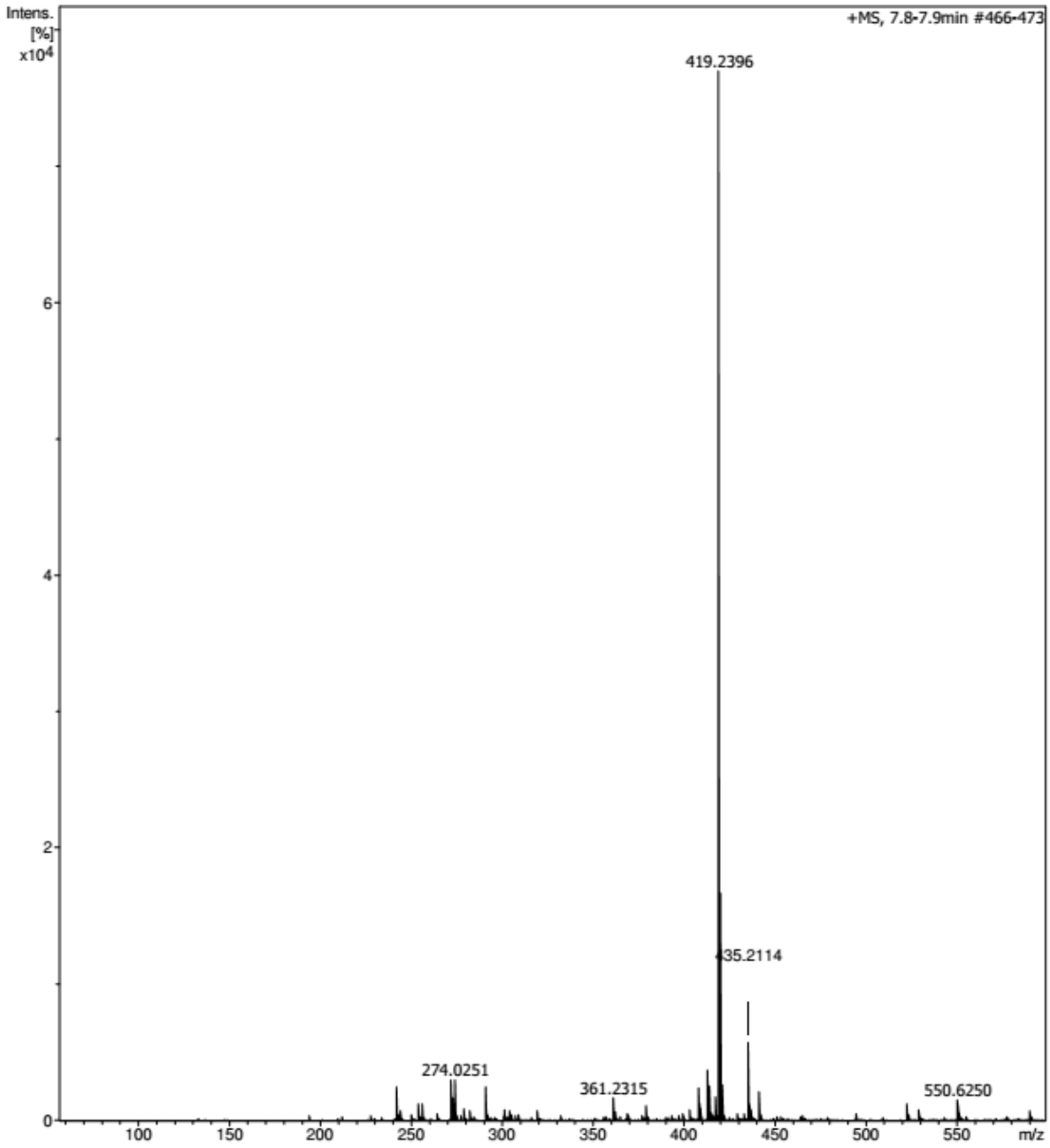
APÊNDICE 15: Mapa de contornos HMQC do derivado Ce12 (CD_3OD , 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



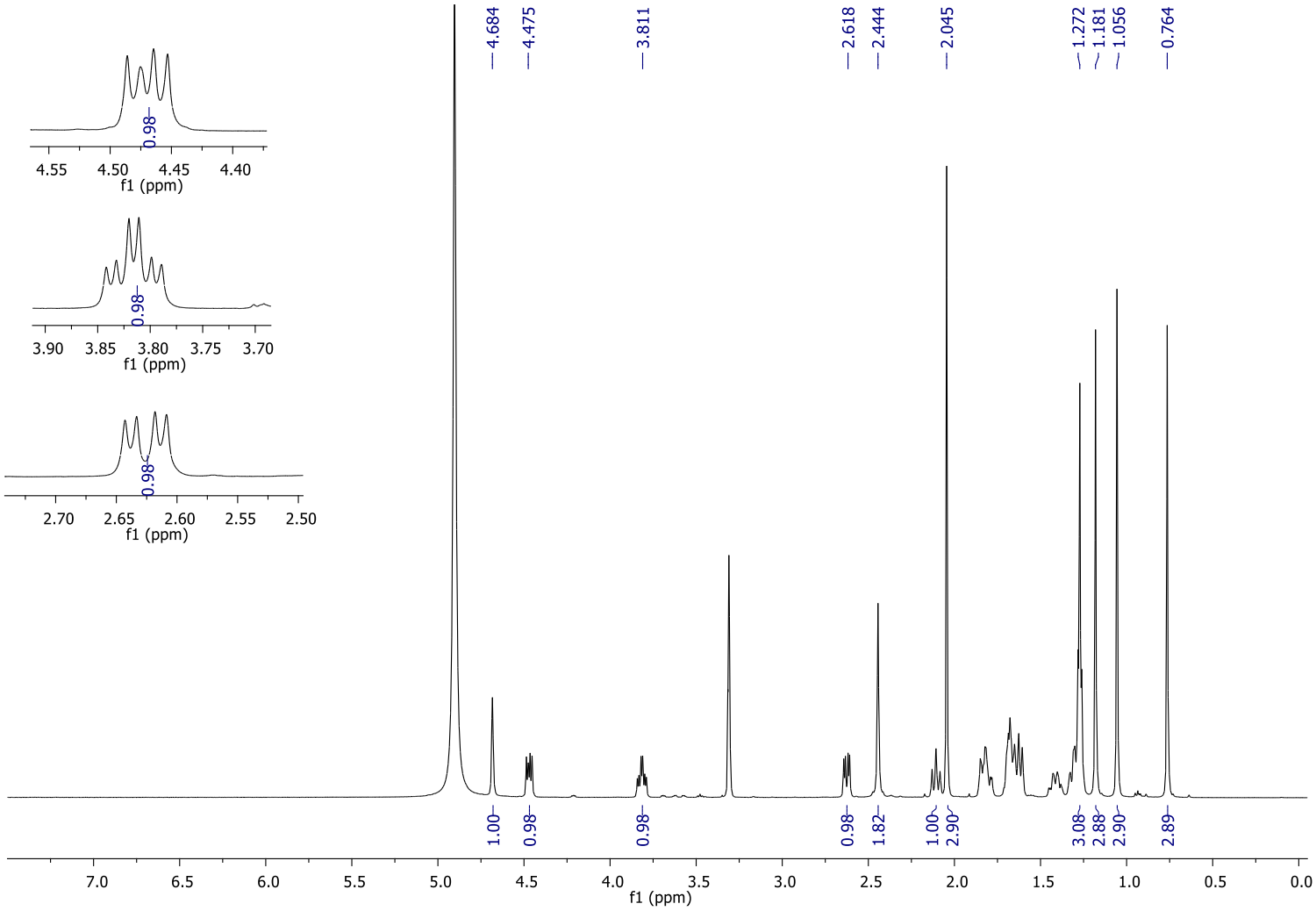
APÊNDICE 16: Mapa de contornos HMBC do derivado Ce12 (CD_3OD , 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



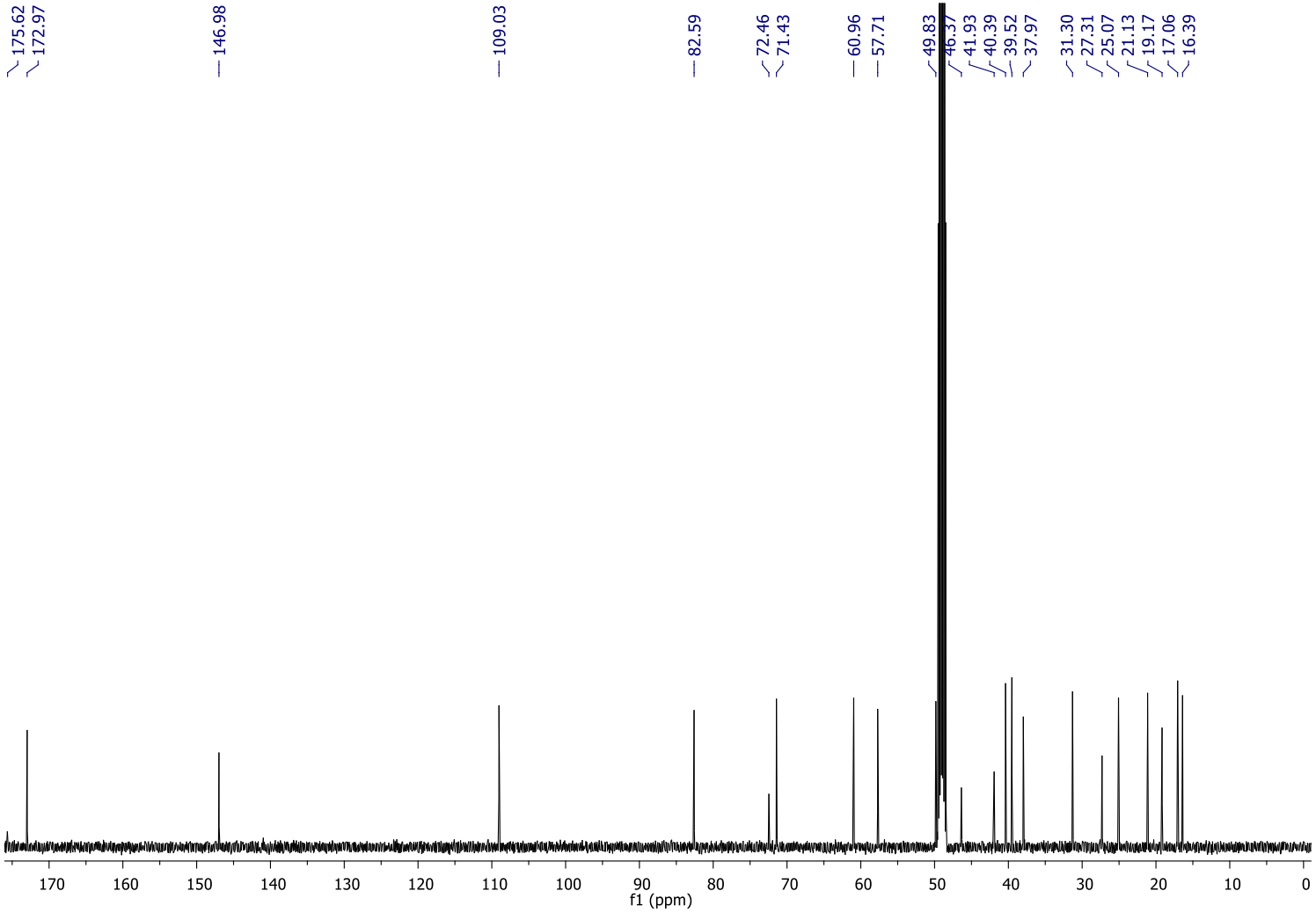
APÊNDICE 17: Espectro de massas de alta resolução do derivado Ce12



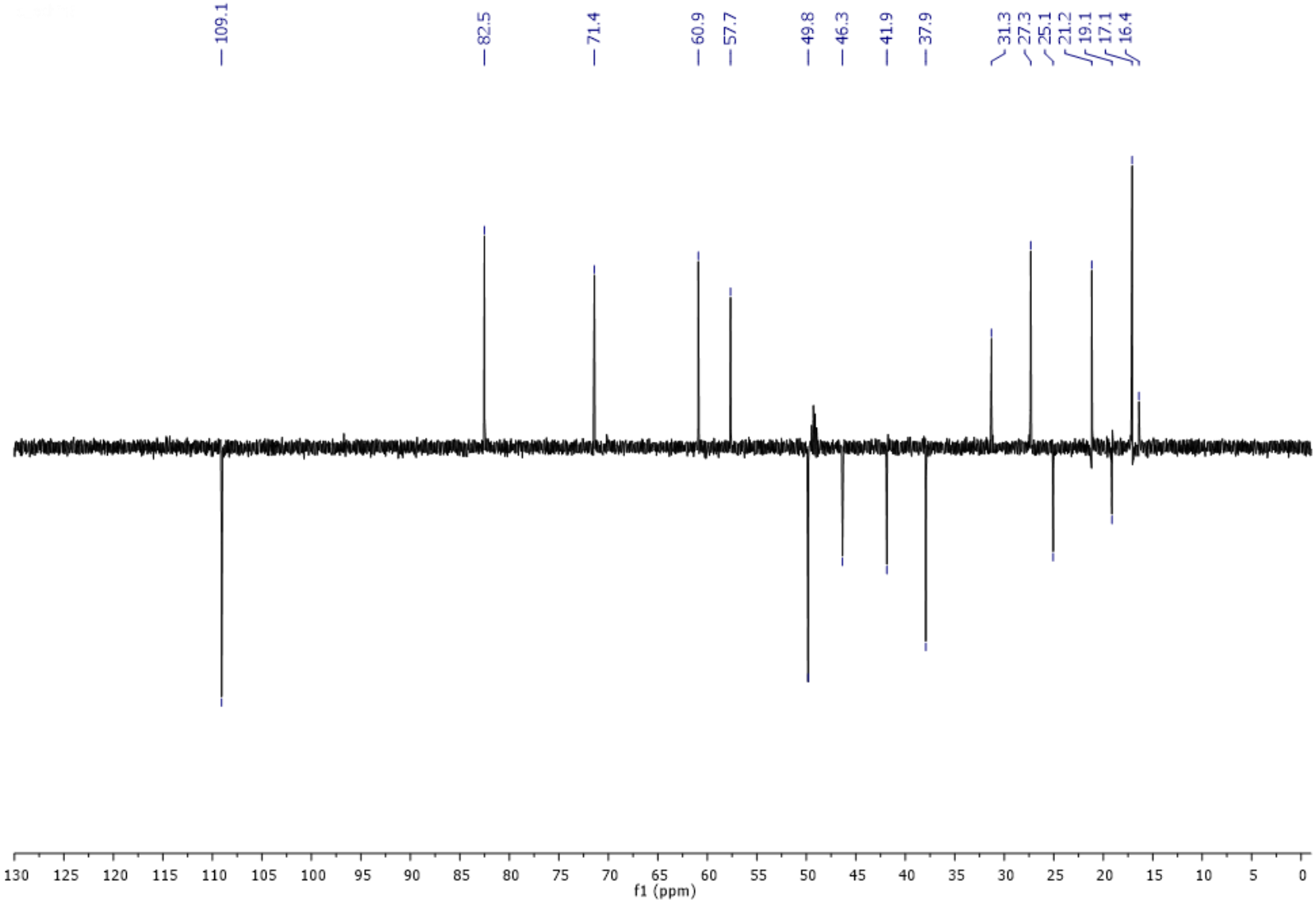
APÊNDICE 18: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Ce9 (CD_3OD, 500 MHz)



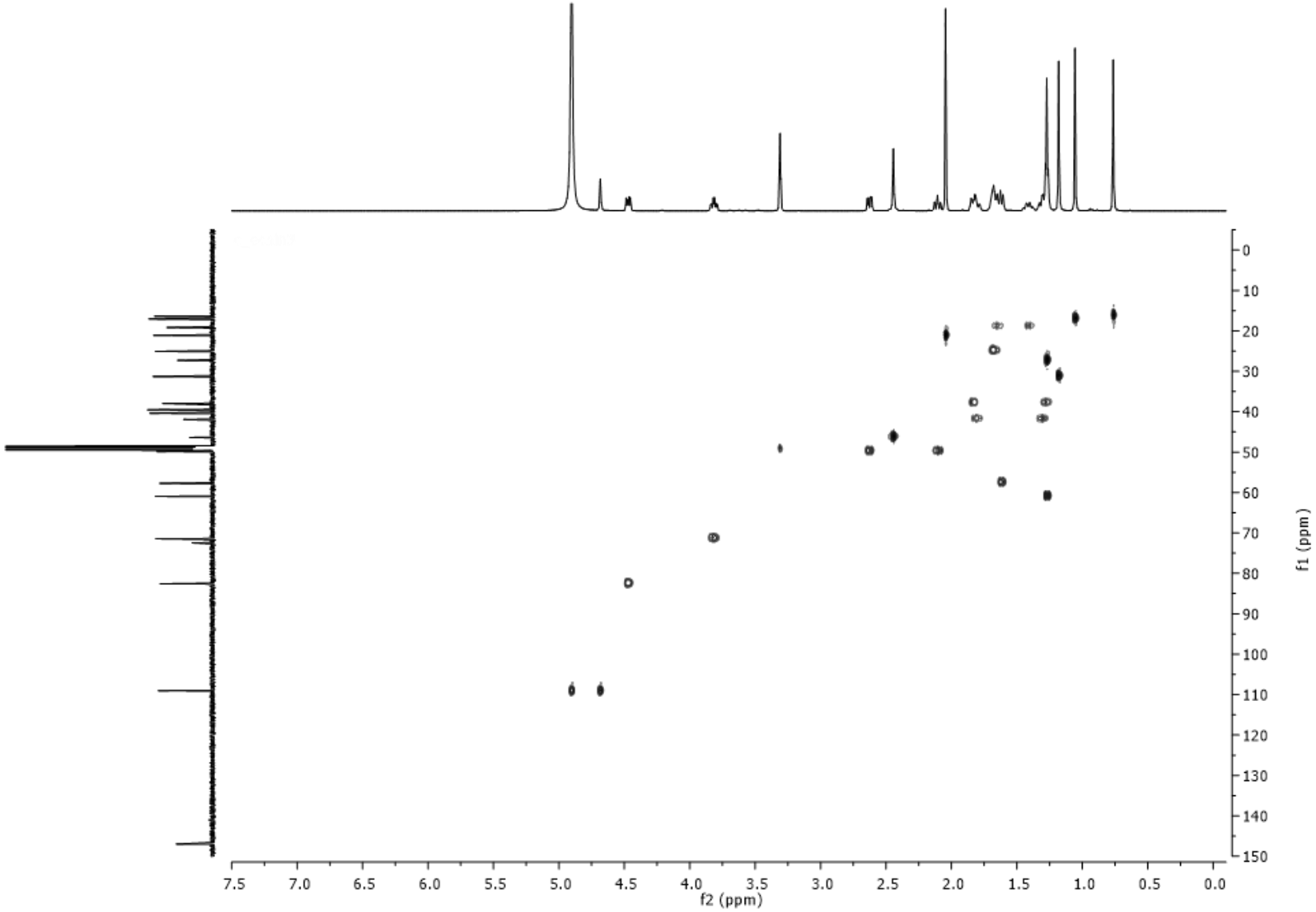
APÊNDICE 19: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Ce9 (CD_3OD, 125 MHz)



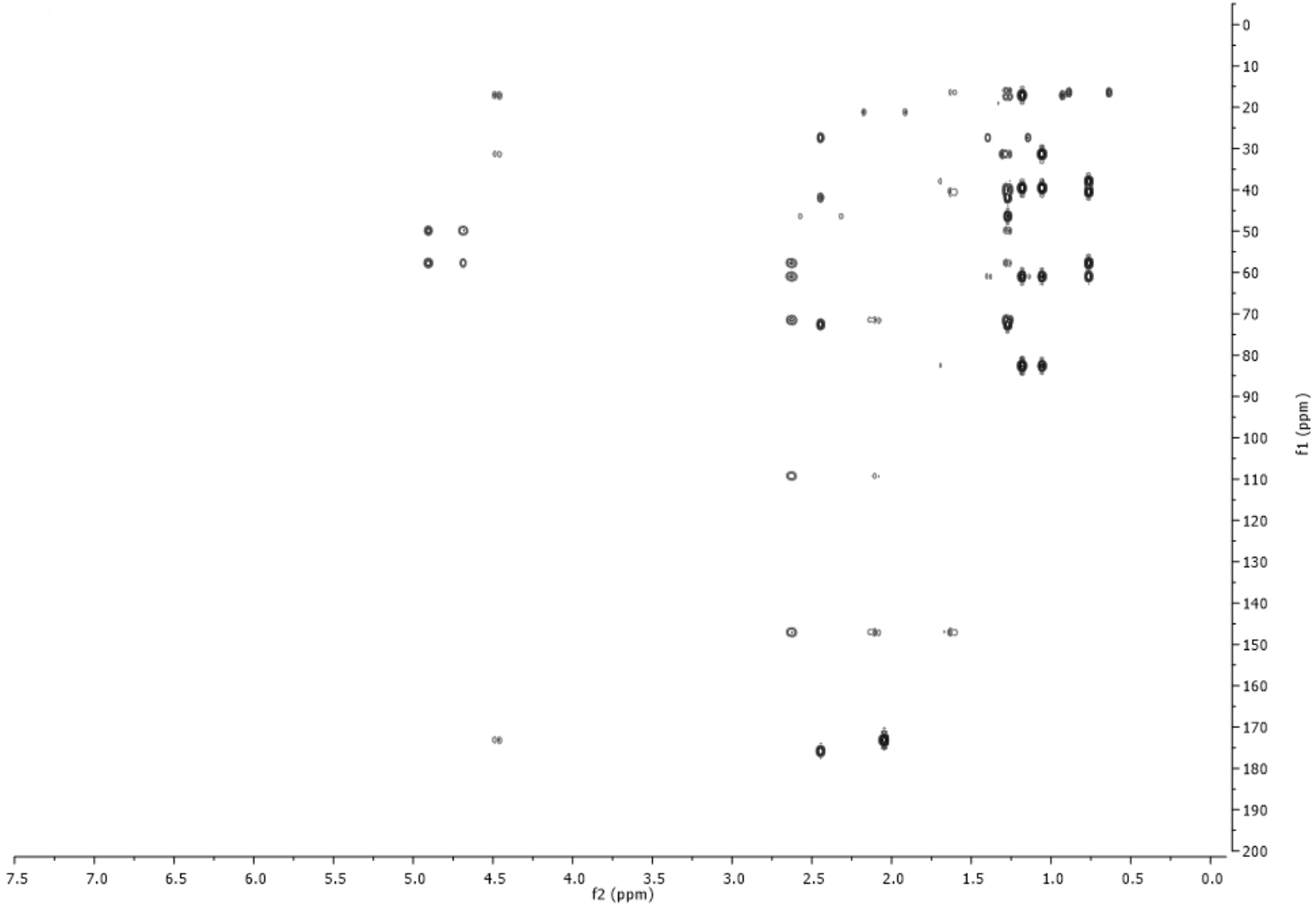
APÊNDICE 20: Espectro de DEPT 135° do derivado Ce9 (CD_3OD, 125 MHz)



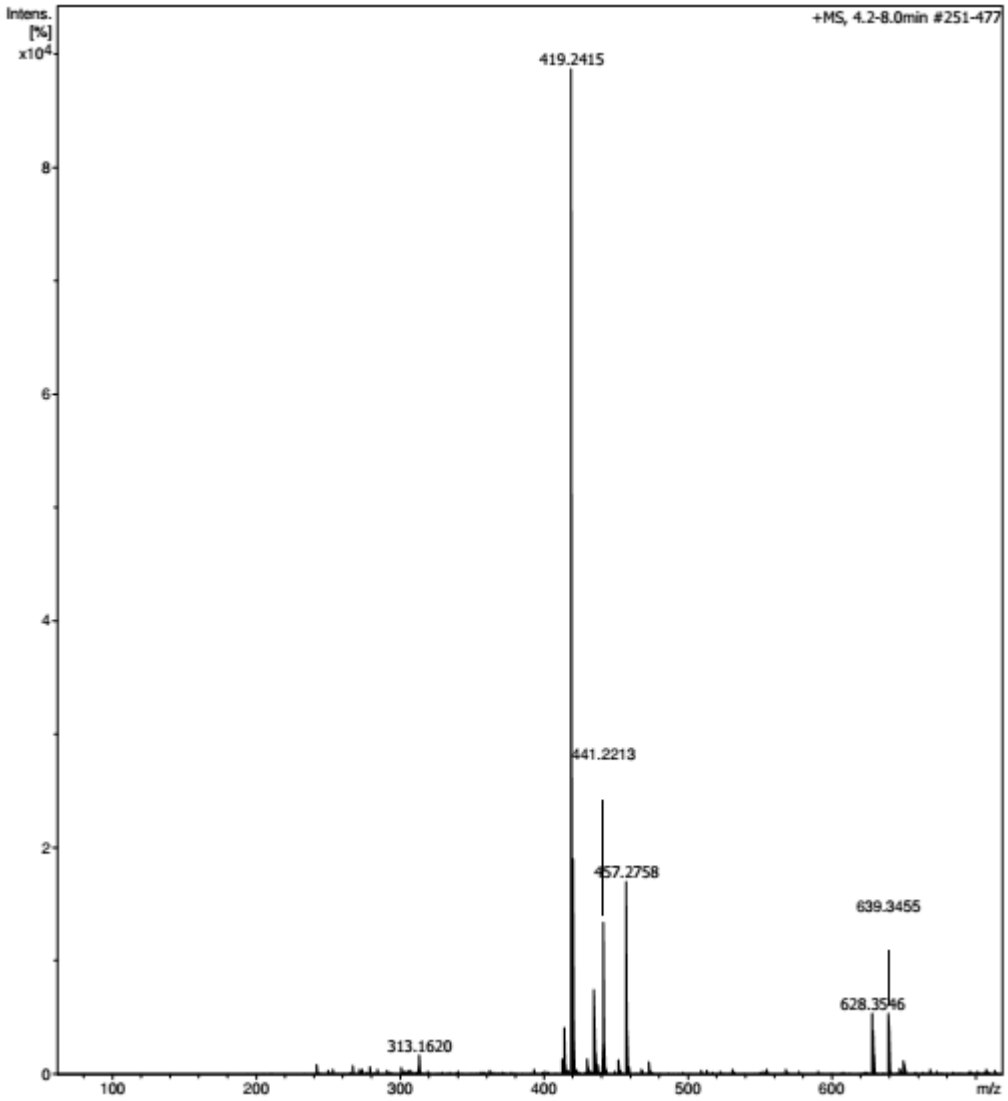
APÊNDICE 21: Mapa de contornos HMQC do derivadoCe9 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



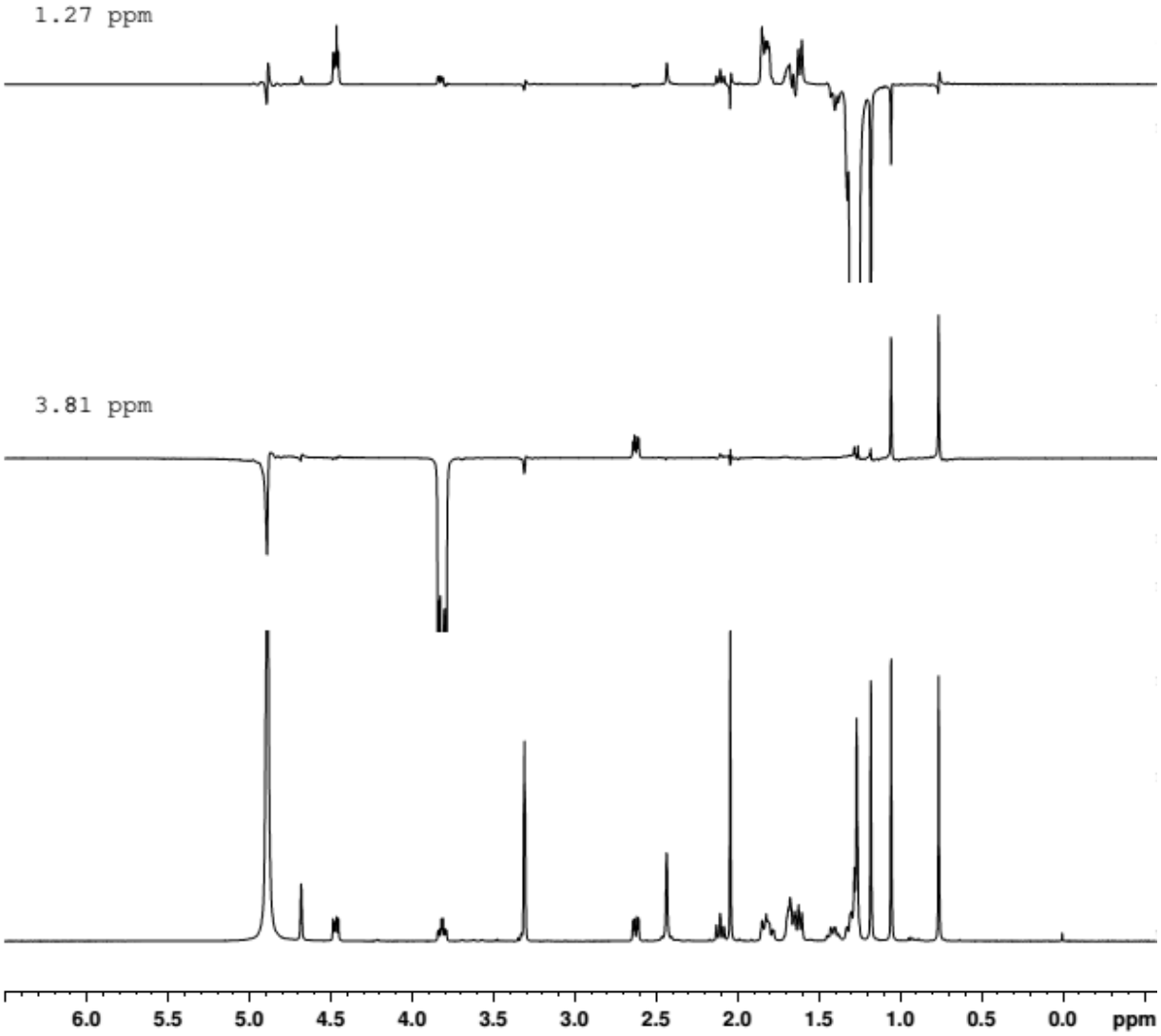
APÊNDICE 22: Mapa de contornos HMBC do derivado Ce9 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



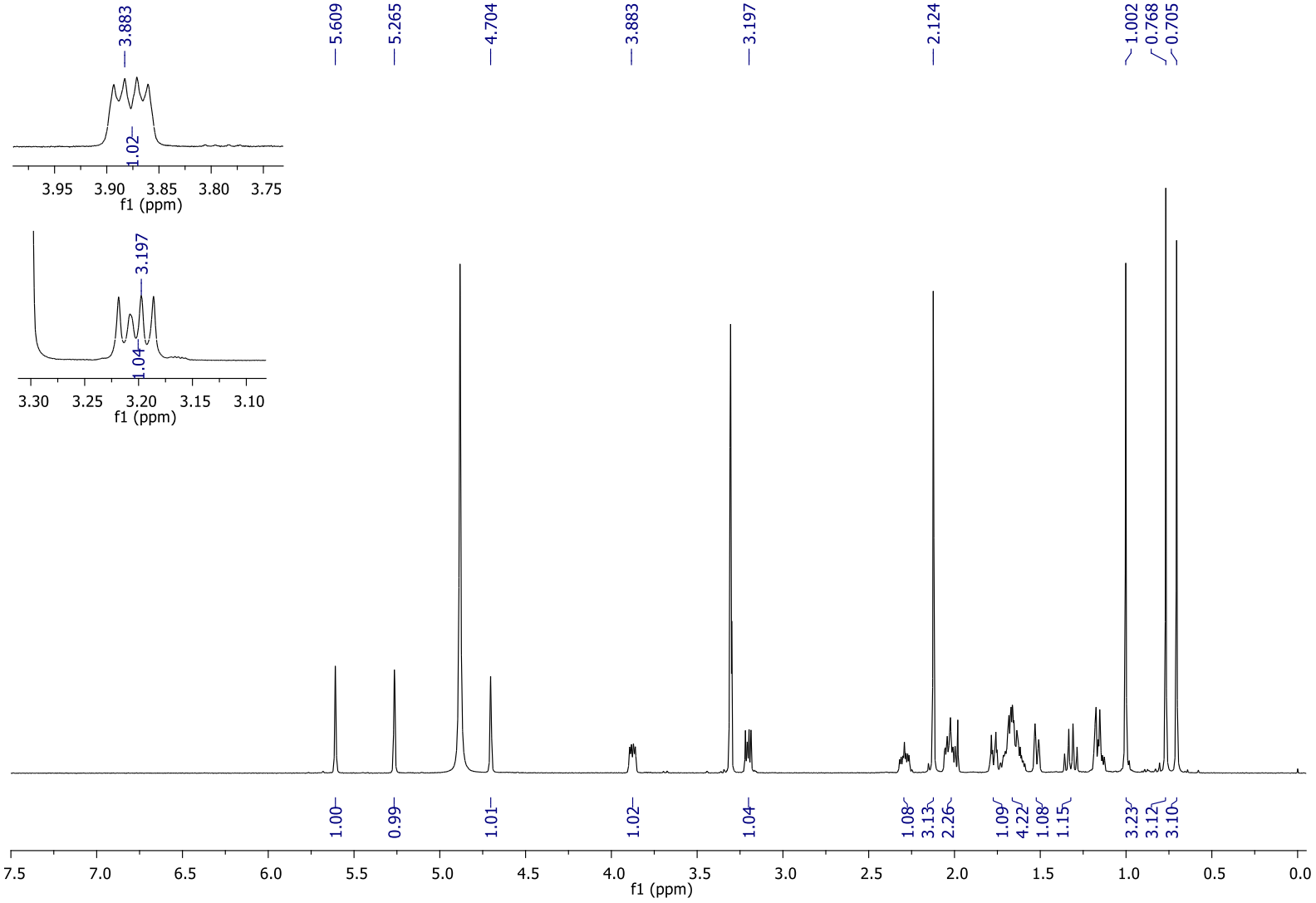
APÊNDICE 23: Espectro de massas de alta resolução do derivado Ce9



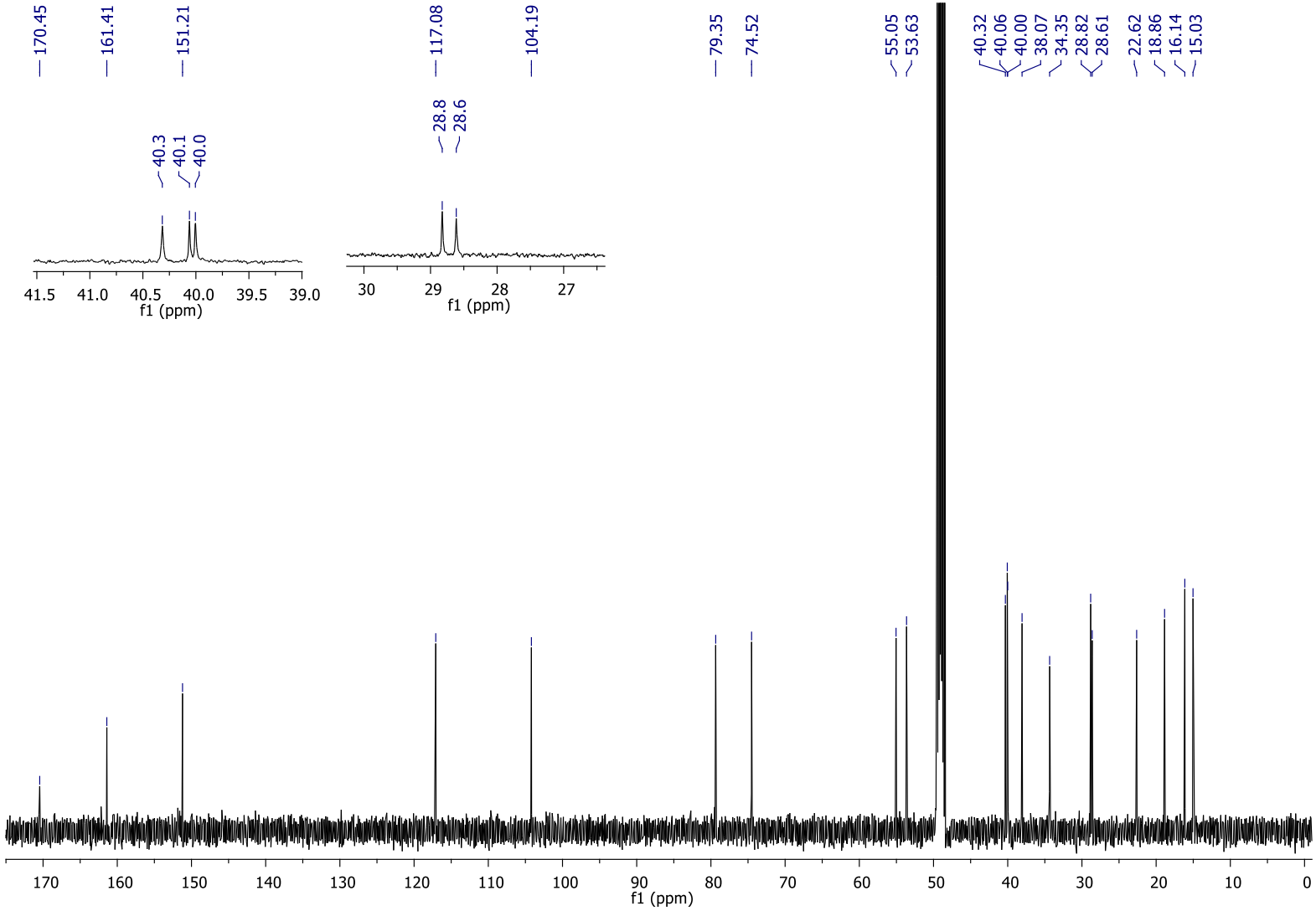
APÊNDICE 24: Espectro de NOE diff do derivado Ce9, irradiação do *s* em δ_H 1,27 (H-16) e do *td* em δ_H 3,81 (H-6) (CD_3OD)



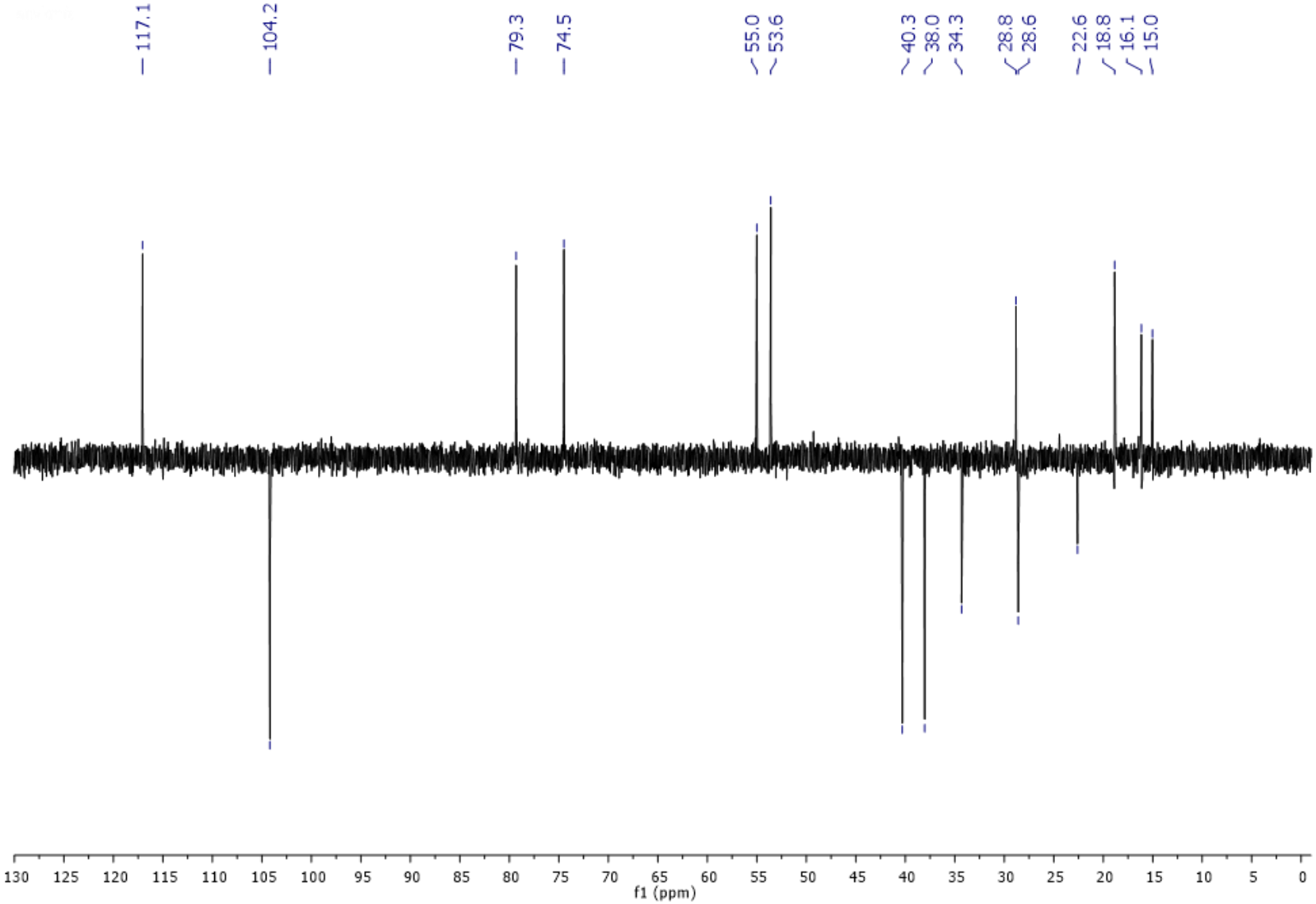
APÊNDICE 25: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado An15 (CD_3OD, 500 MHz)



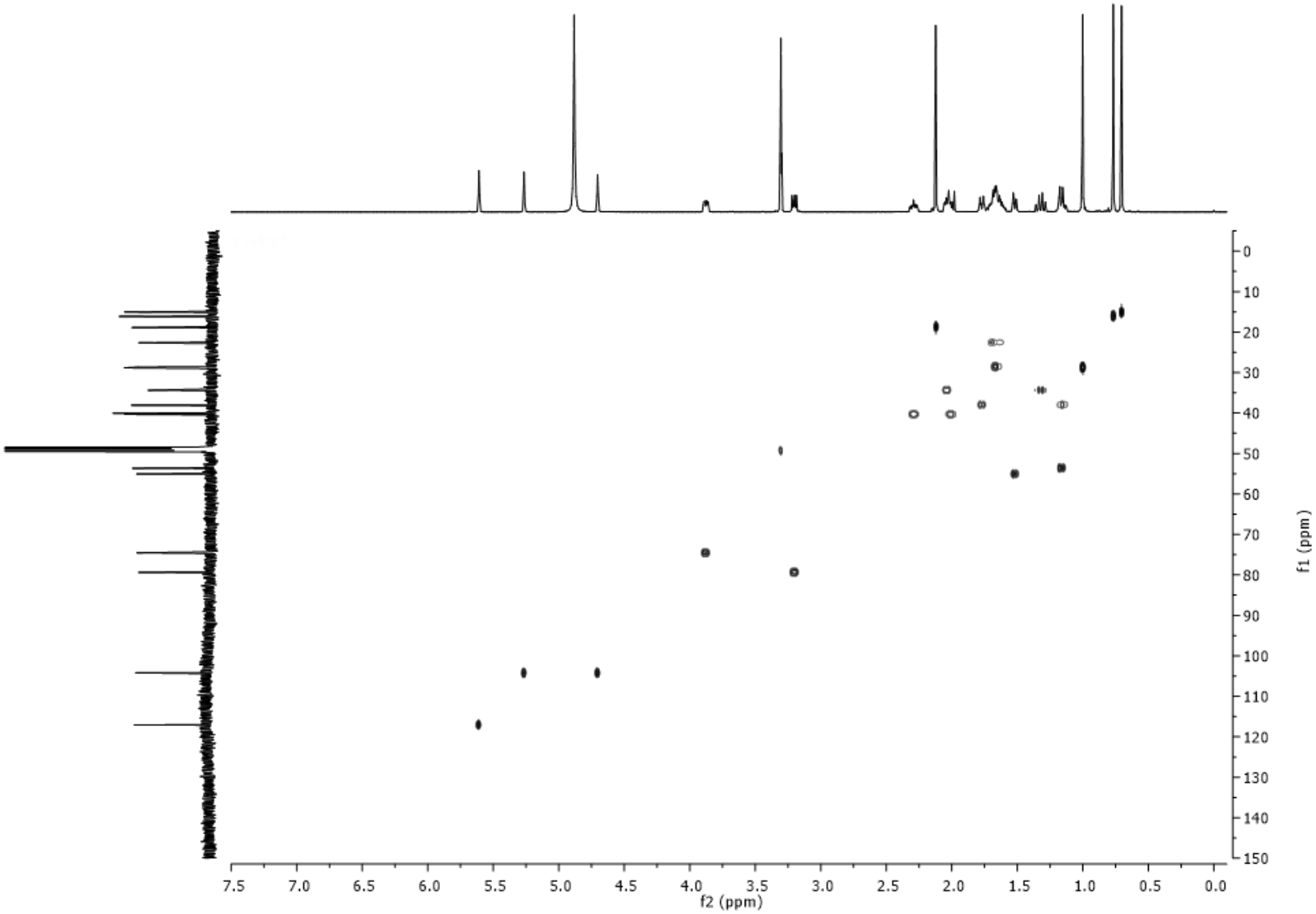
APÊNDICE 26: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado An15 (CD_3OD, 125 MHz)



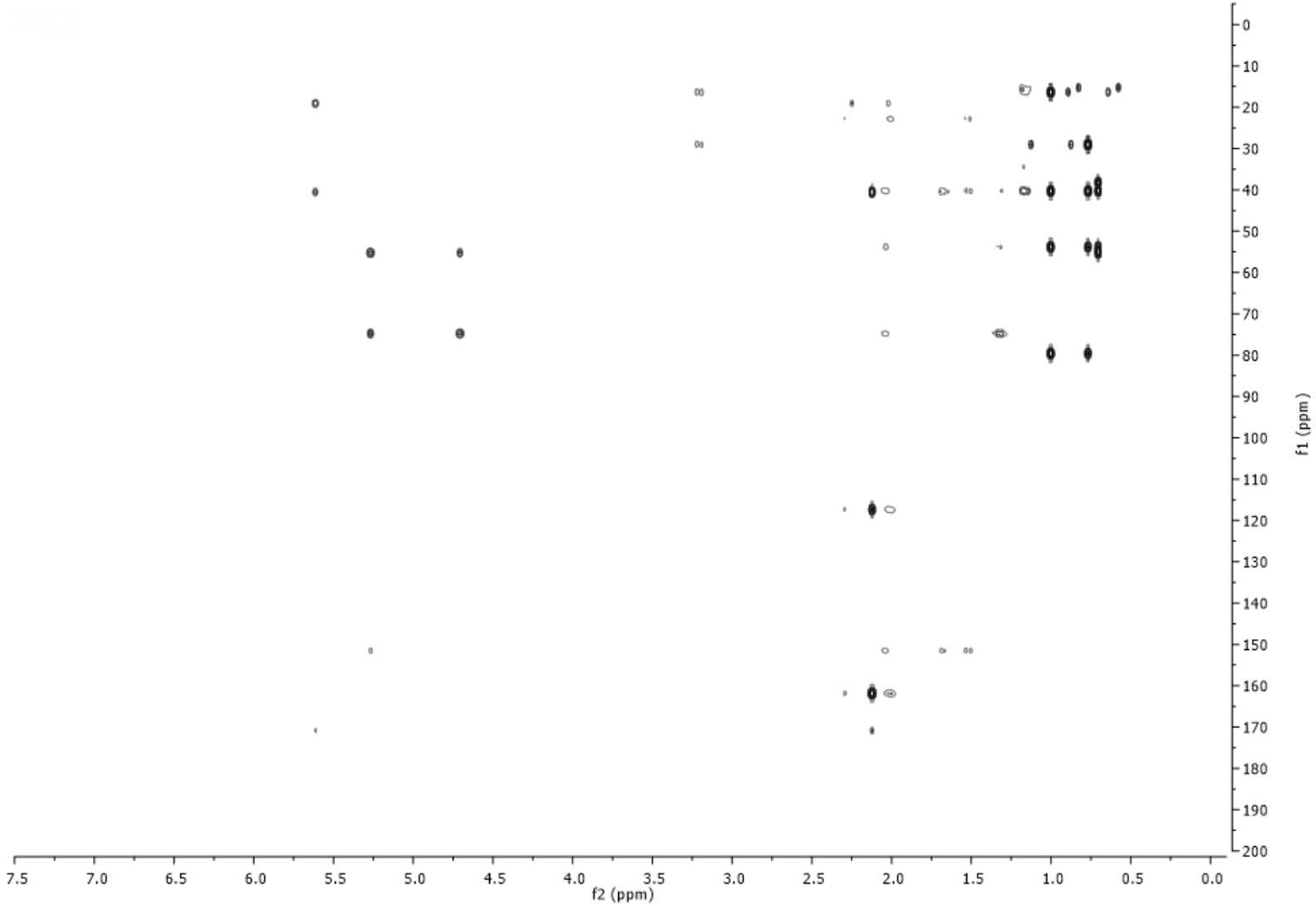
APÊNDICE 27: Espectro de DEPT 135° do derivado An15 (CD_3OD, 125 MHz)



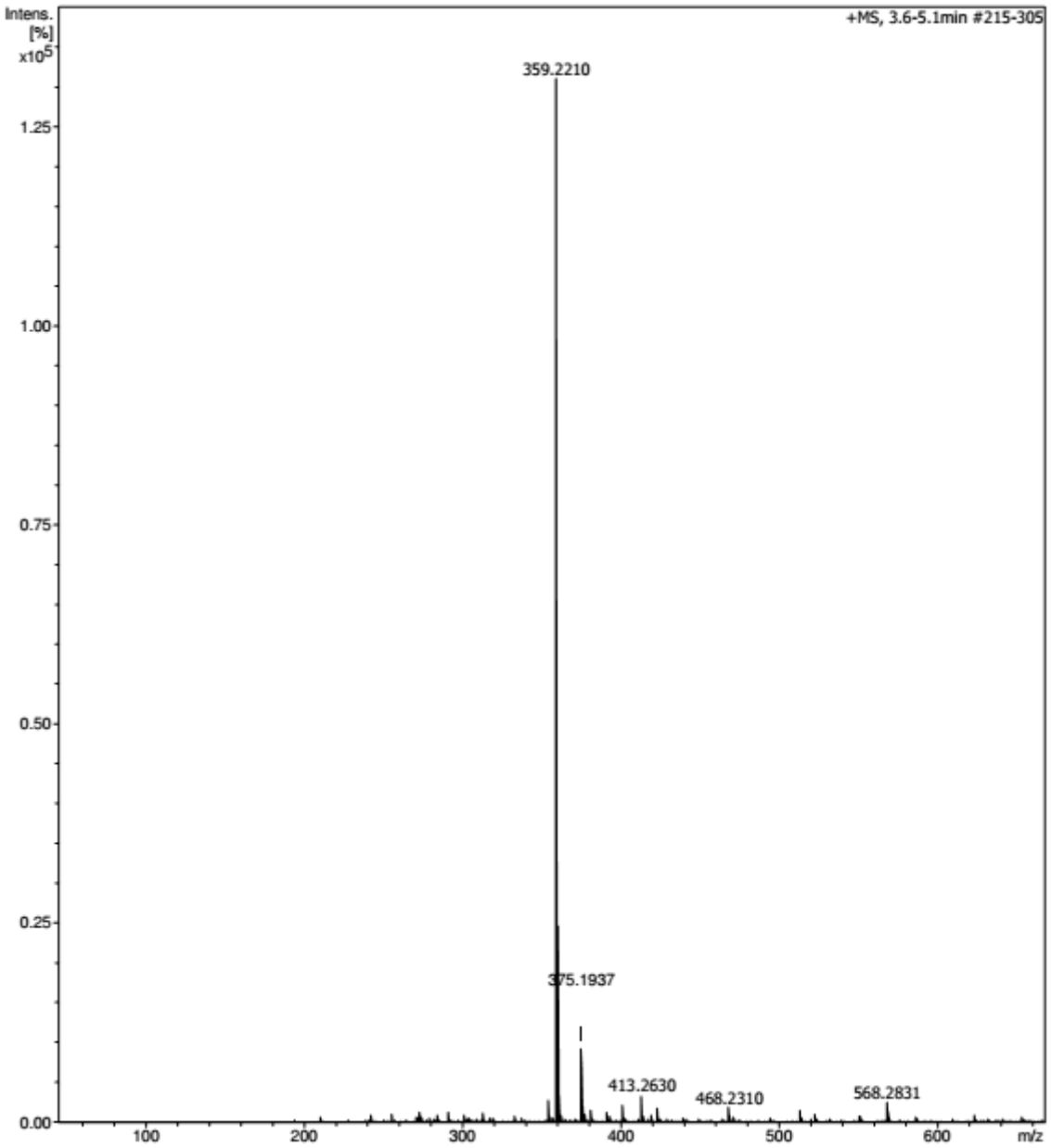
APÊNDICE 28: Mapa de contornos HMQC do derivado An15 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



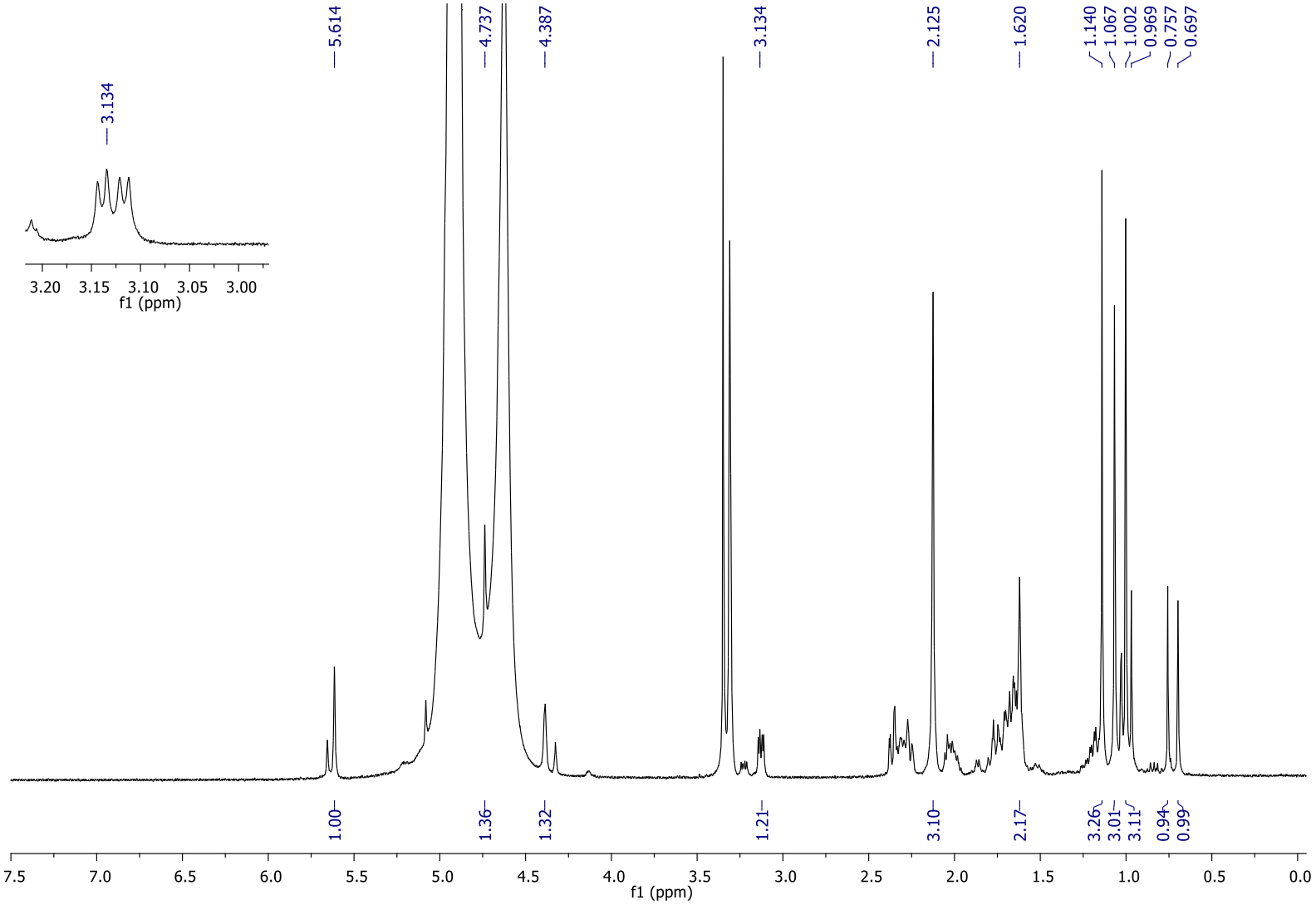
APÊNDICE 29: Mapa de contornos HMBC do derivado An15 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



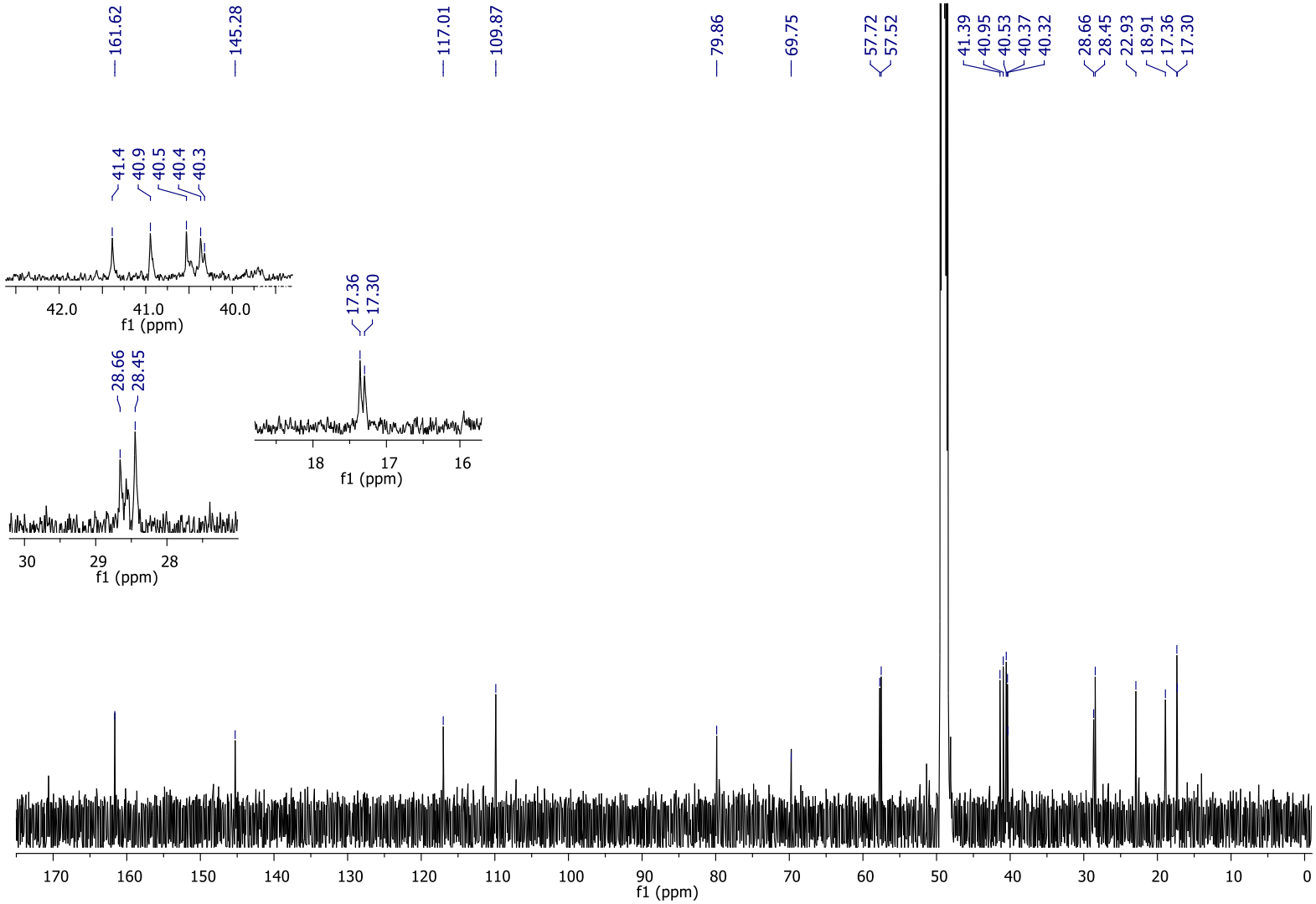
APÊNDICE 30: Espectro de massas de alta resolução do derivado An15



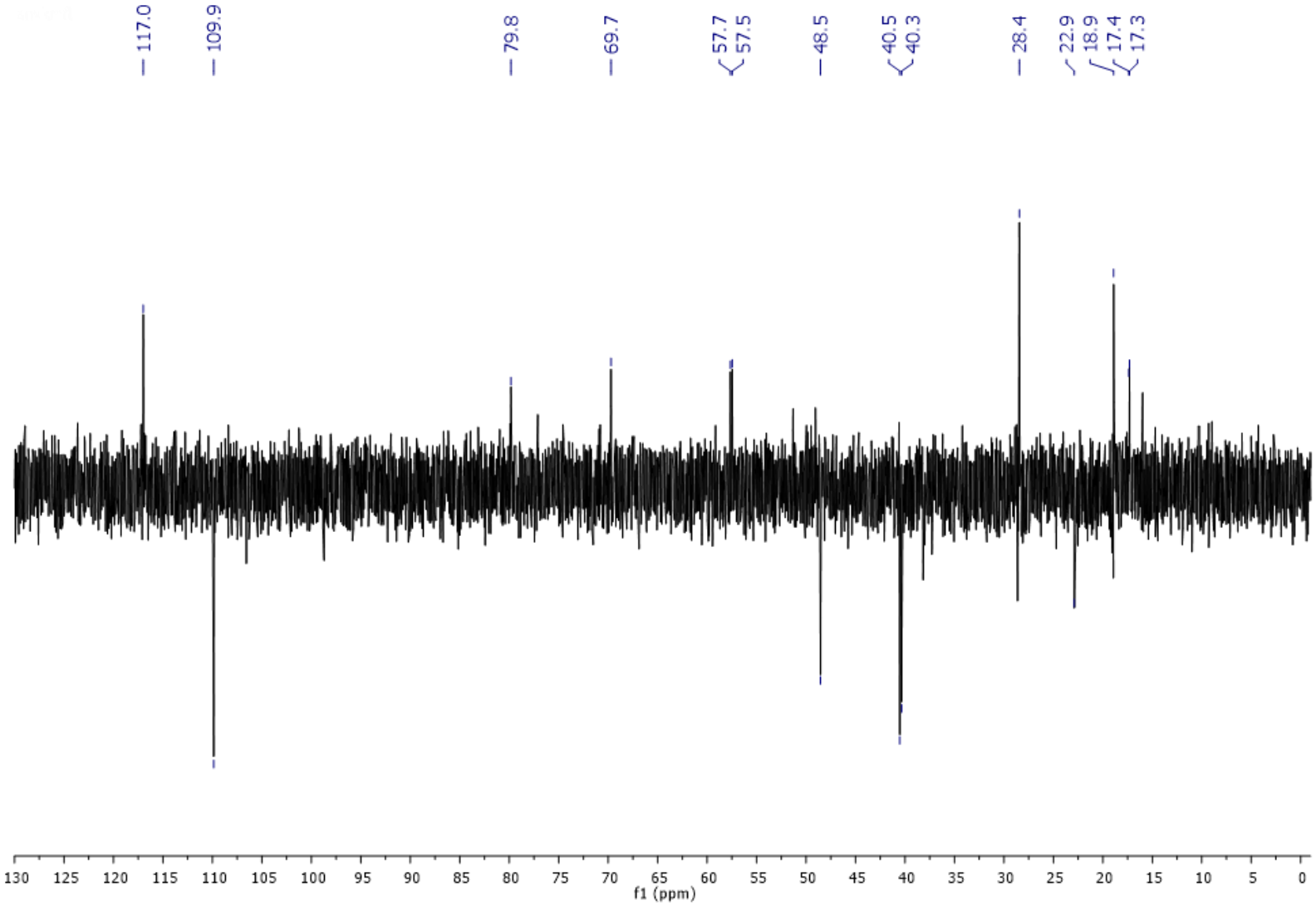
APÊNDICE 31: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado An16 (CD_3OD, 500 MHz)



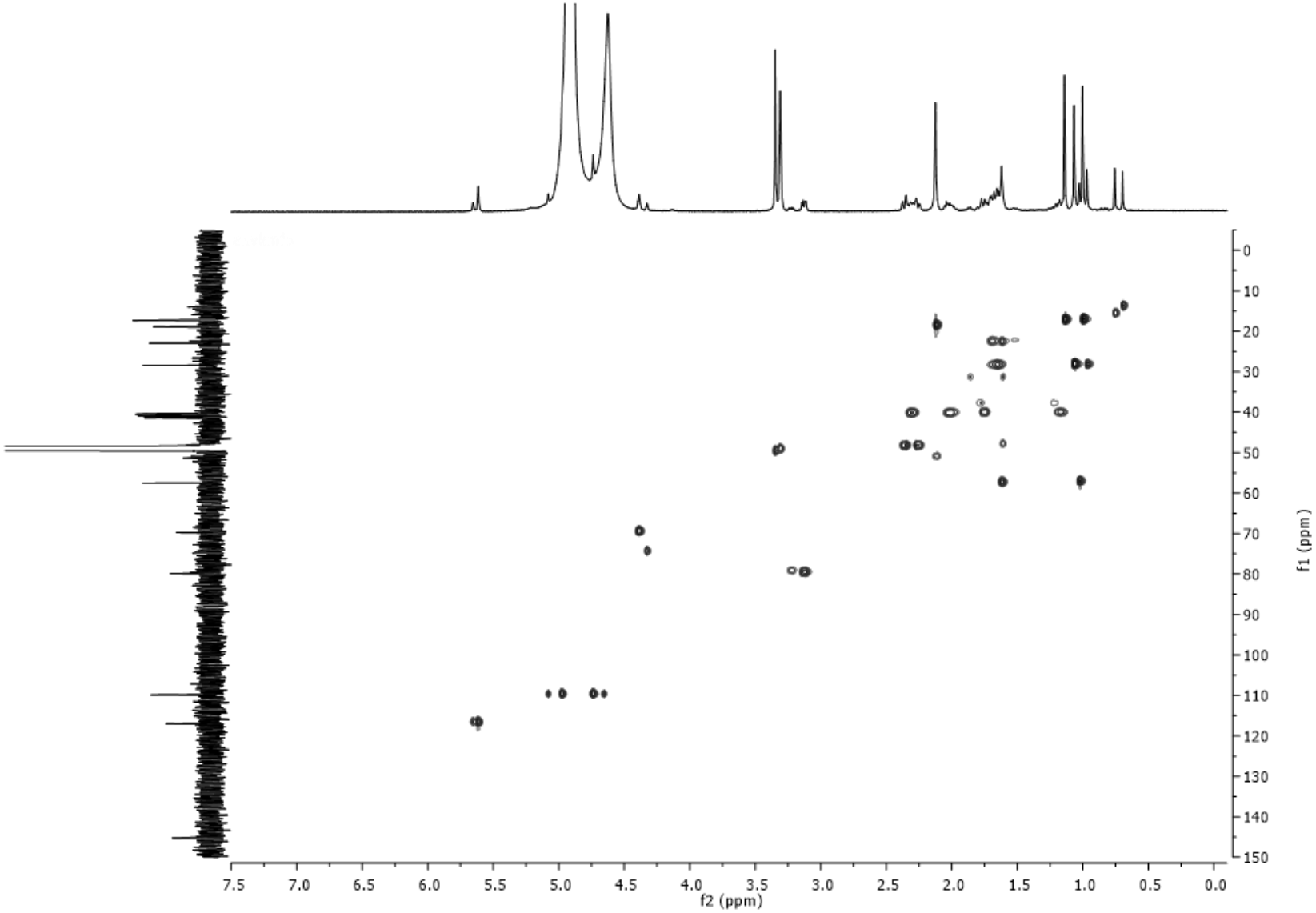
APÊNDICE 32: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado An16 (CD_3OD, 125 MHz)



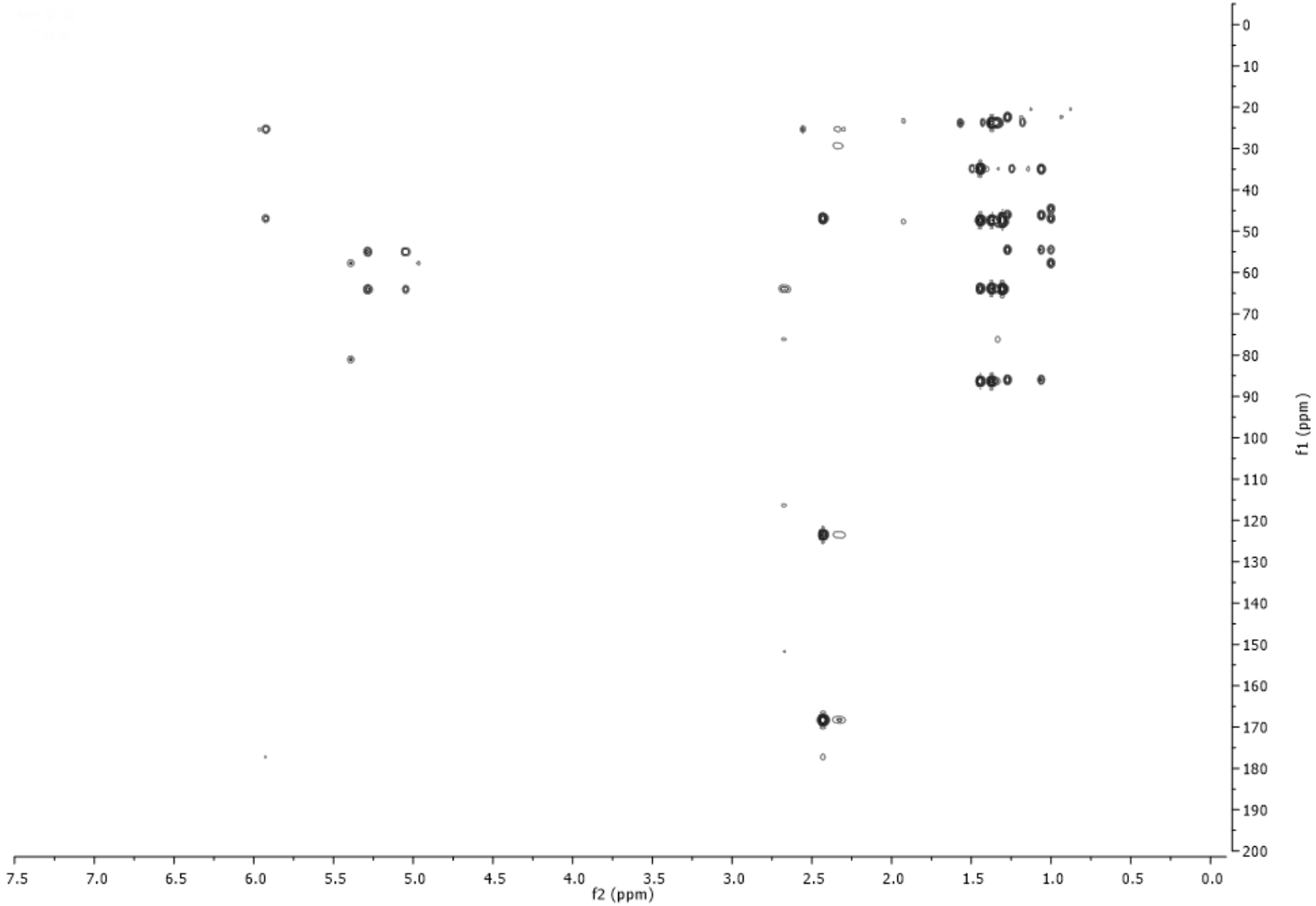
APÊNDICE 33: Espectro de DEPT 135° do derivado An16 (CD_3OD, 125 MHz)



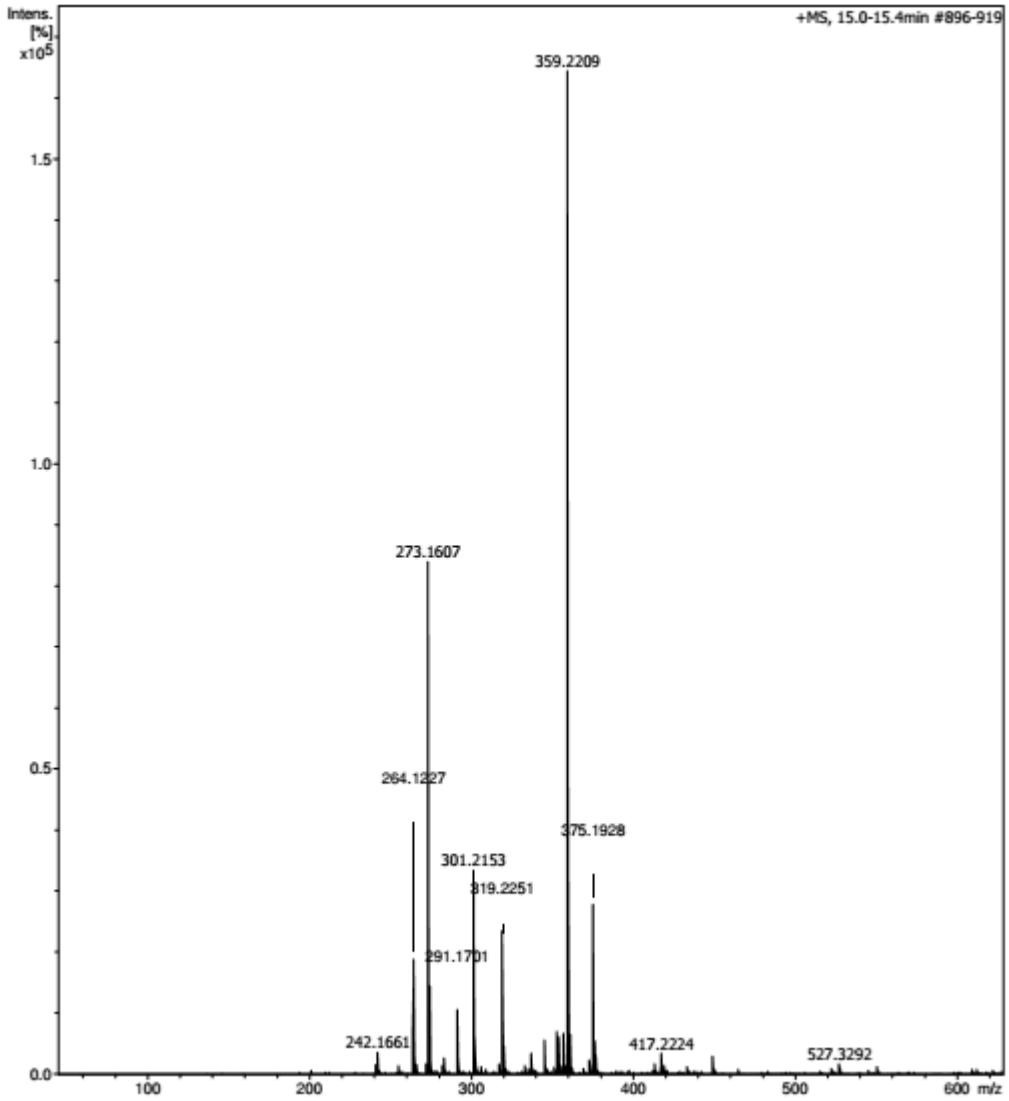
APÊNDICE 34: Mapa de contornos HMQC do derivado An16 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



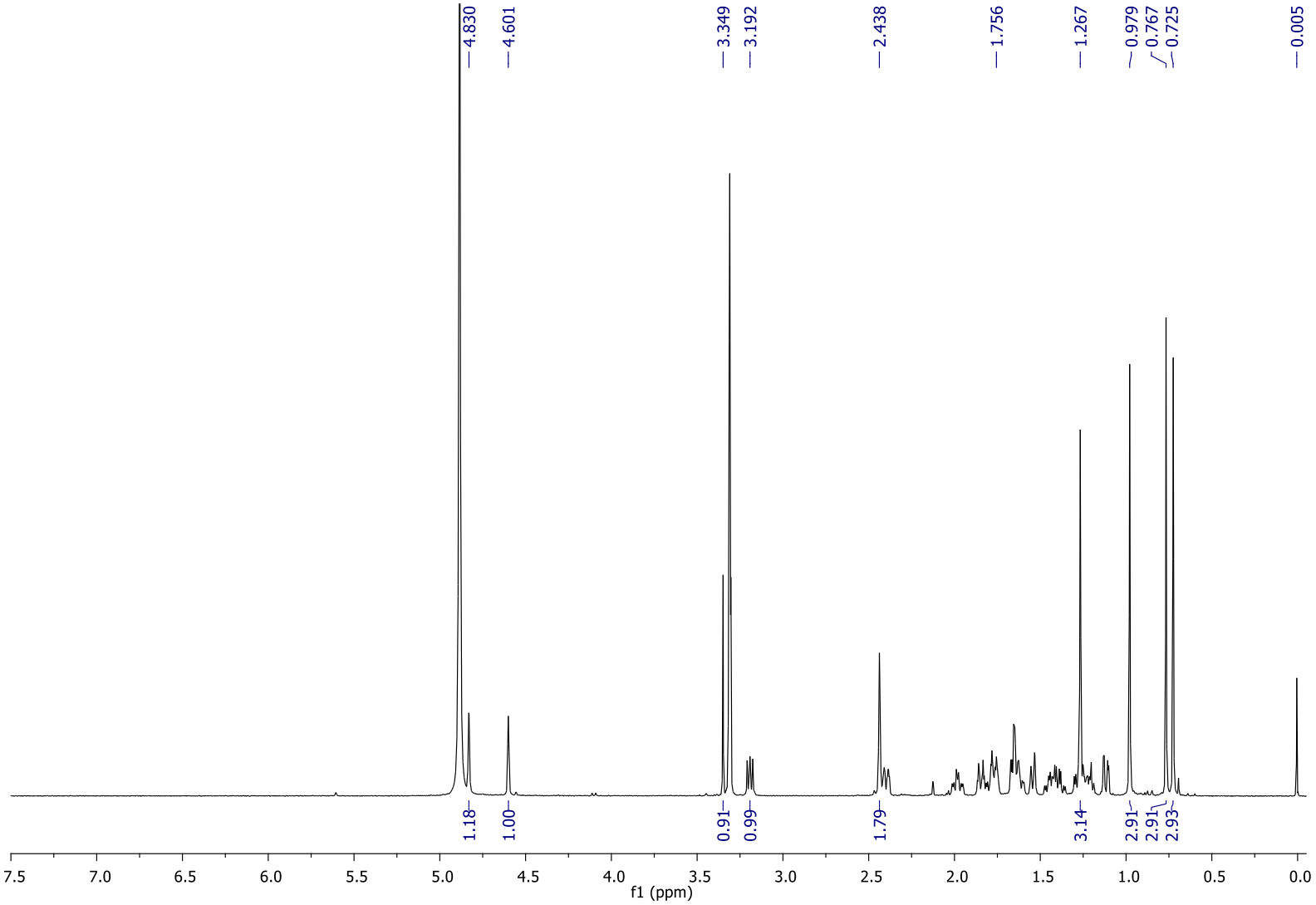
APÊNDICE 35: Mapa de contornos HMBC do derivado An16 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



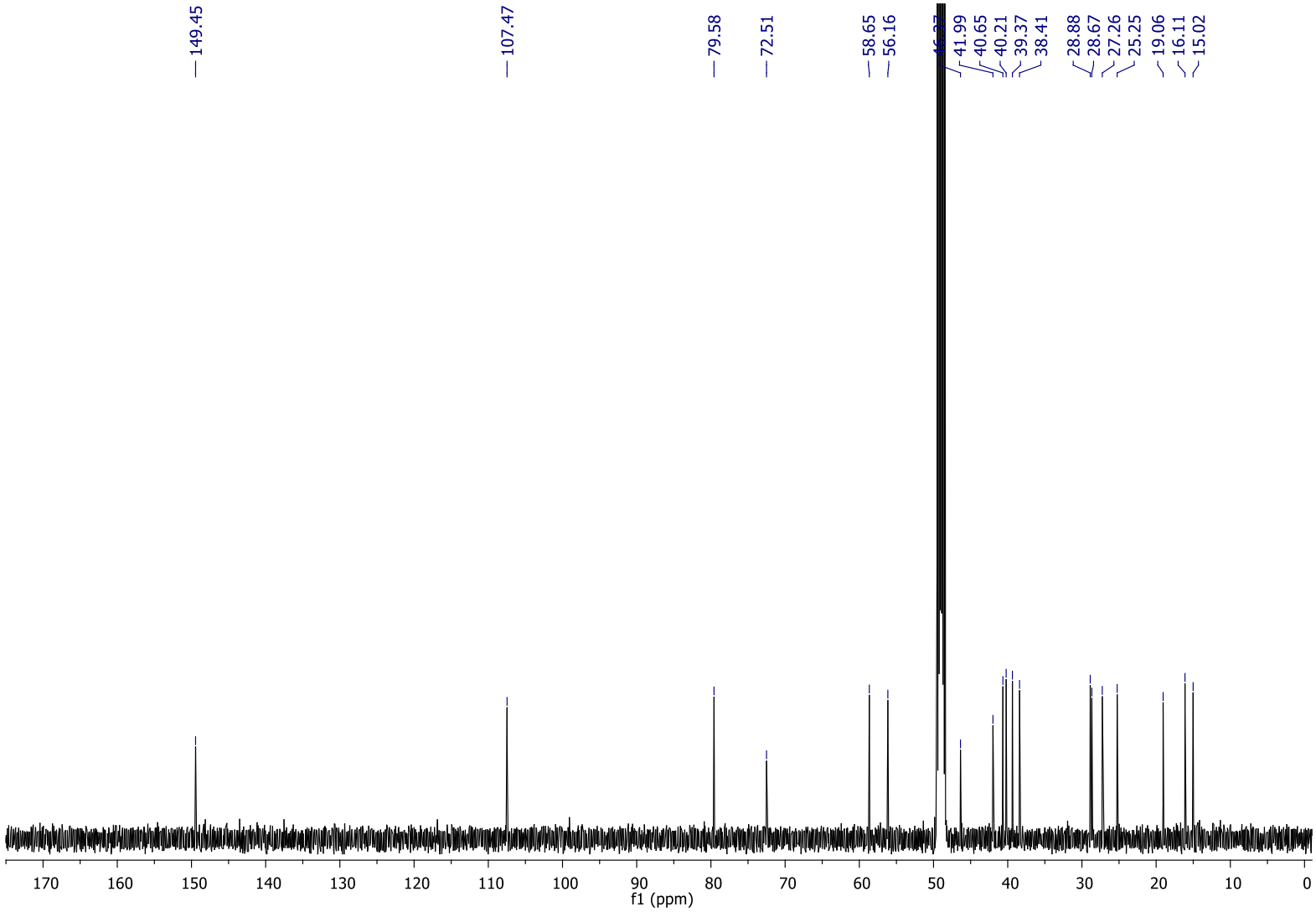
APÊNDICE 36: Espectro de massas de alta resolução do derivado An16



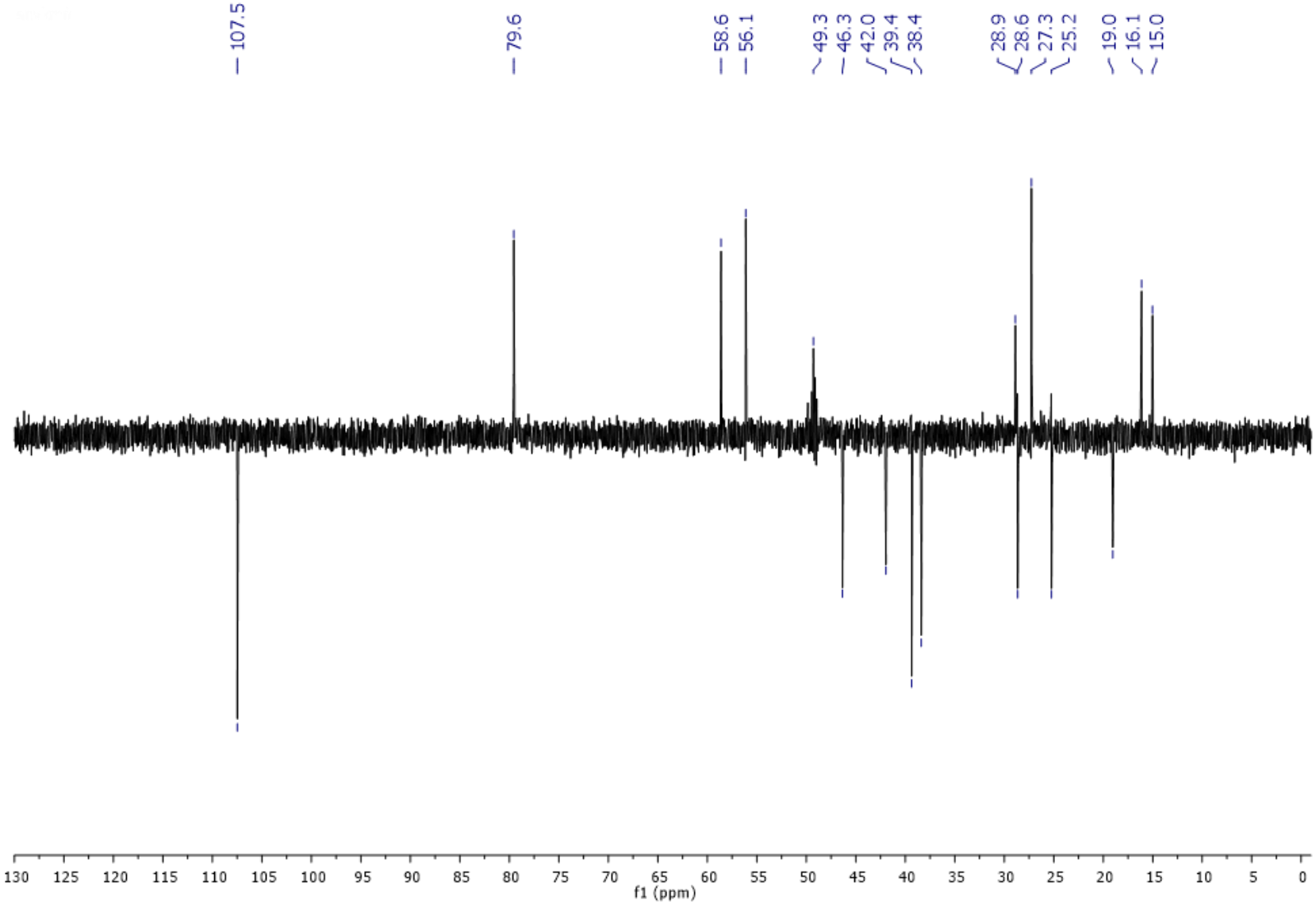
APÊNDICE 37: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado An17 (CD_3OD, 500 MHz)



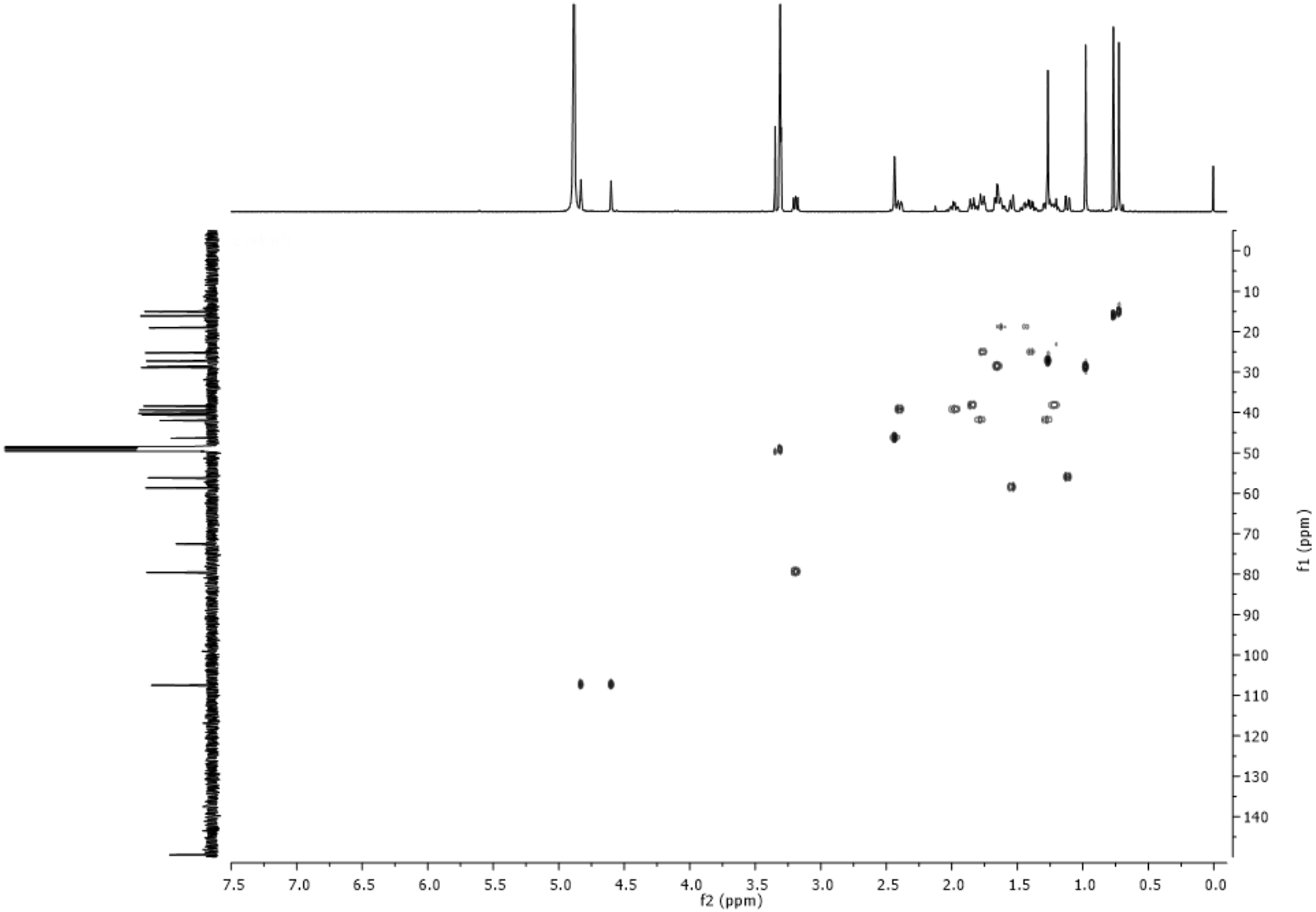
APÊNDICE 38: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado An17 (CD_3OD, 125 MHz)



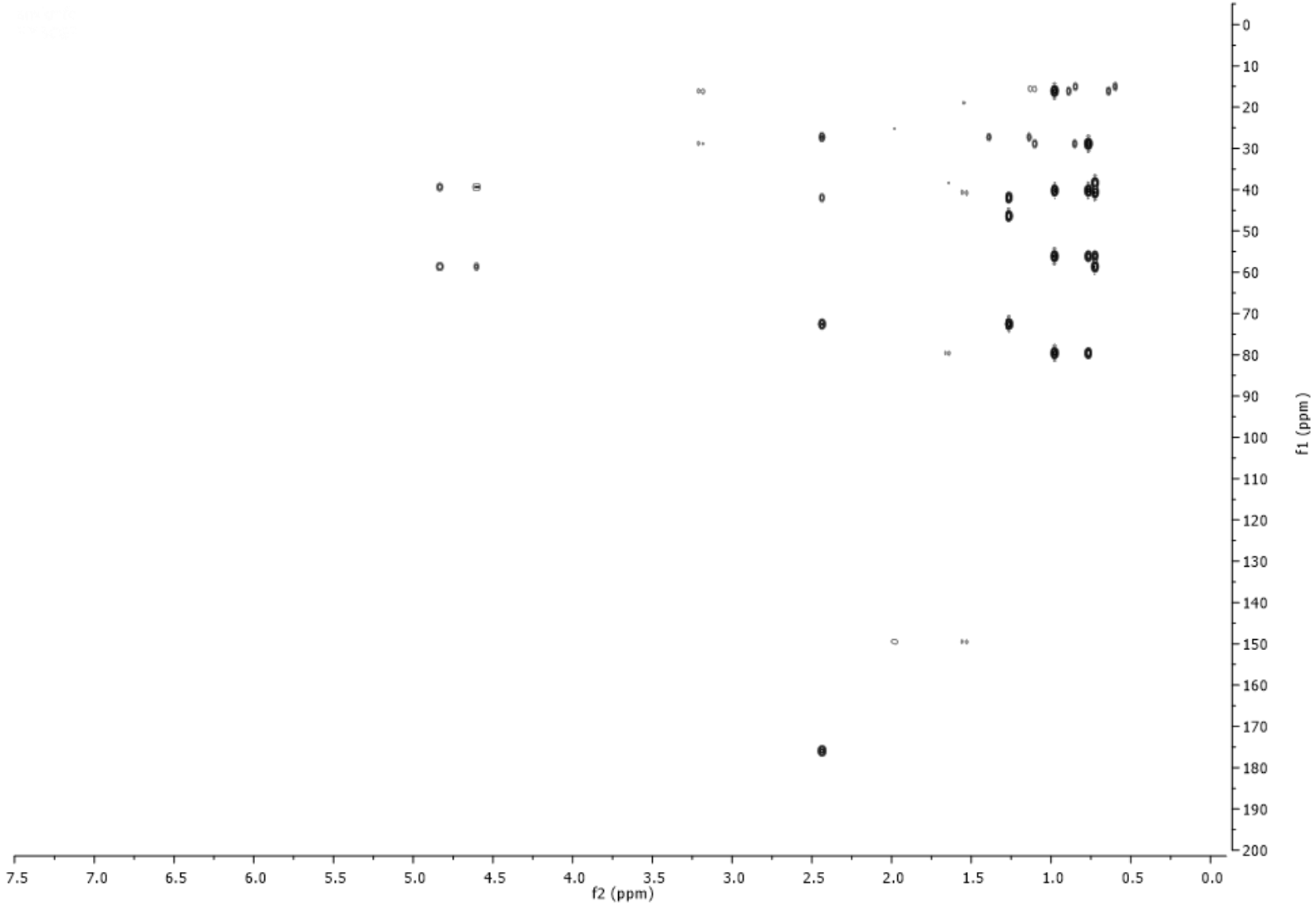
APÊNDICE 39: Espectro de DEPT 135° do derivado An17 (CD_3OD, 125 MHz)



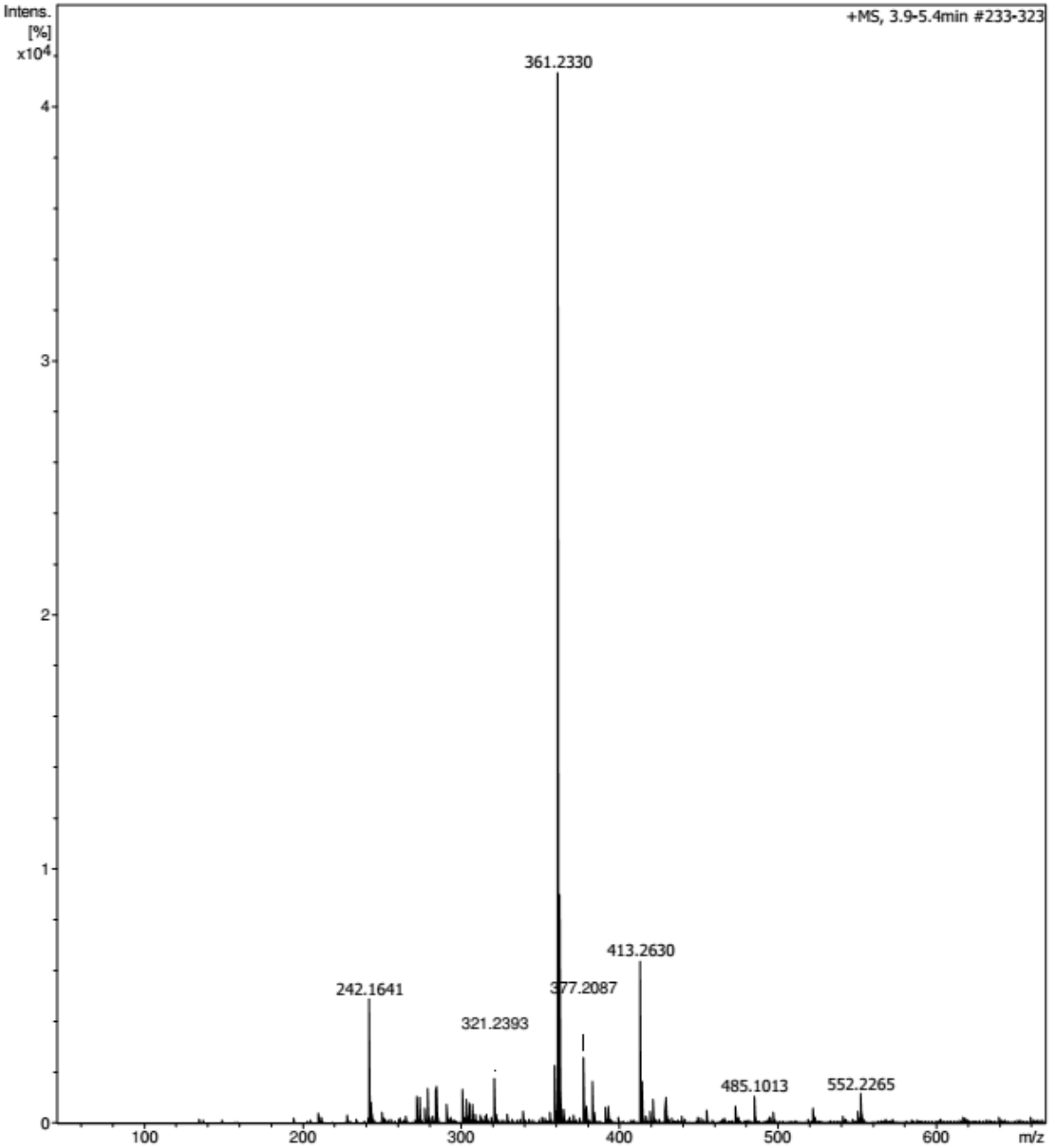
APÊNDICE 40: Mapa de contornos HMQC do derivado An17 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



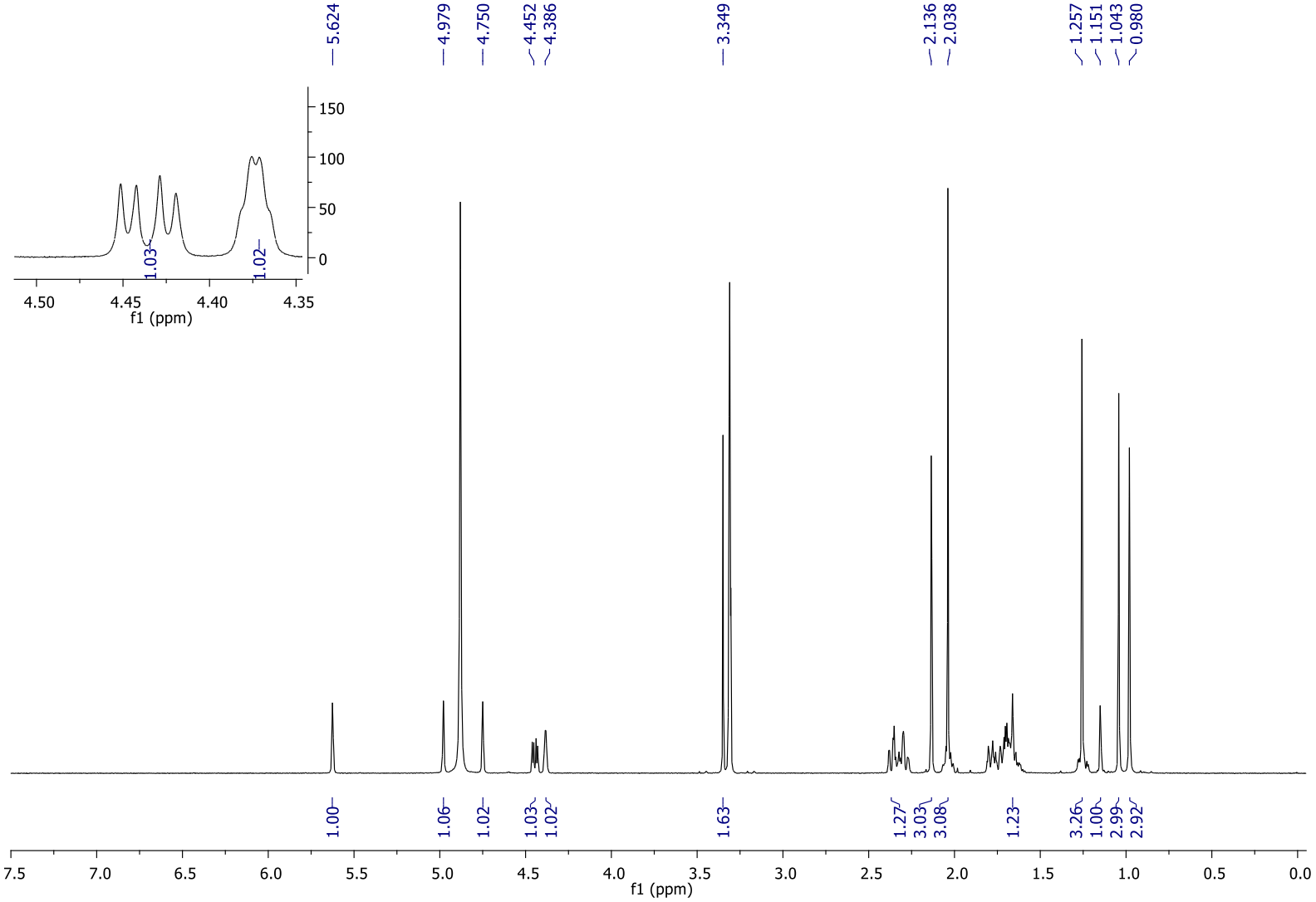
APÊNDICE 41: Mapa de contornos HMBC do derivado An17 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



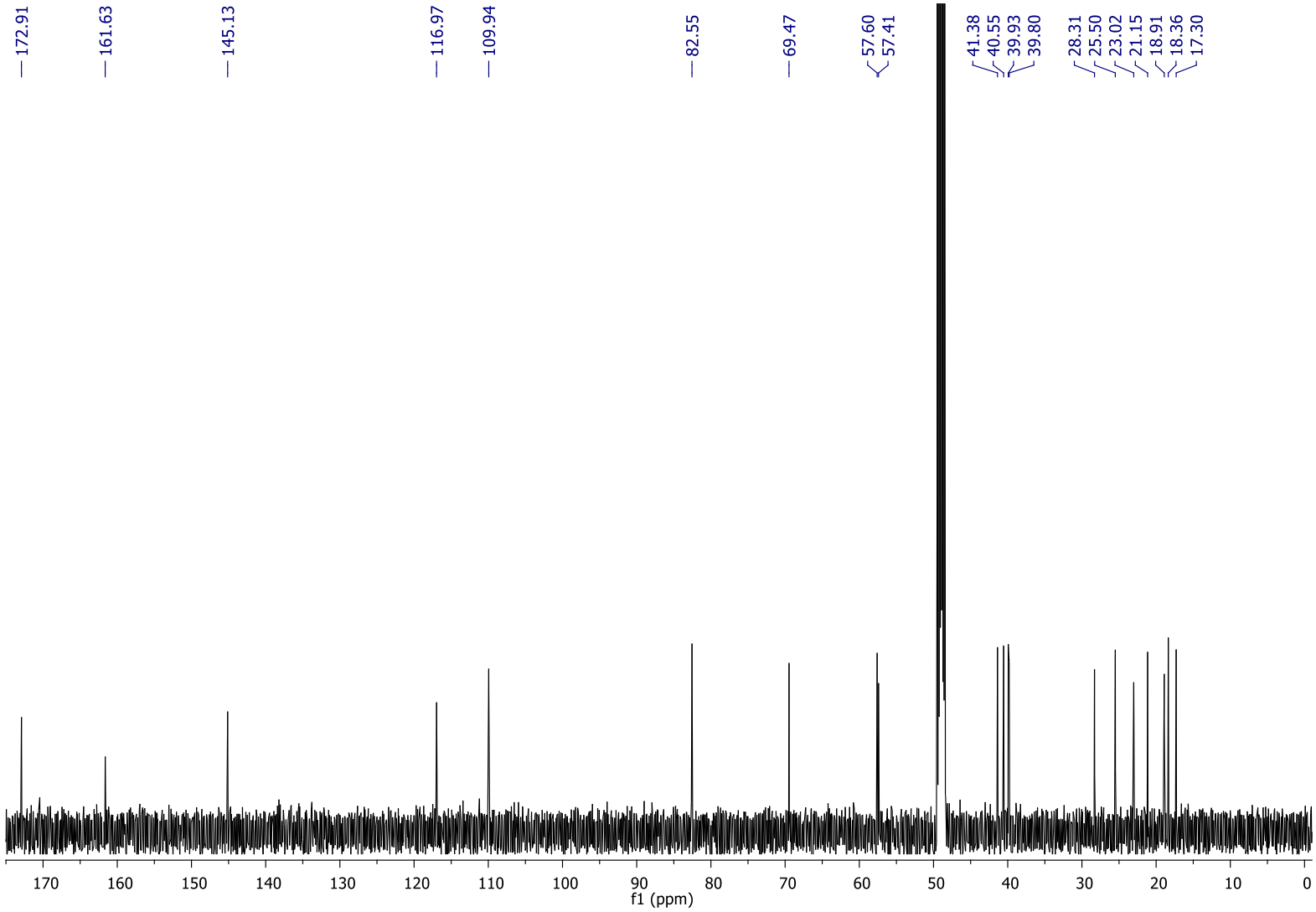
APÊNDICE 42: Espectro de massas de alta resolução do derivado An17



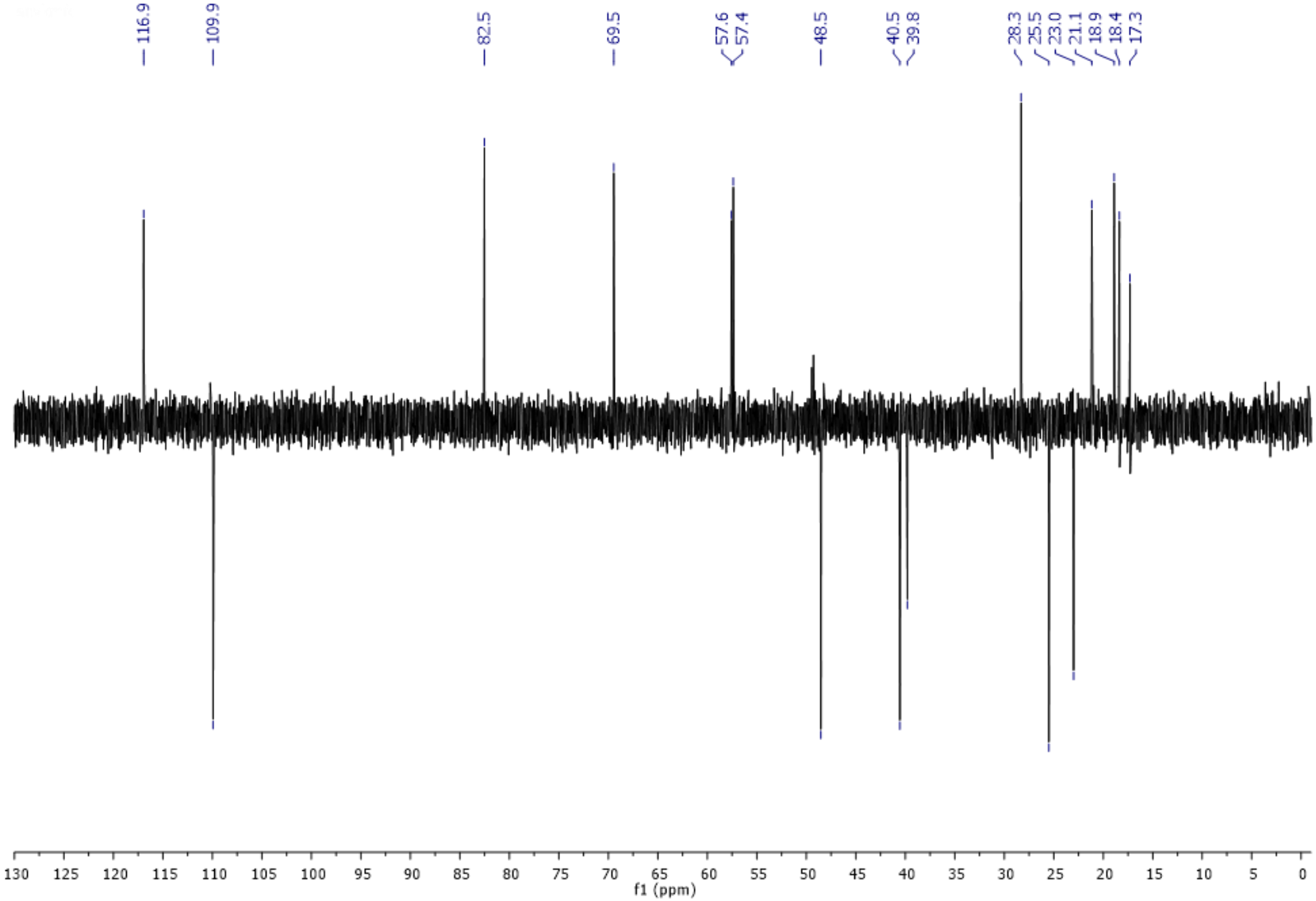
APÊNDICE 43: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado An18 (CD_3OD, 500 MHz)



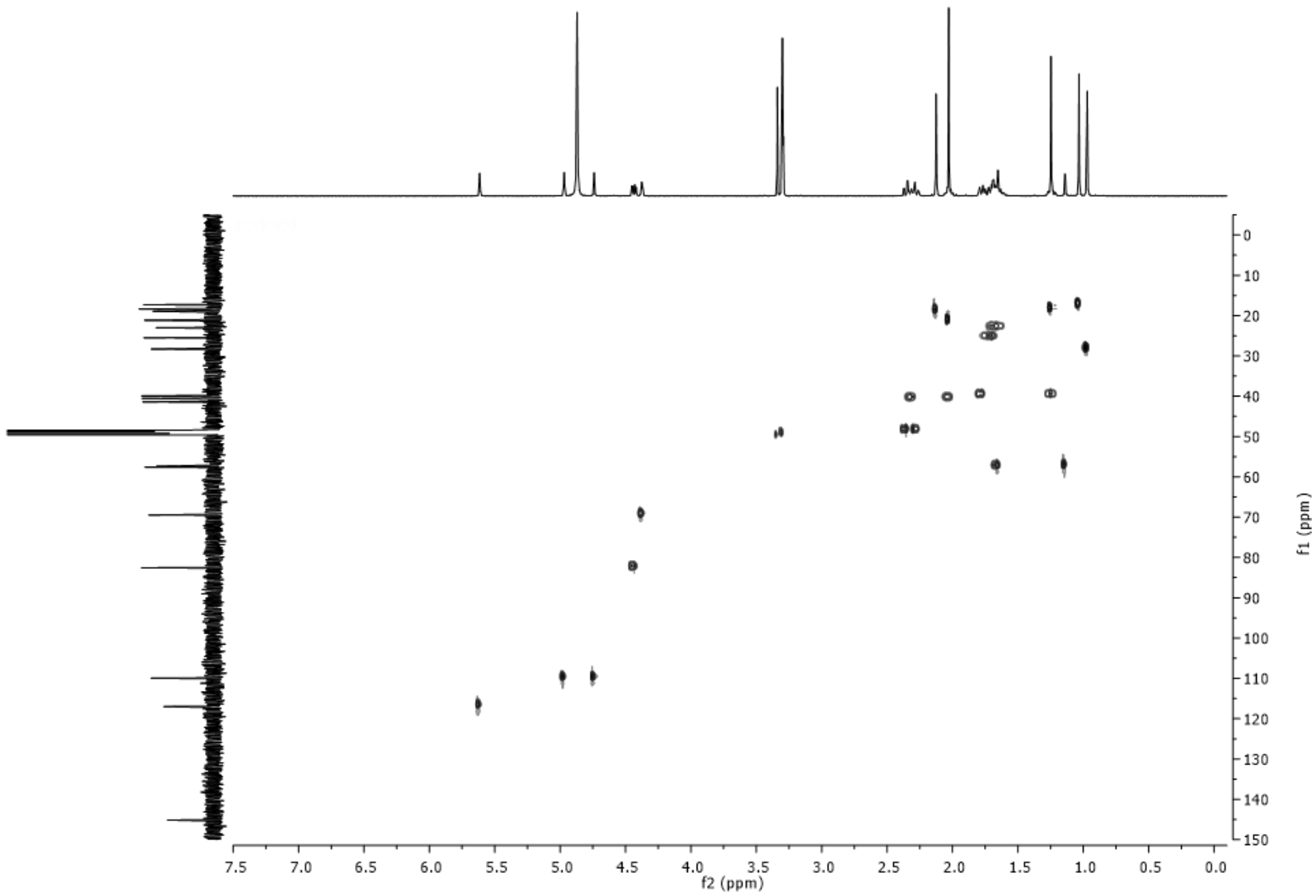
APÊNDICE 44: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado An18 (CD_3OD, 125 MHz)



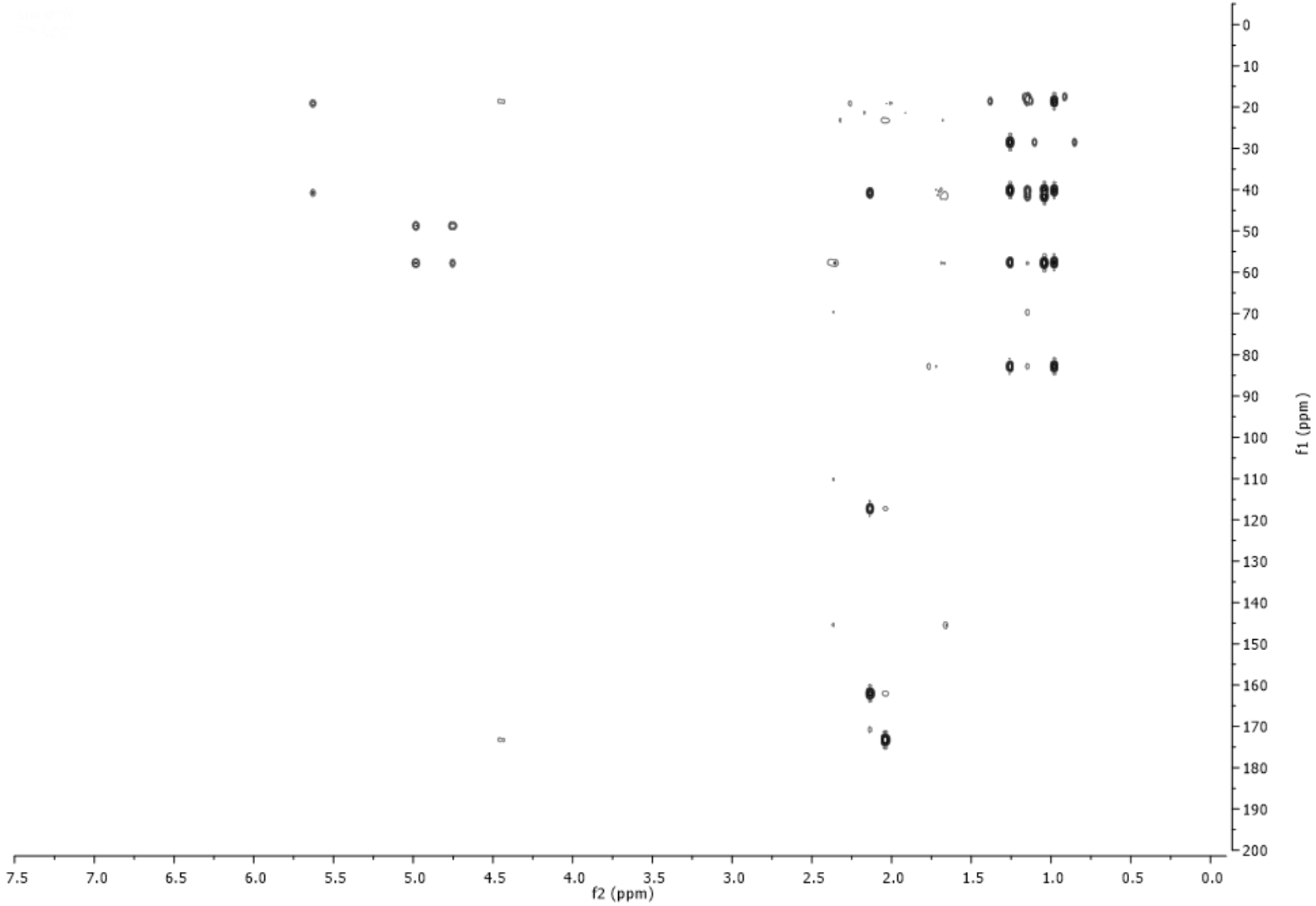
APÊNDICE 45: Espectro de DEPT 135° do derivado An18 (CD_3OD, 125 MHz)



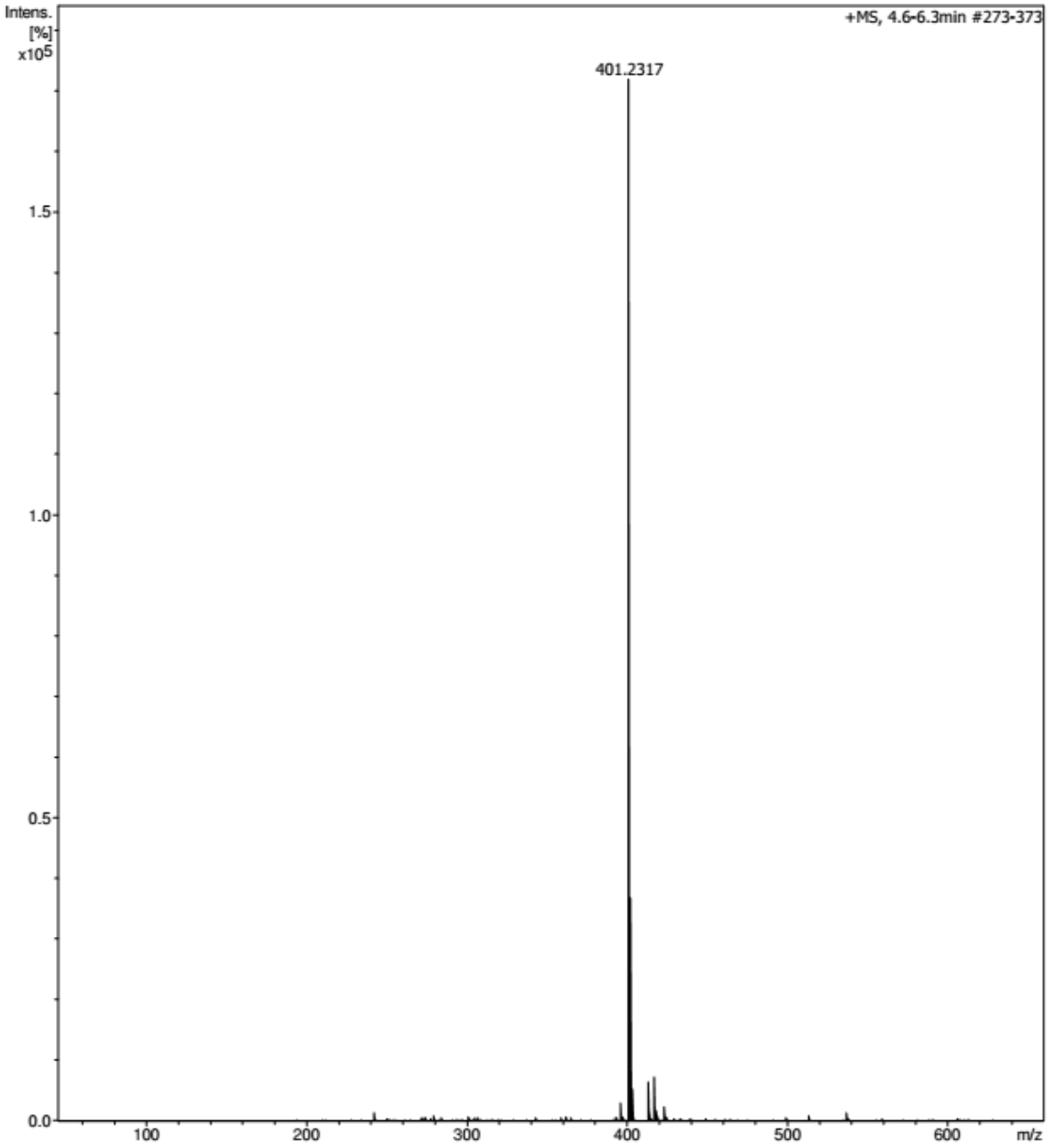
APÊNDICE 46: Mapa de contornos HMQC do derivado An18 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



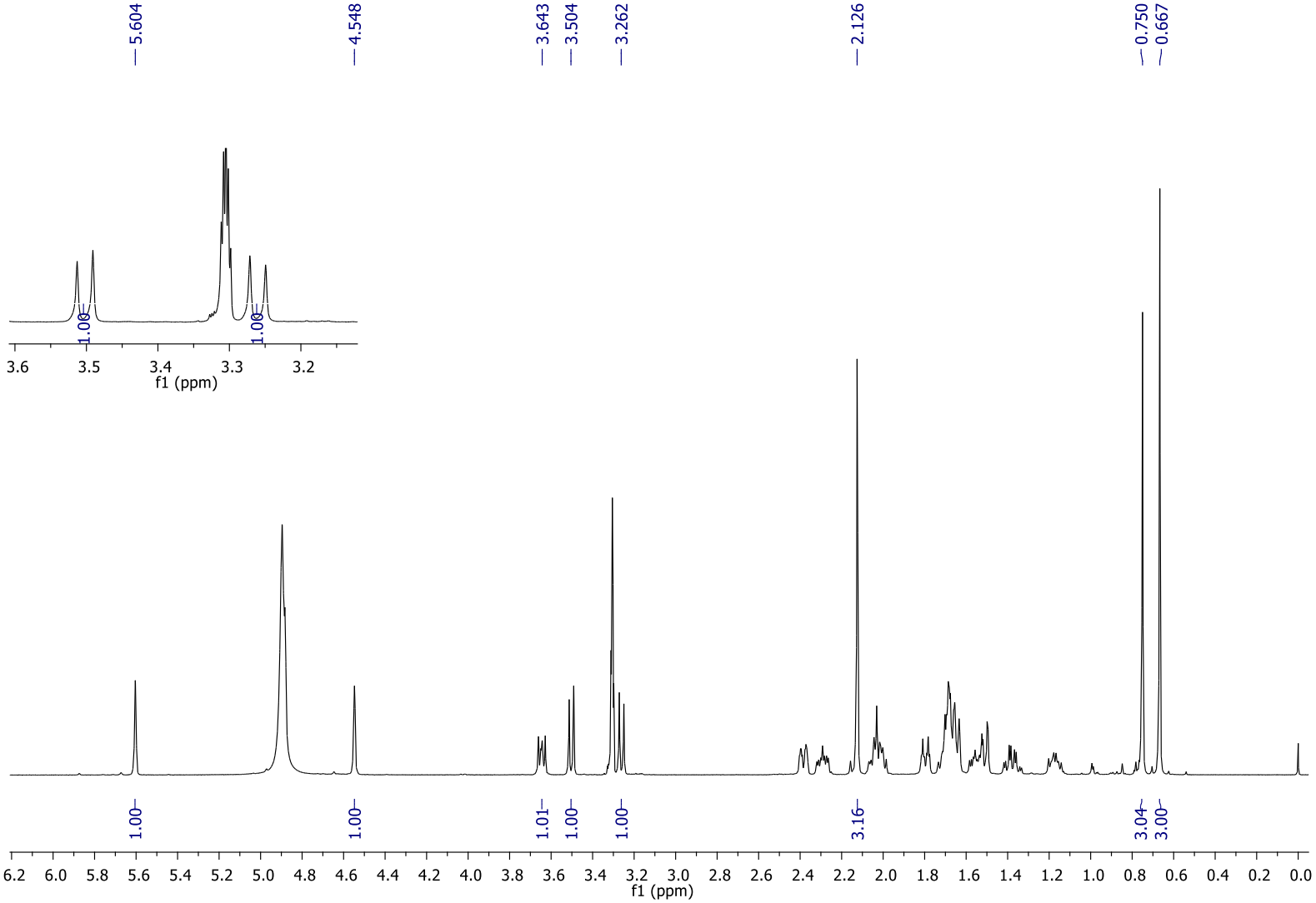
APÊNDICE 47: Mapa de contornos HMBC do derivado An18 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



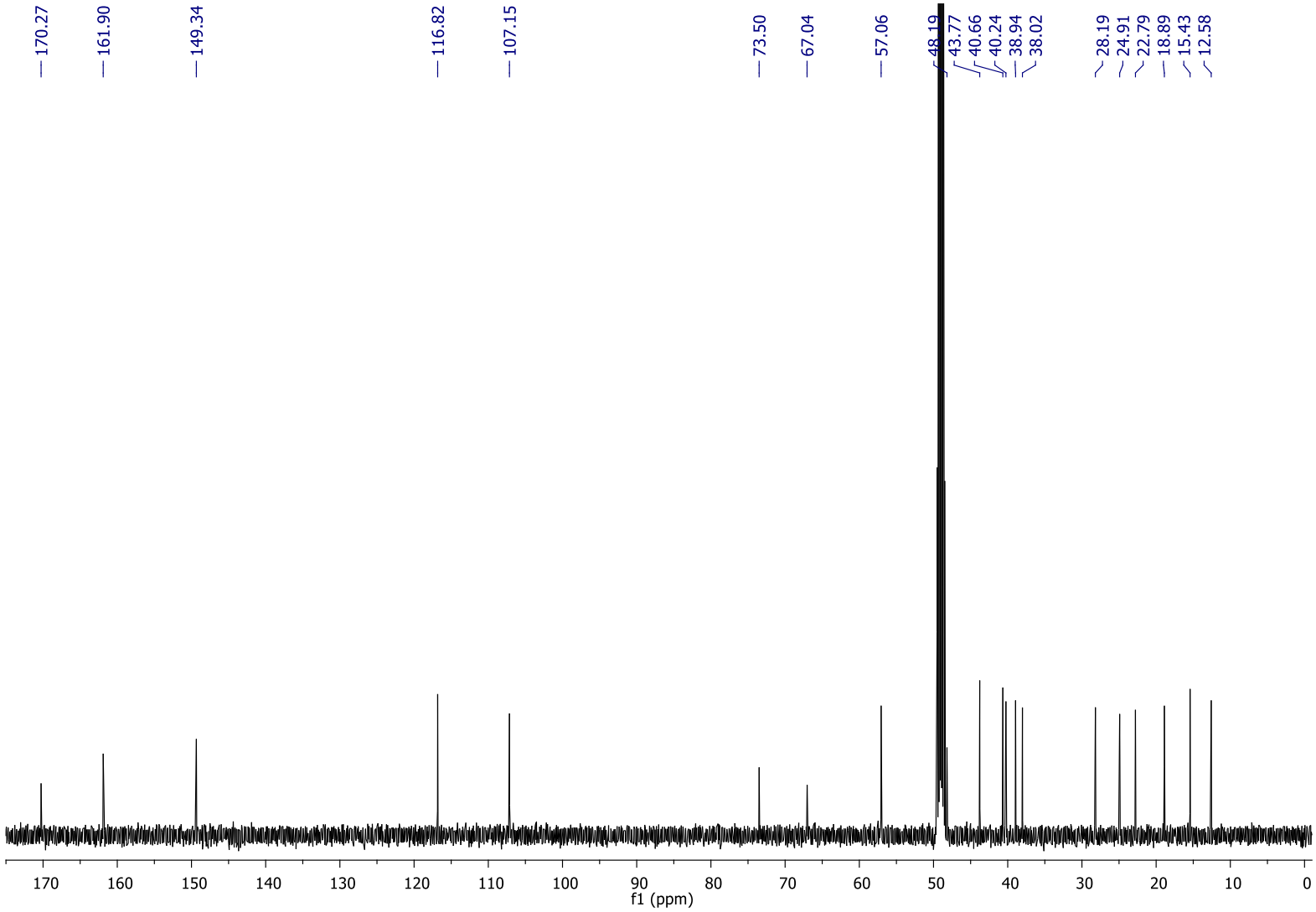
APÊNDICE 48: Espectro de massas de alta resolução do derivado An18



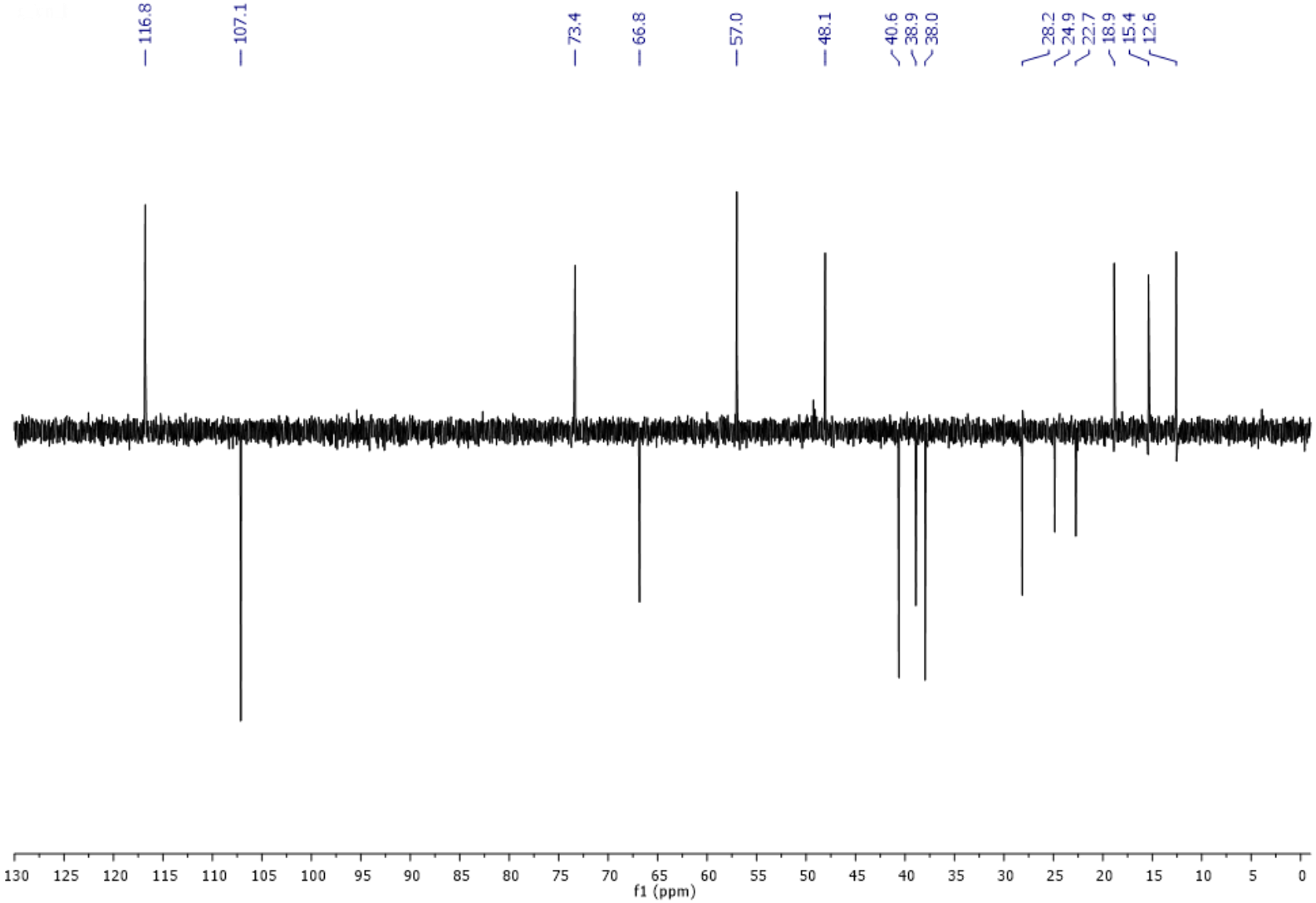
APÊNDICE 49: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Cl24 (CD_3OD, 500 MHz)



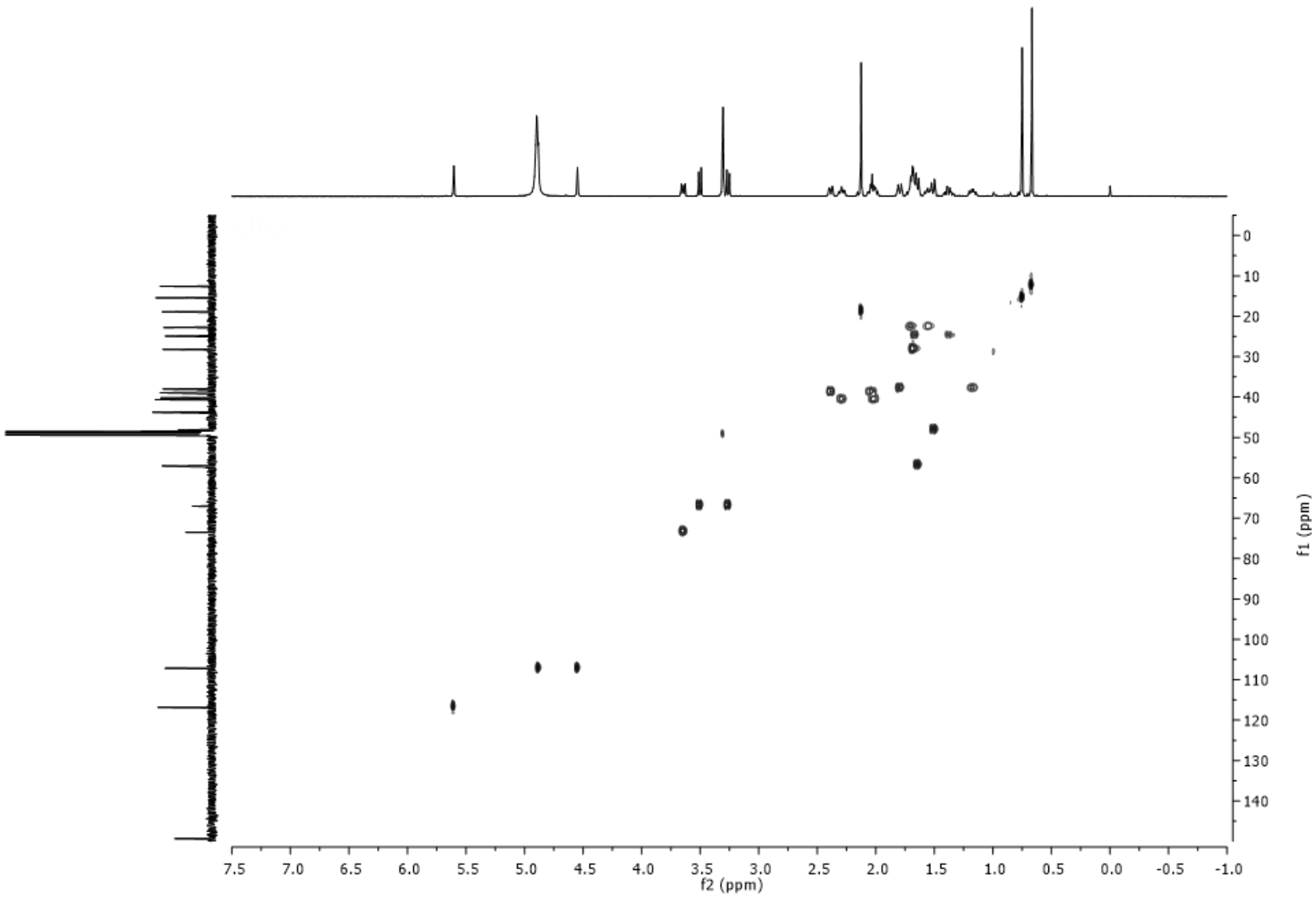
APÊNDICE 50: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Cl24 (CD_3OD, 125 MHz)



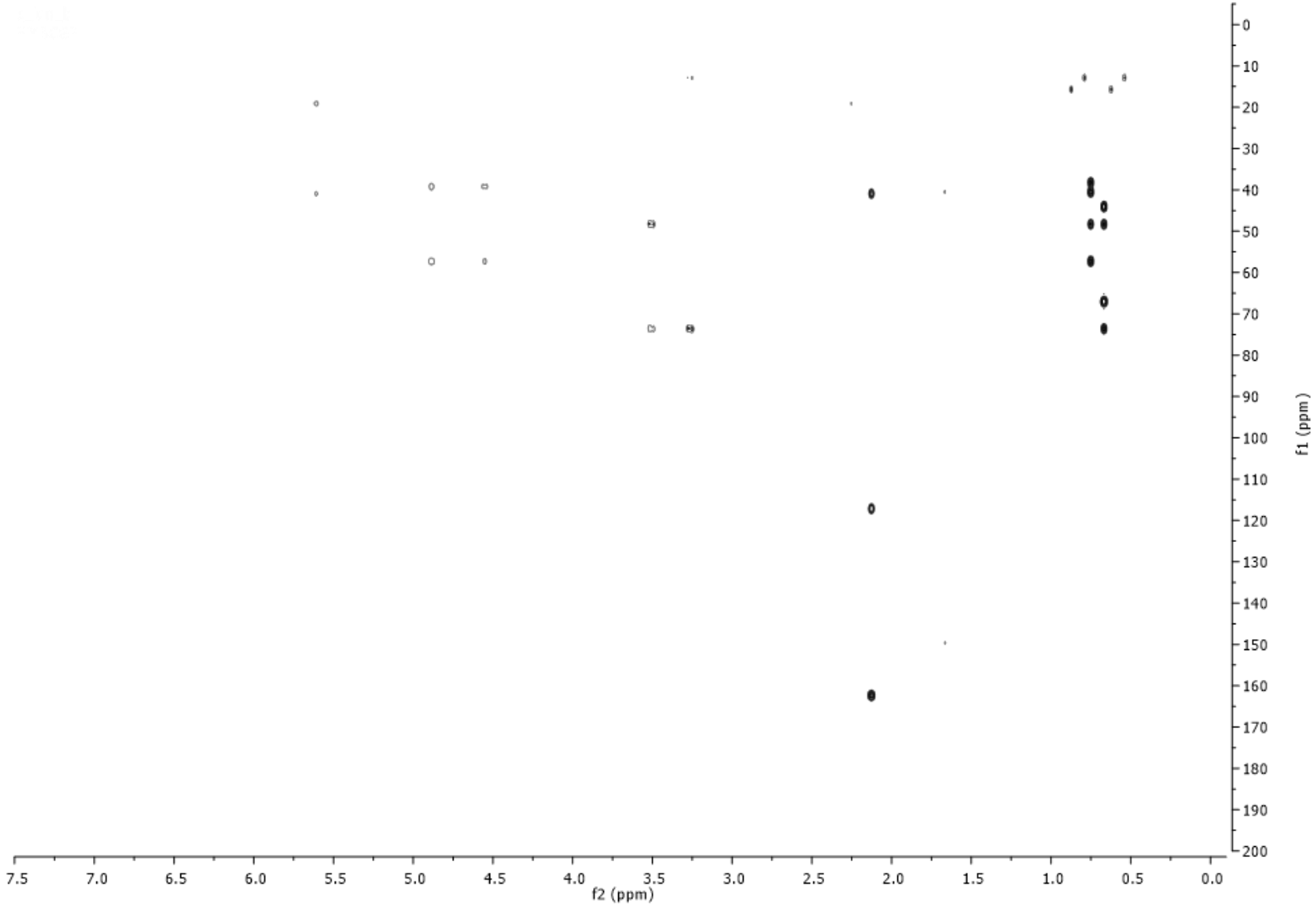
APÊNDICE 51: Espectro de DEPT 135° do derivado Cl24 (CD_3OD, 125 MHz)



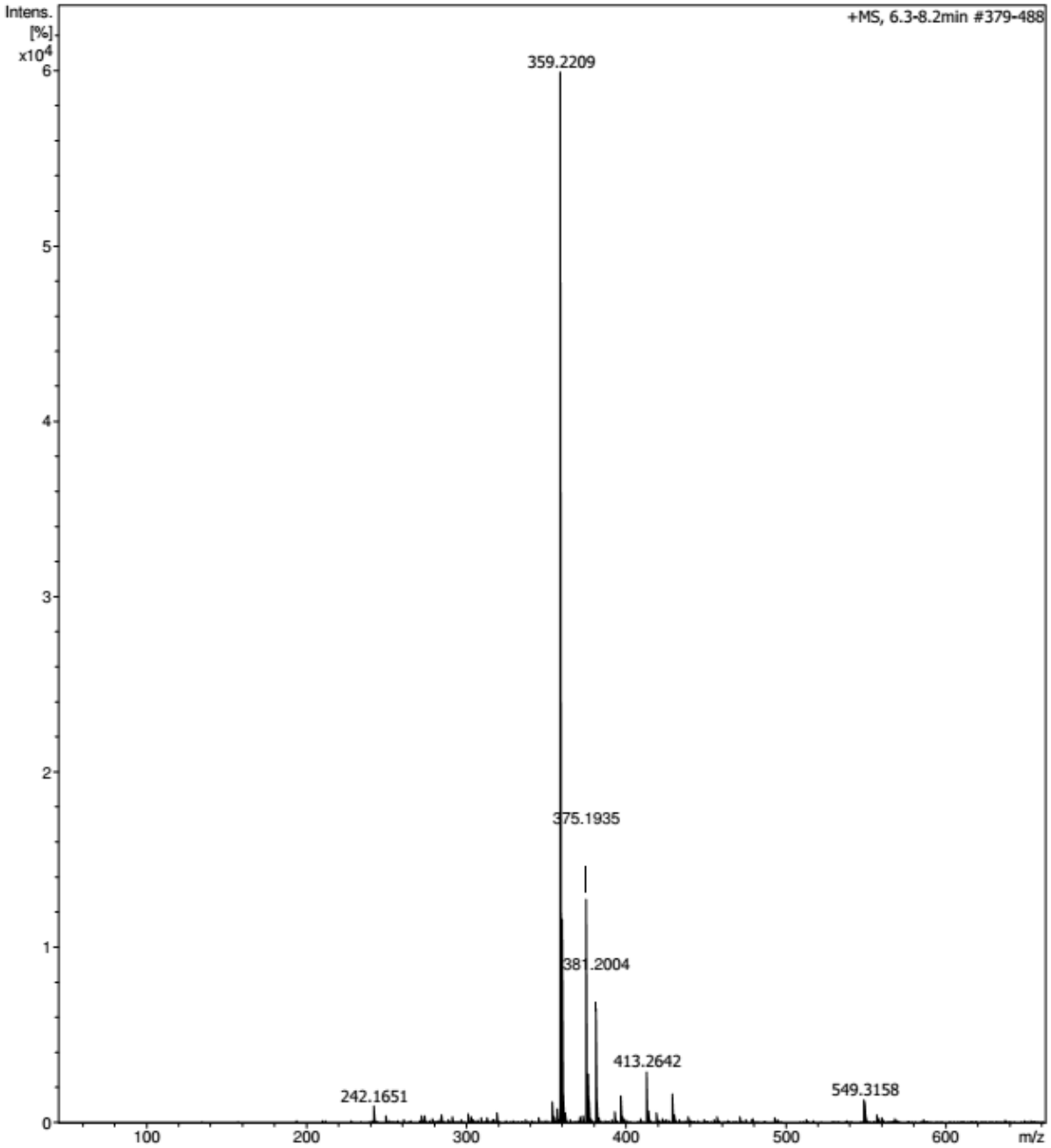
APÊNDICE 52: Mapa de contornos HMQC do derivado Cl24 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



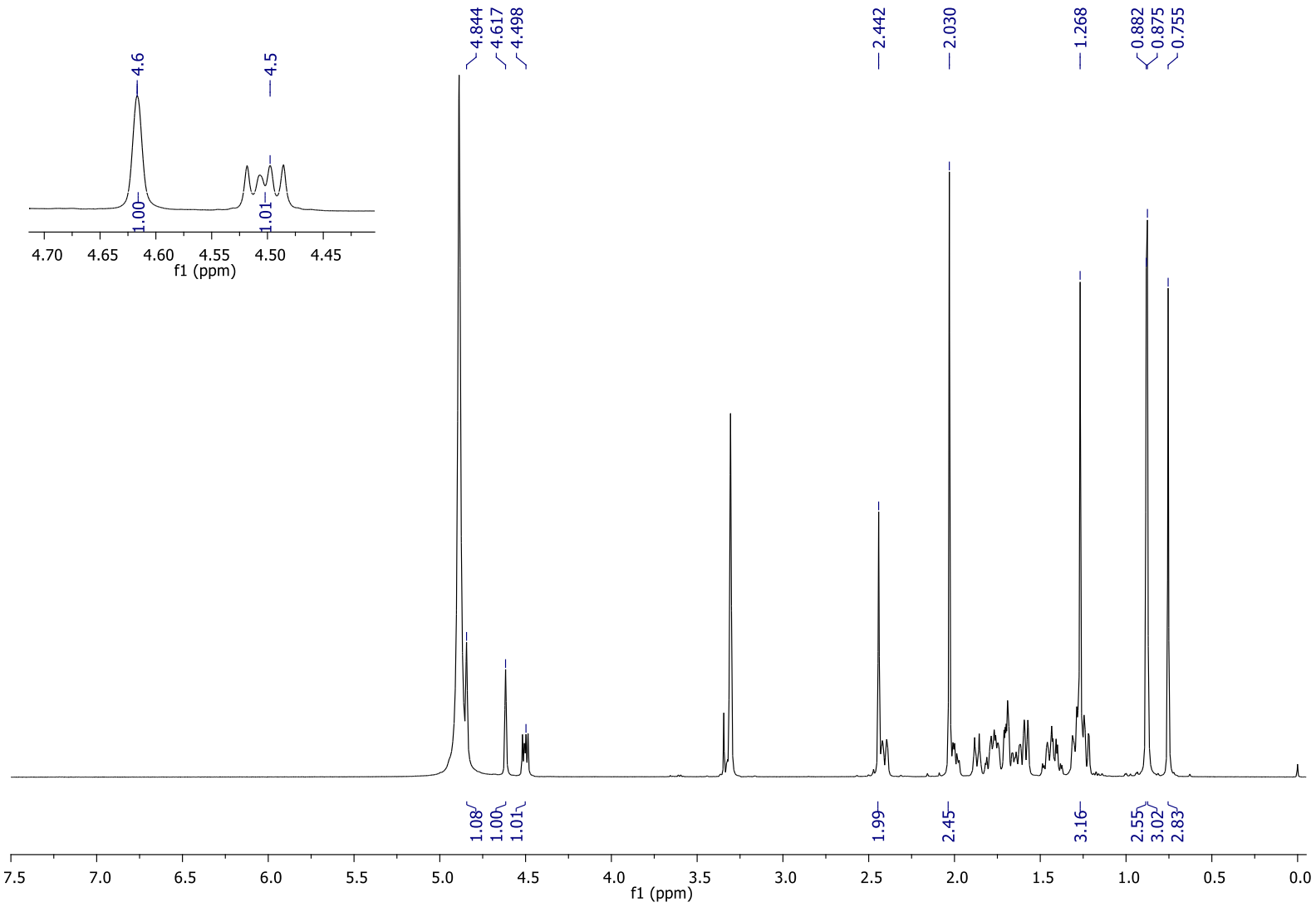
APÊNDICE 53: Mapa de contornos HMBC do derivado Cl24 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



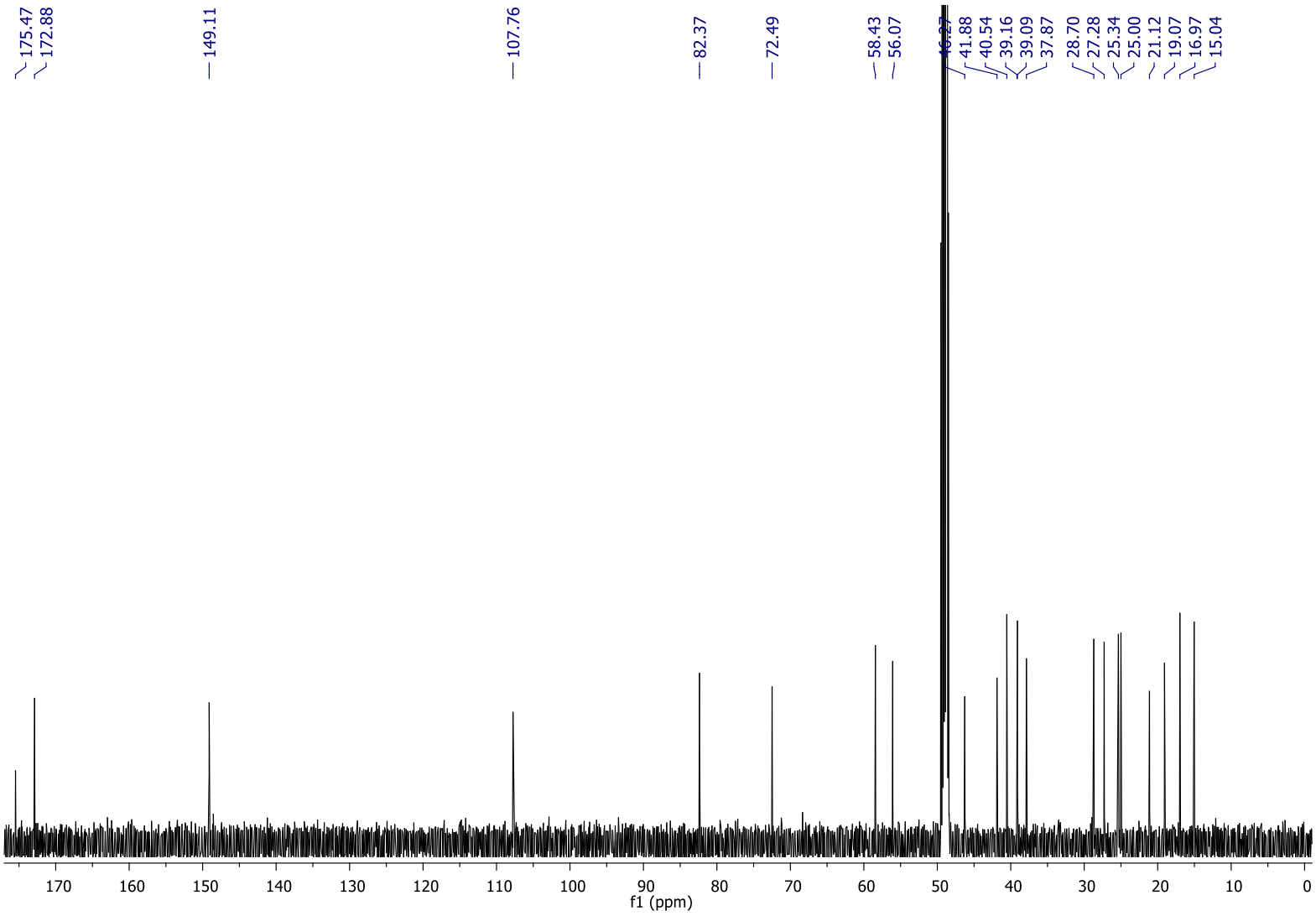
APÊNDICE 54: Espectro de massas de alta resolução do derivado Cl24



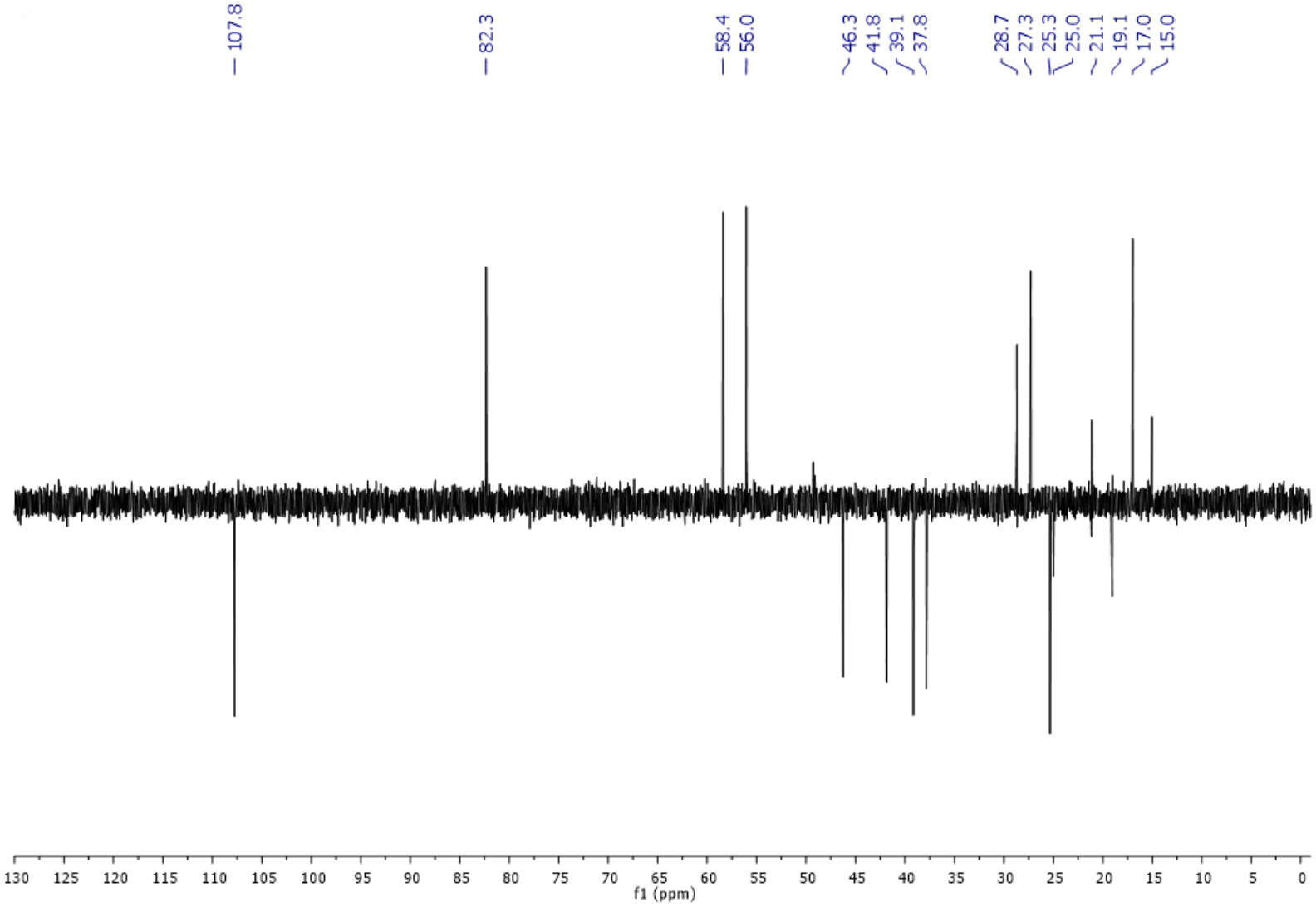
APÊNDICE 55: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Ap23 (CD_3OD, 500 MHz)



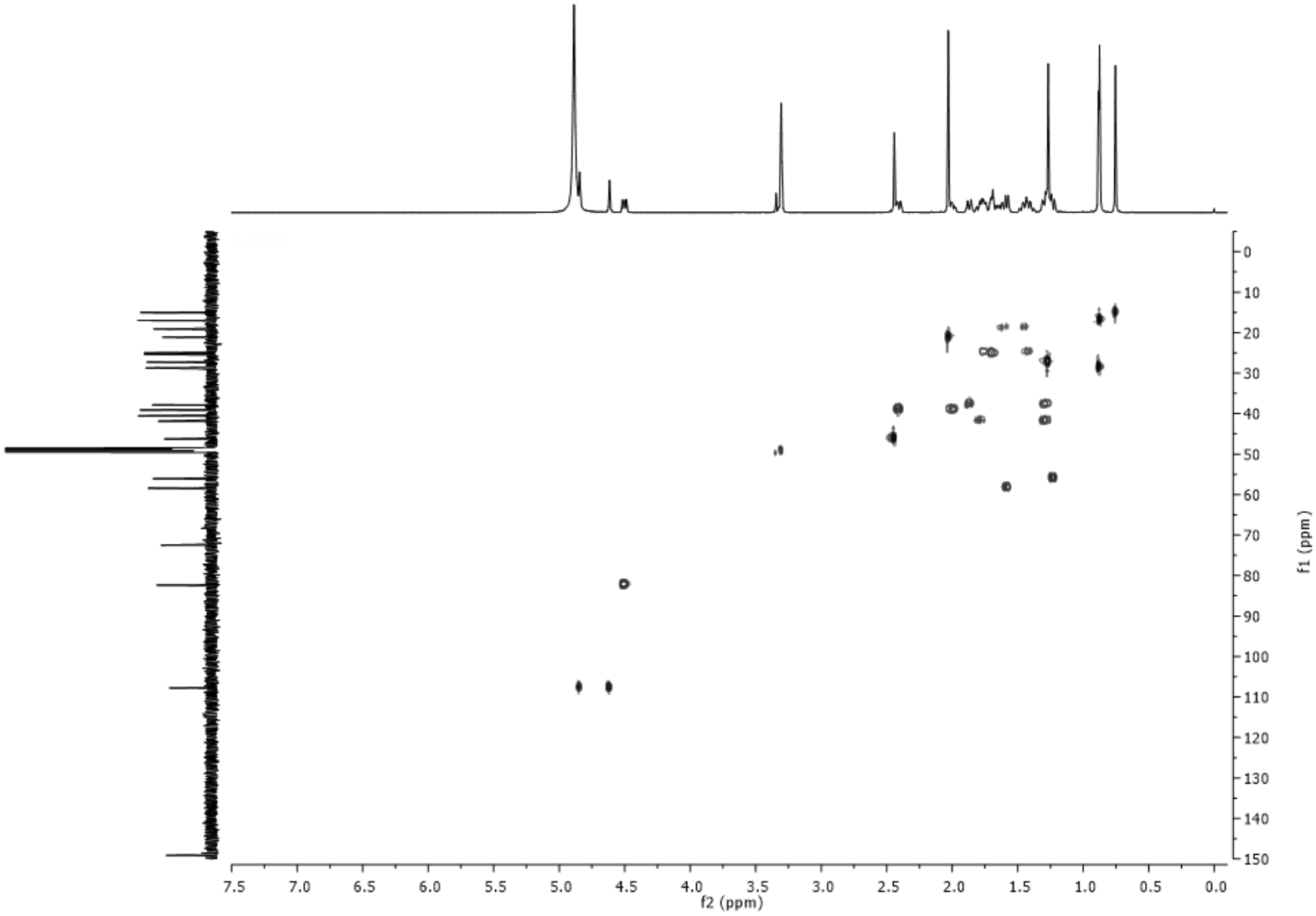
APÊNDICE 56: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Ap23 (CD_3OD, 125 MHz)



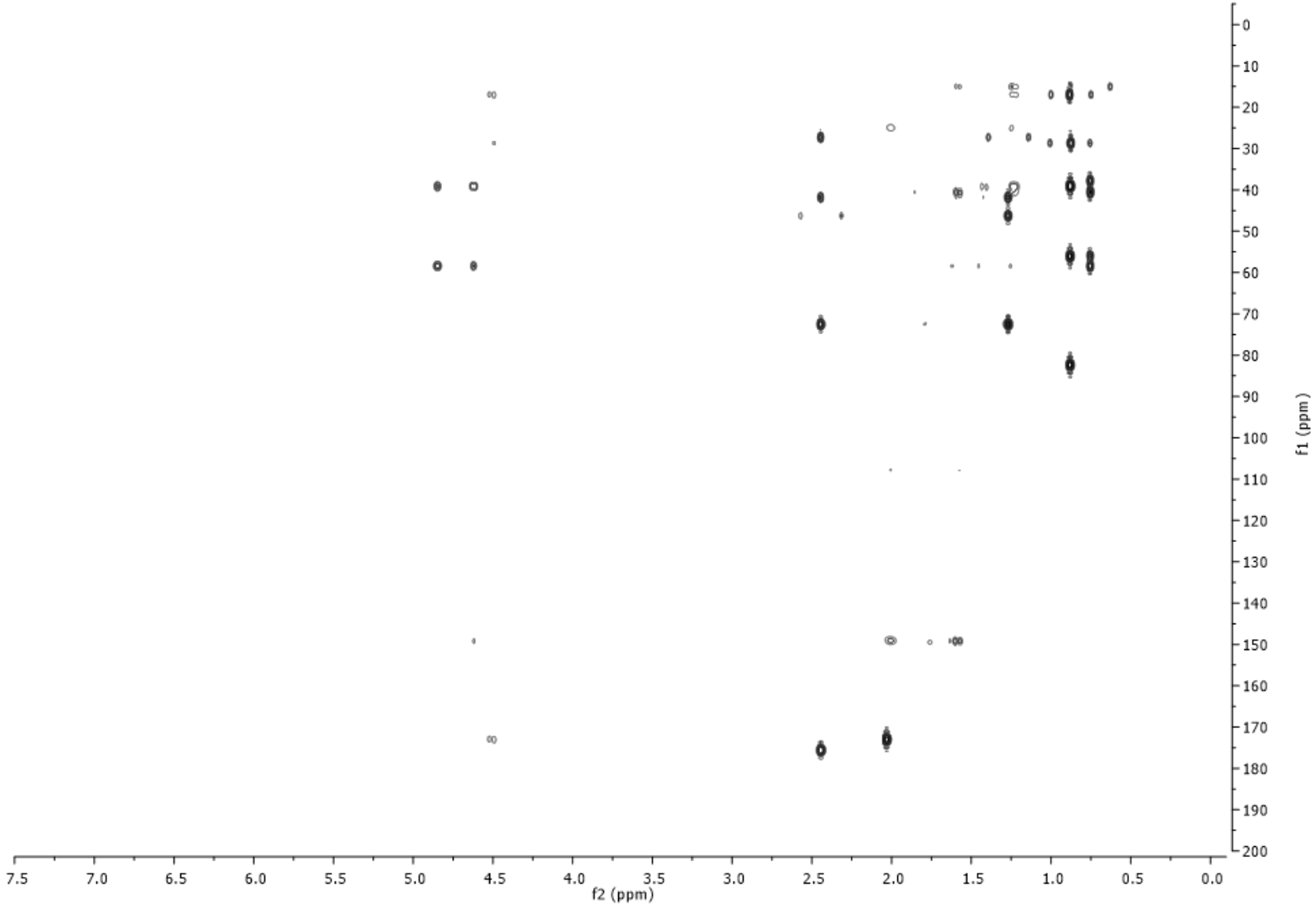
APÊNDICE 57: Espectro de DEPT 135° do derivado Ap23 (CD_3OD, 125 MHz)



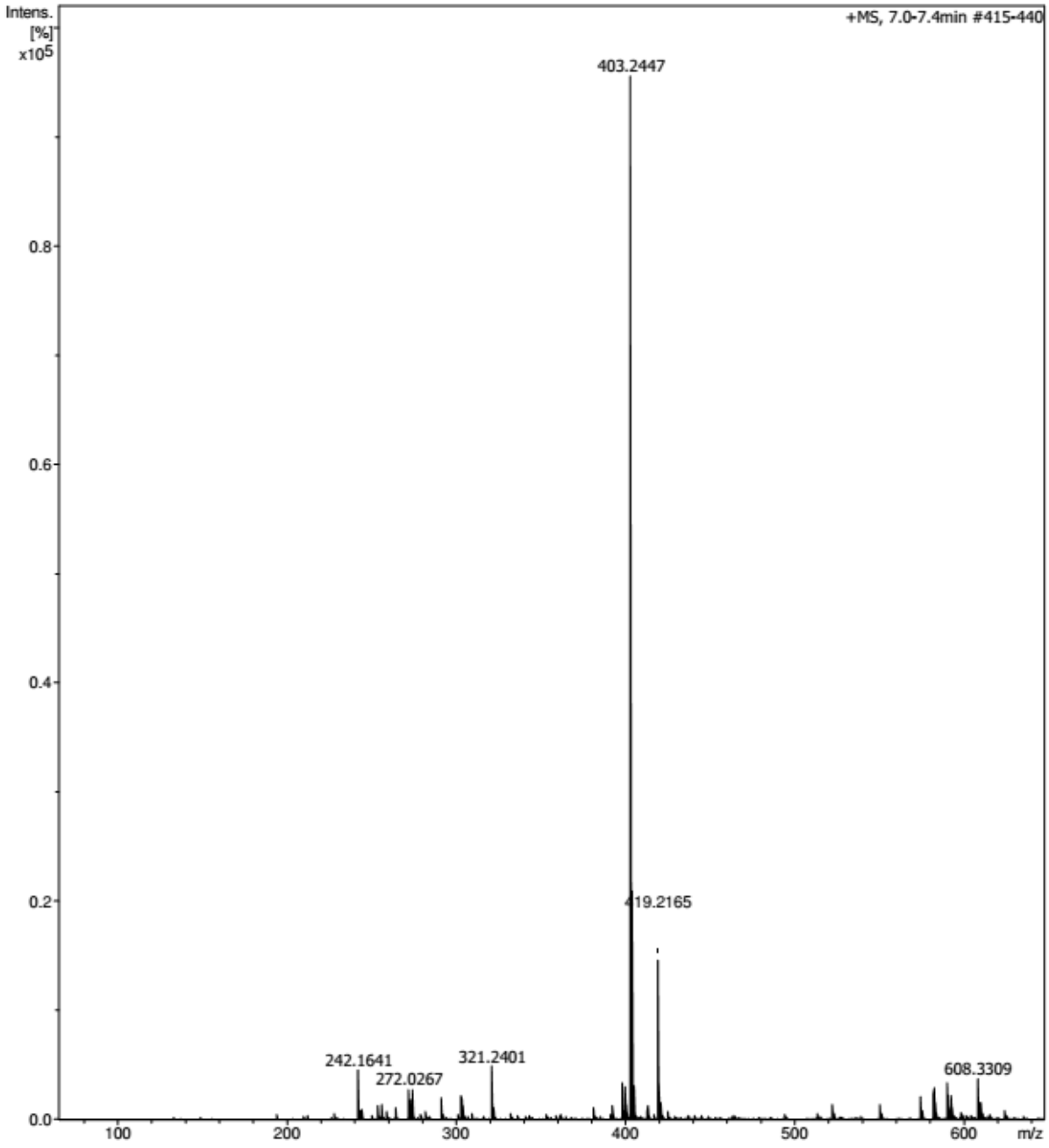
APÊNDICE58: Mapa de contornos HMQC do derivado Ap23 (CD_3OD,500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



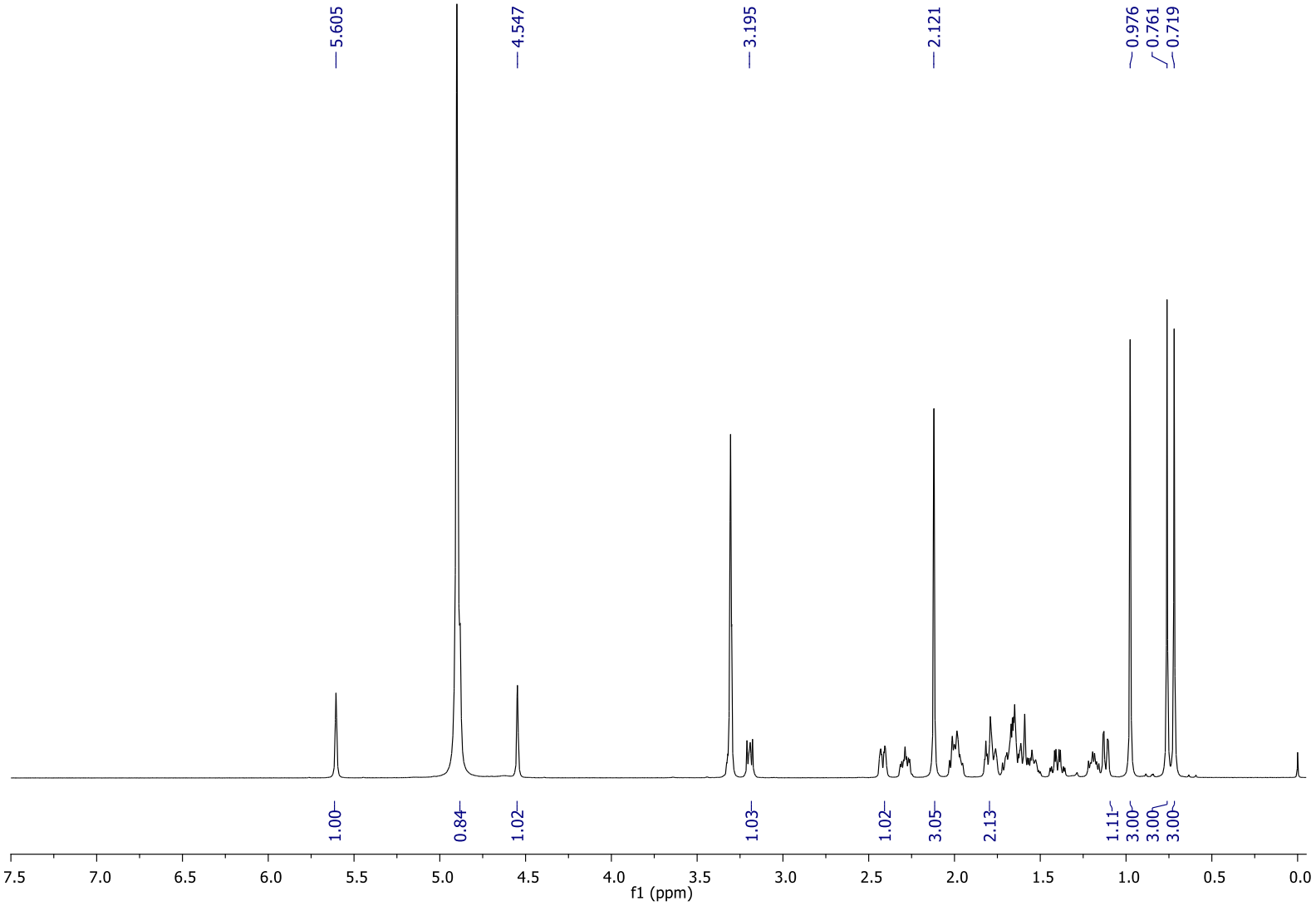
APÊNDICE 59: Mapa de contornos HMBC do derivado Ap23 (CD_3OD, 500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



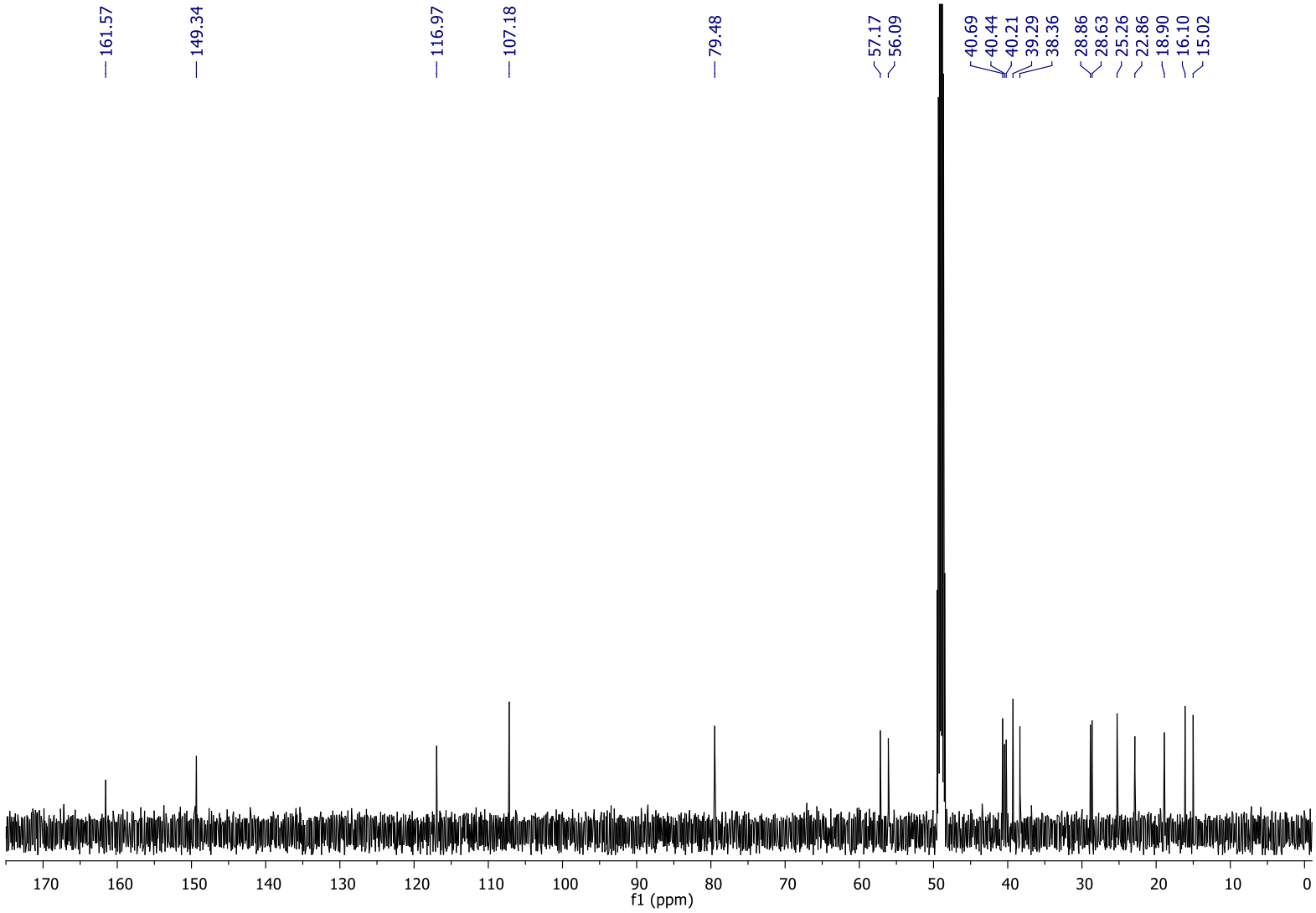
APÊNDICE 60: Espectro de massas de alta resolução do derivado Ap23



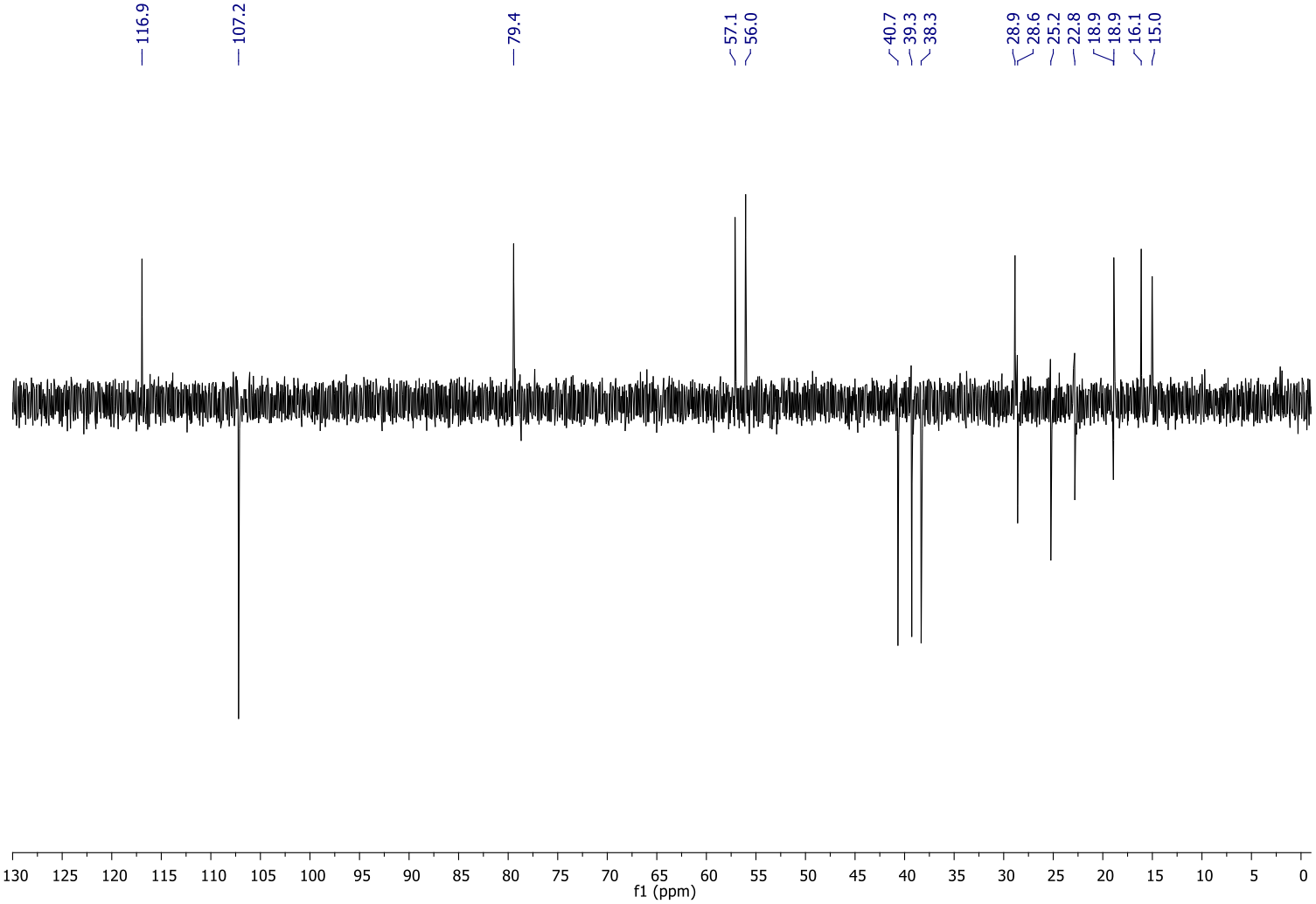
APÊNDICE 61: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Cl22 (CD_3OD, 500 MHz)



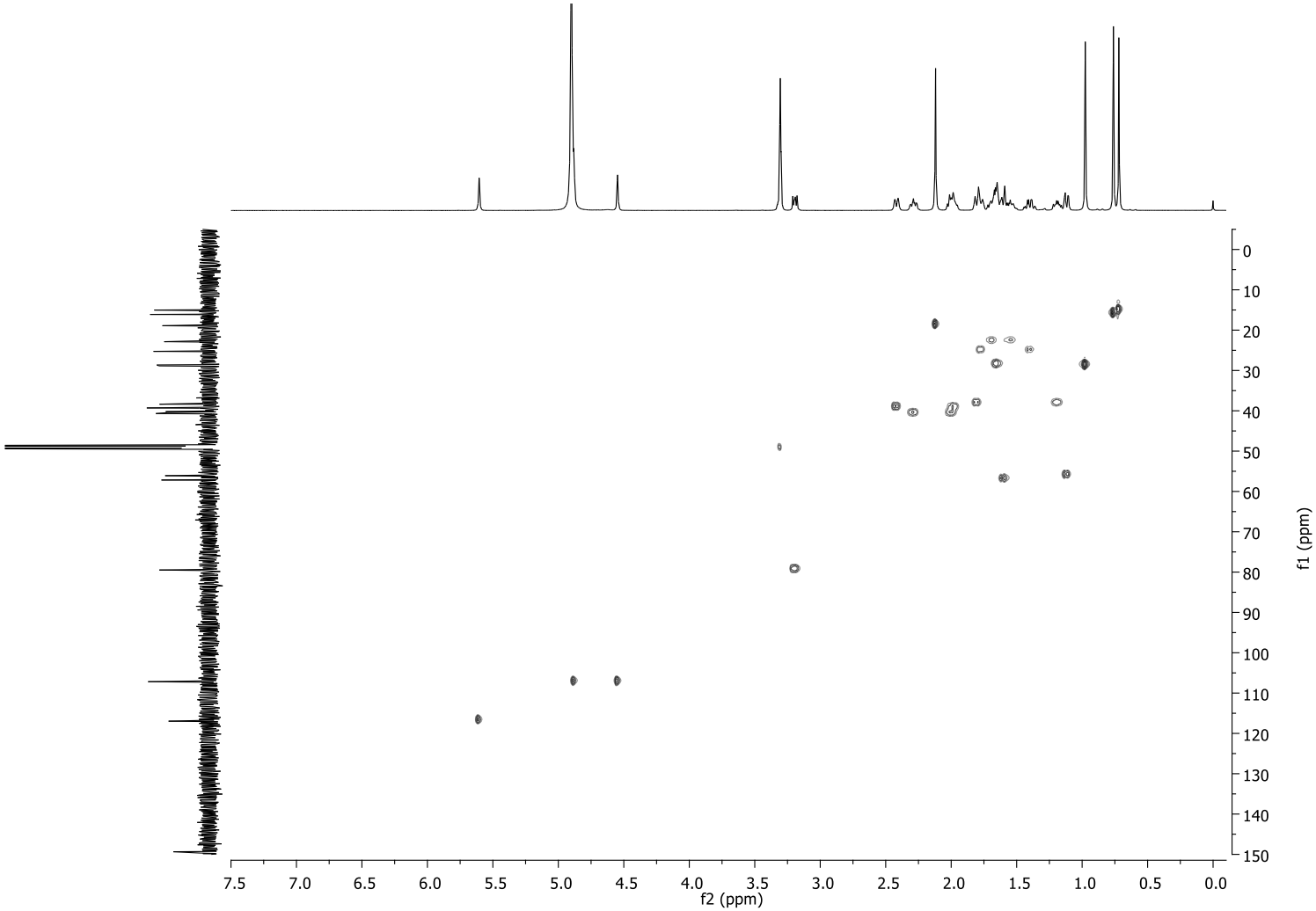
APÊNDICE 62: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Cl22 (CD_3OD, 125 MHz)



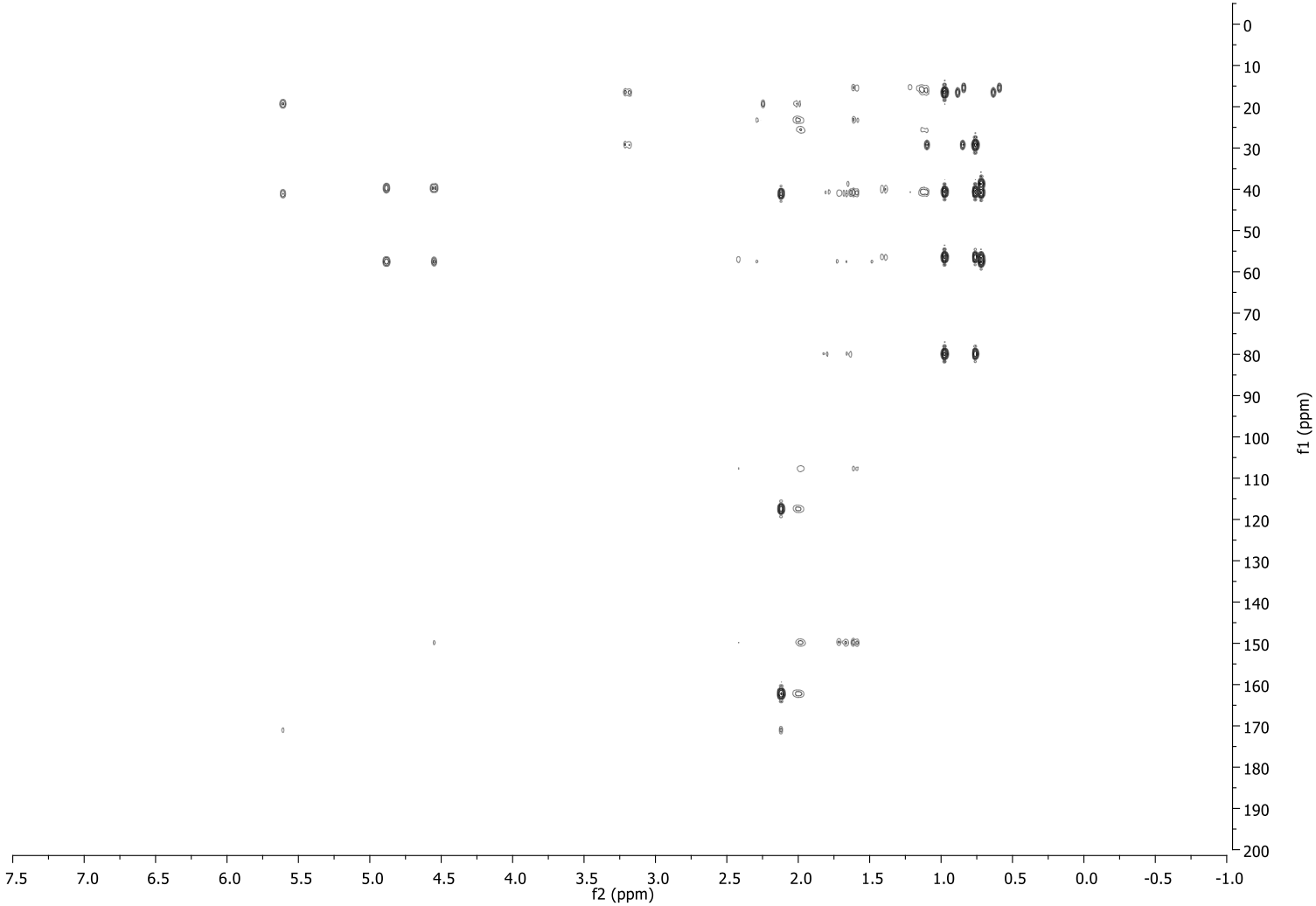
APÊNDICE 63: Espectro de DEPT 135° do derivado Cl22 (CD_3OD, 125 MHz)



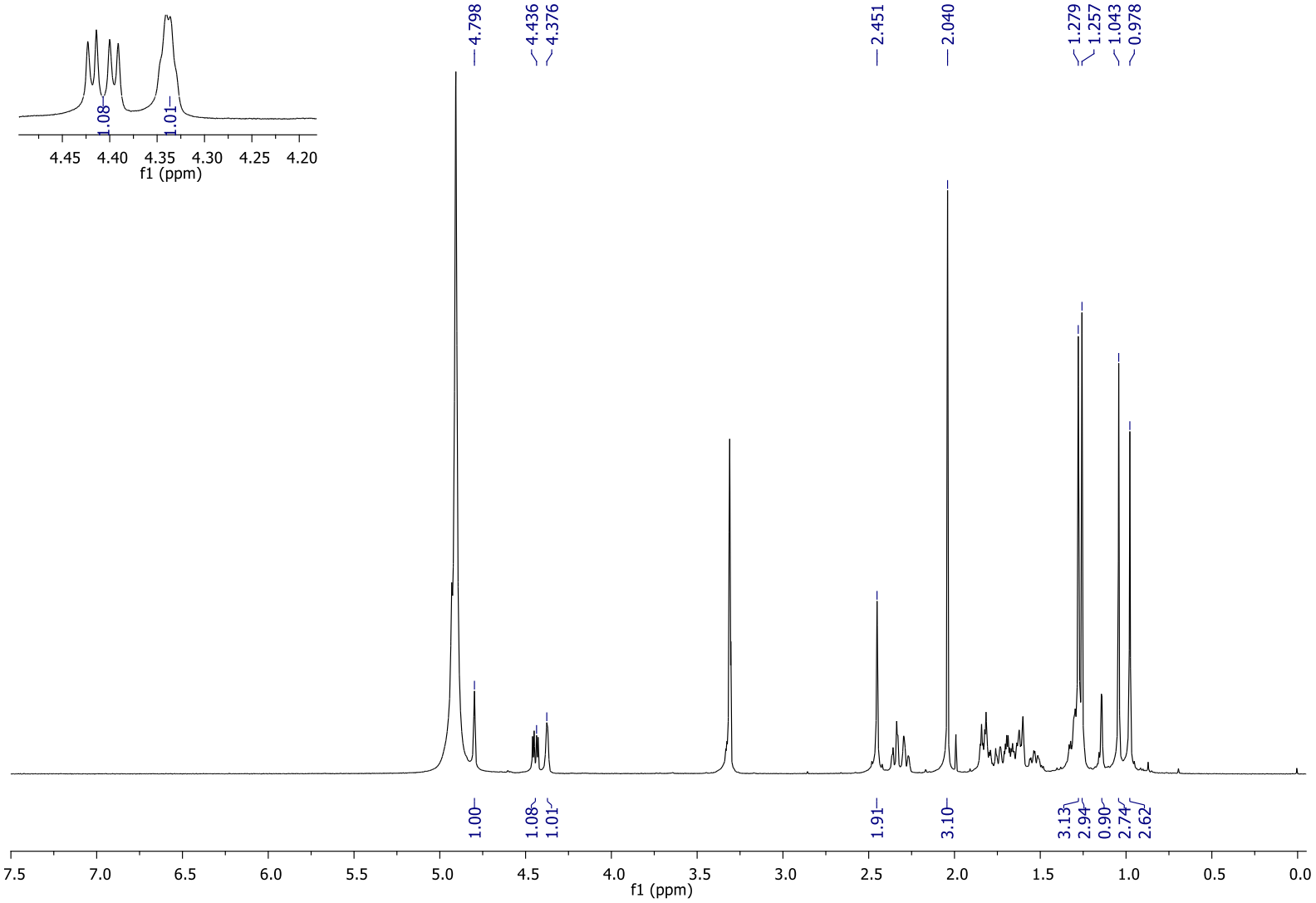
APÊNDICE64: Mapa de contornos HMQC do derivado Cl22 (CD_3OD,500 MHz/^1H;125 MHz/^{13}C)



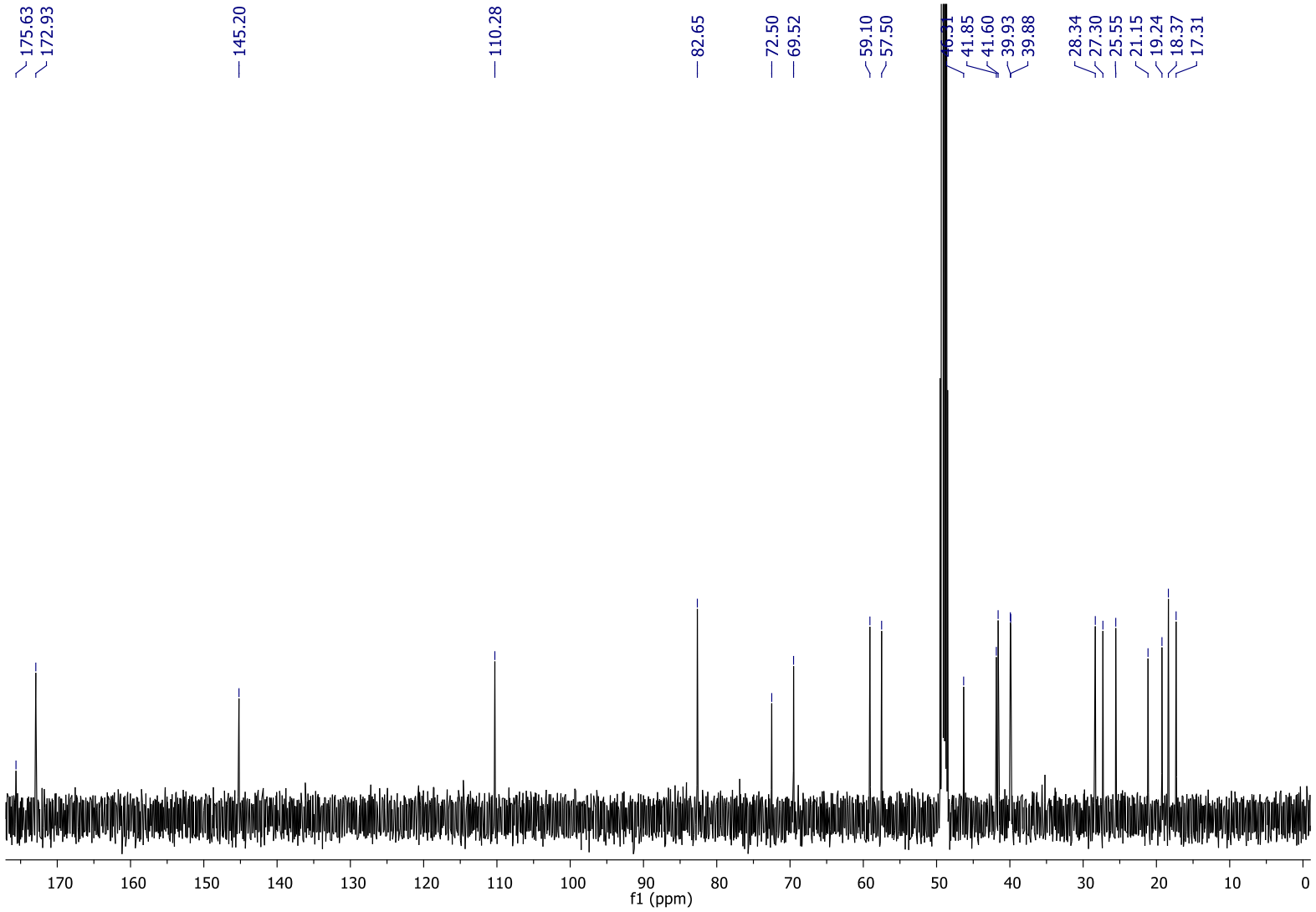
APÊNDICE 65: Mapa de contornos HMBC do derivado Cl22 (CD_3OD, 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



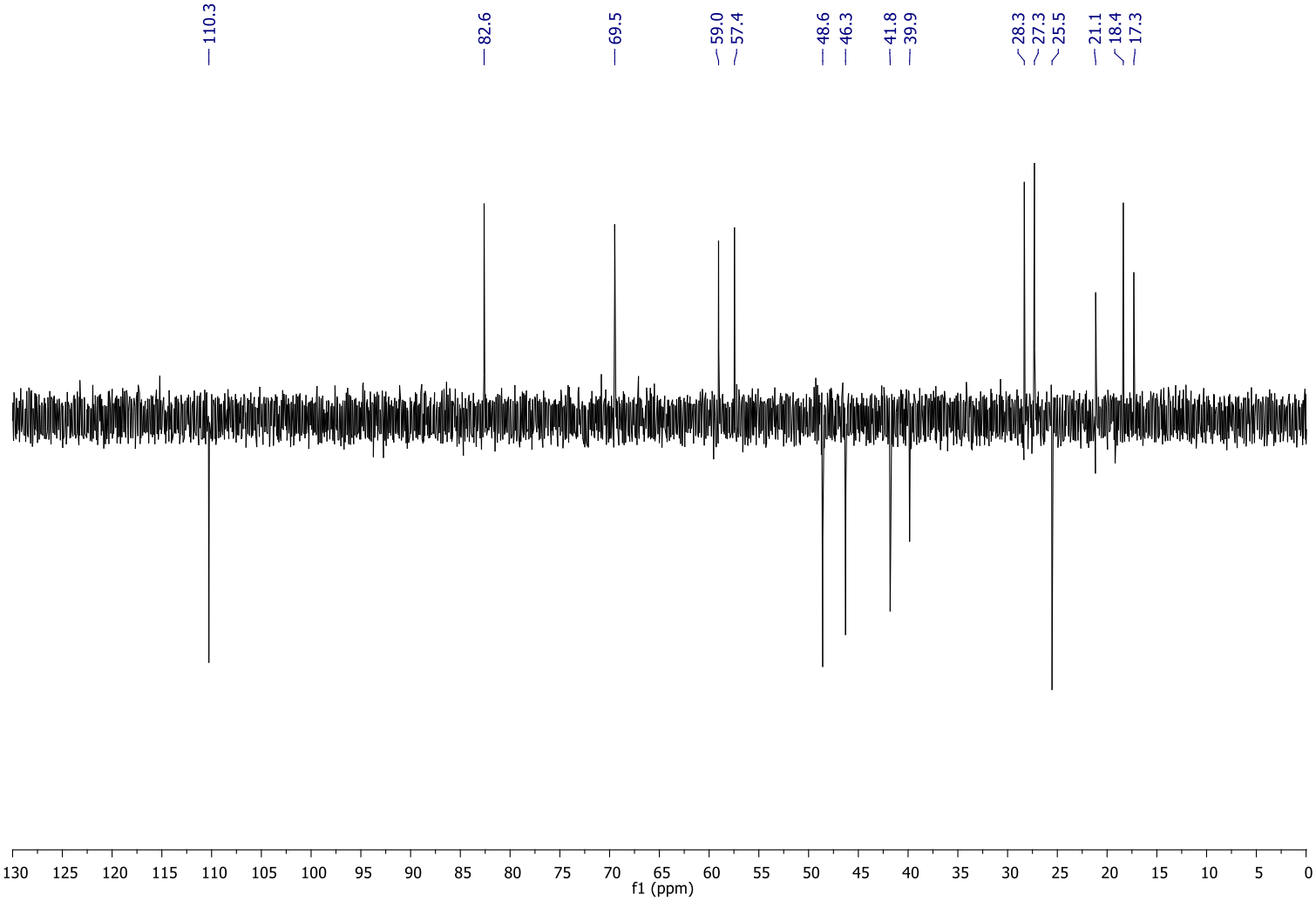
APÊNDICE 66: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Ce9 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 500 MHz)



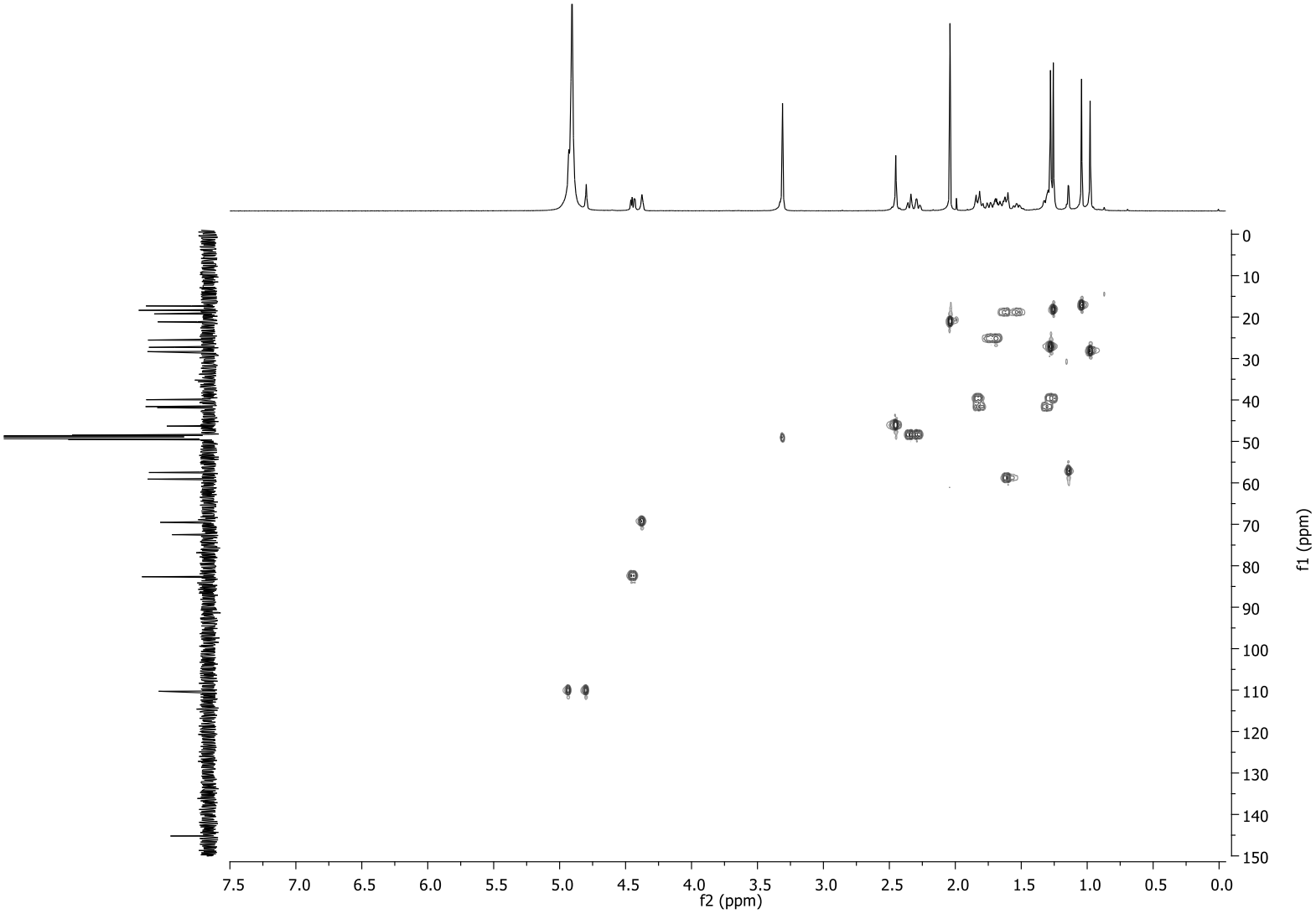
APÊNDICE 67: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado Ce9 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 125 MHz)



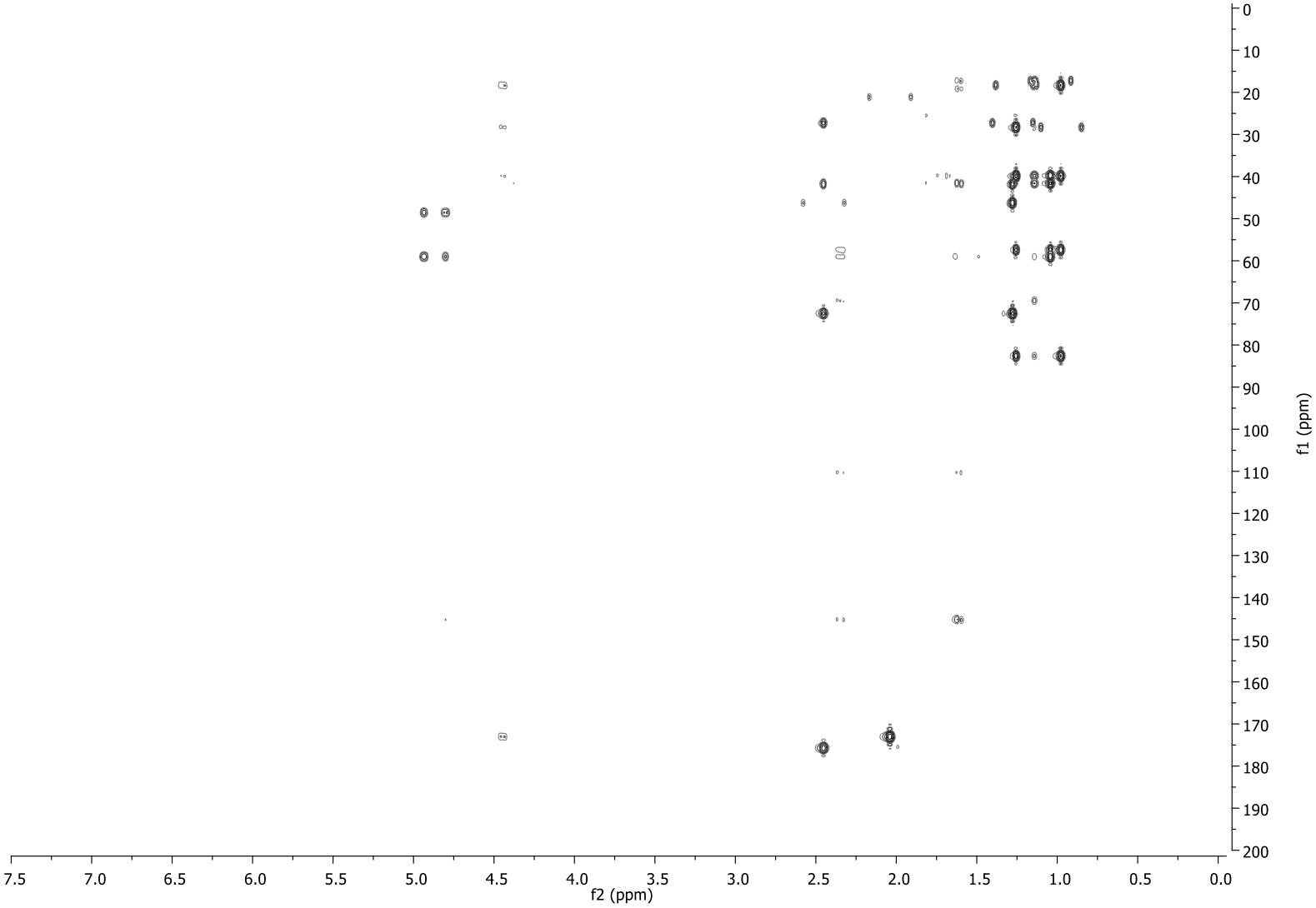
APÊNDICE 68: Espectro de DEPT 135° do derivado Ce9 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 125 MHz)



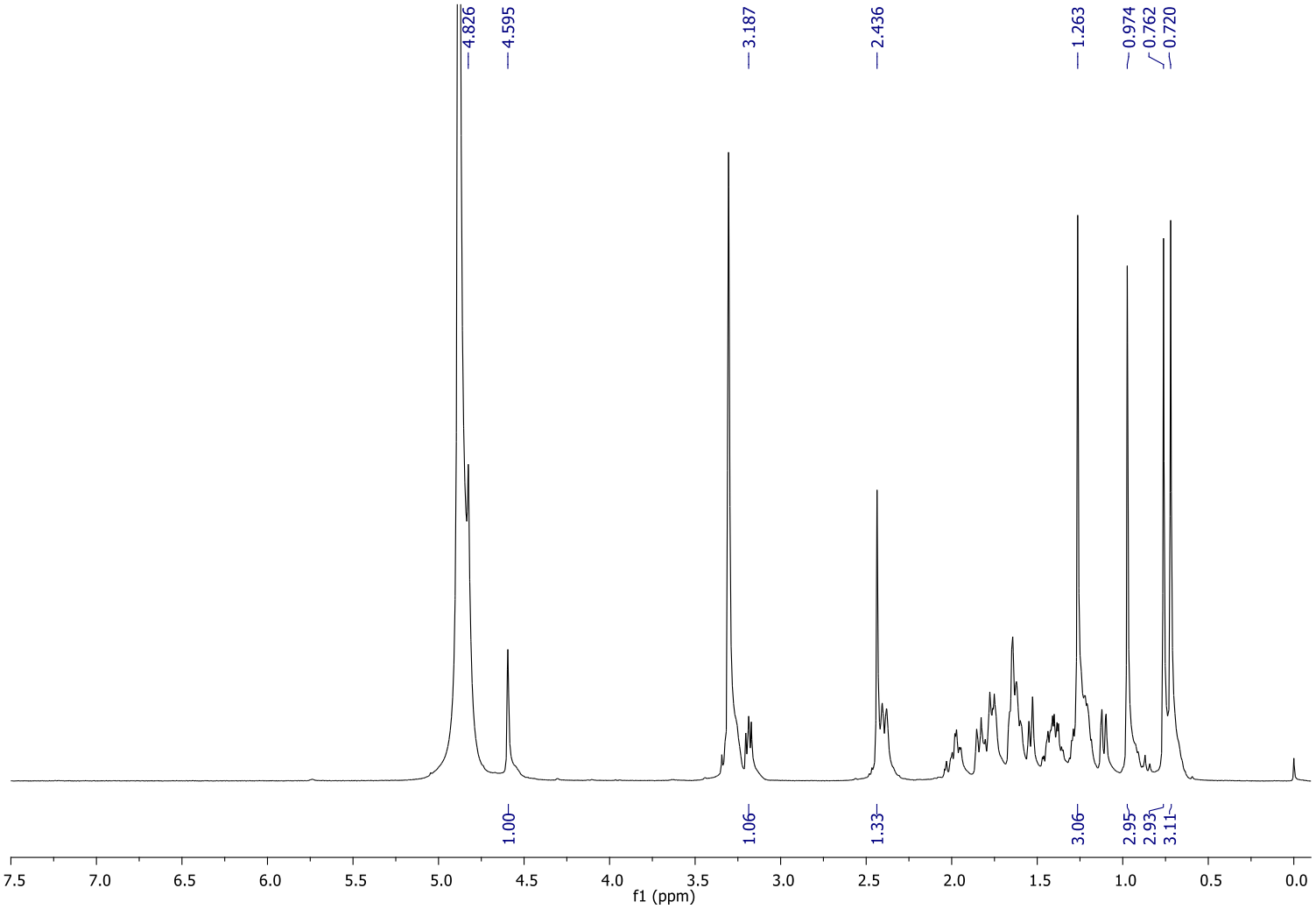
APÊNDICE69: Mapa de contornos HMQC do derivado Ce9 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD,500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



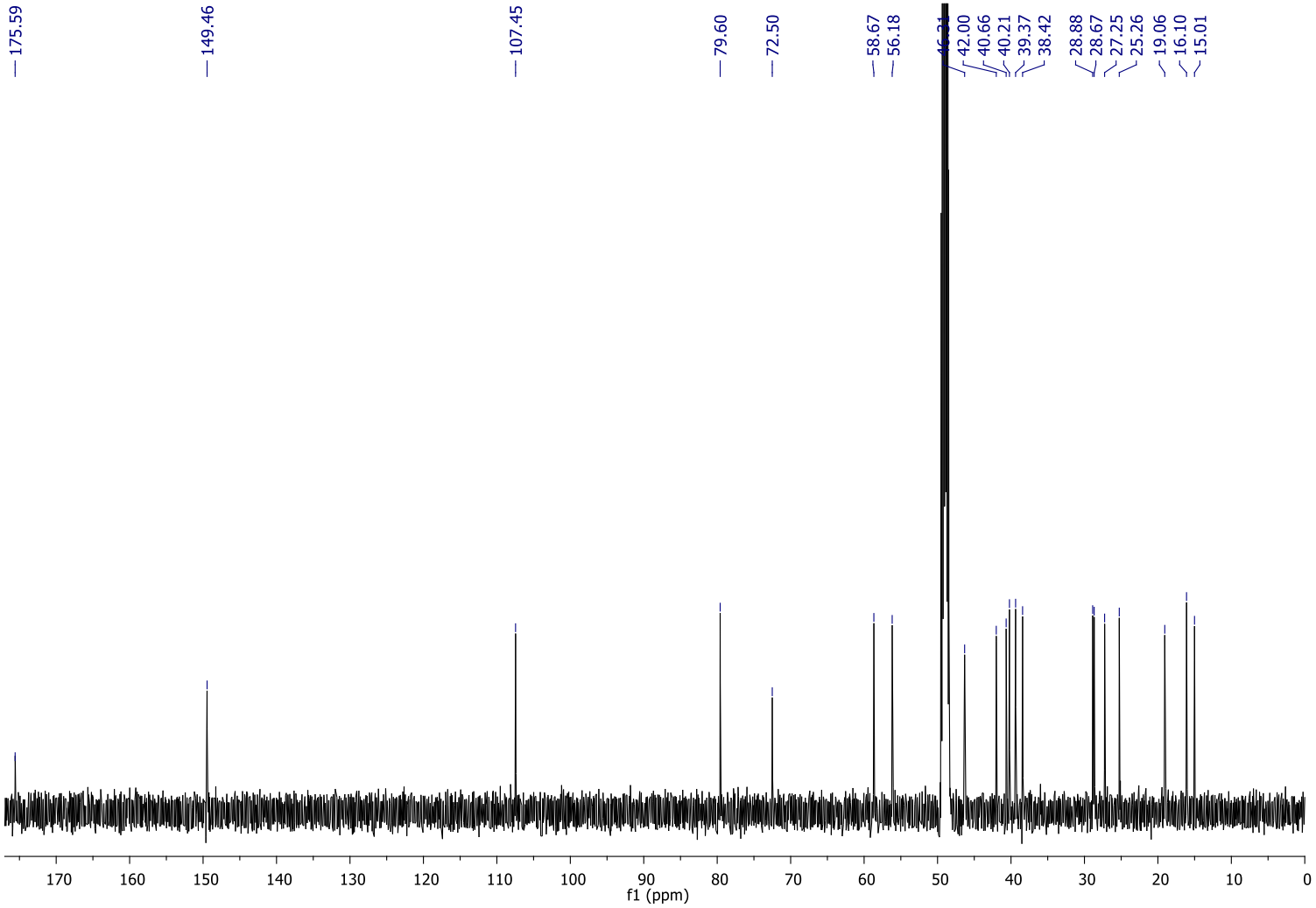
APÊNDICE 70: Mapa de contornos HMBC do derivado Ce9 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



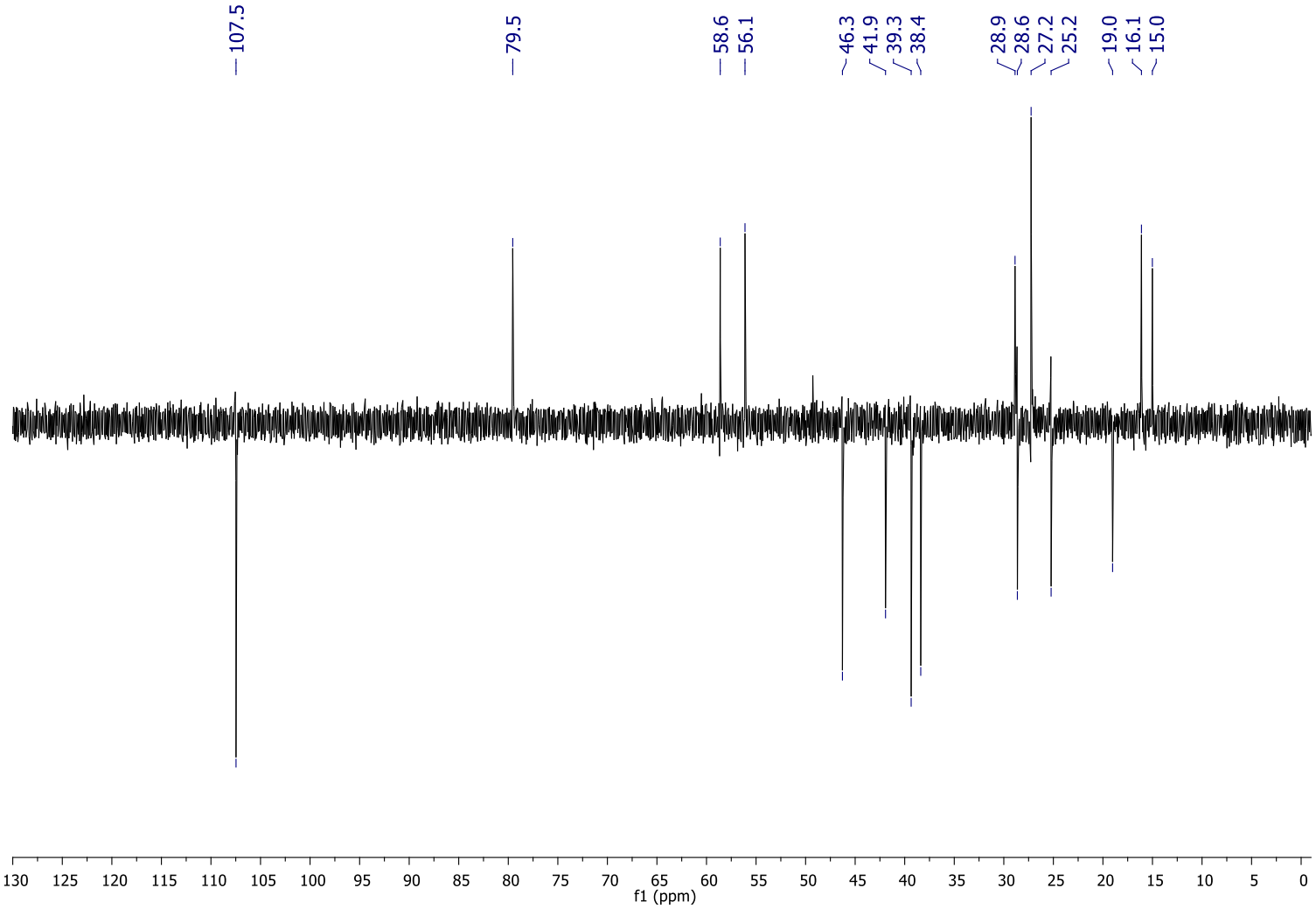
APÊNDICE 71: Espectro de RMN de ^{1}H do derivado An17 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 500 MHz)



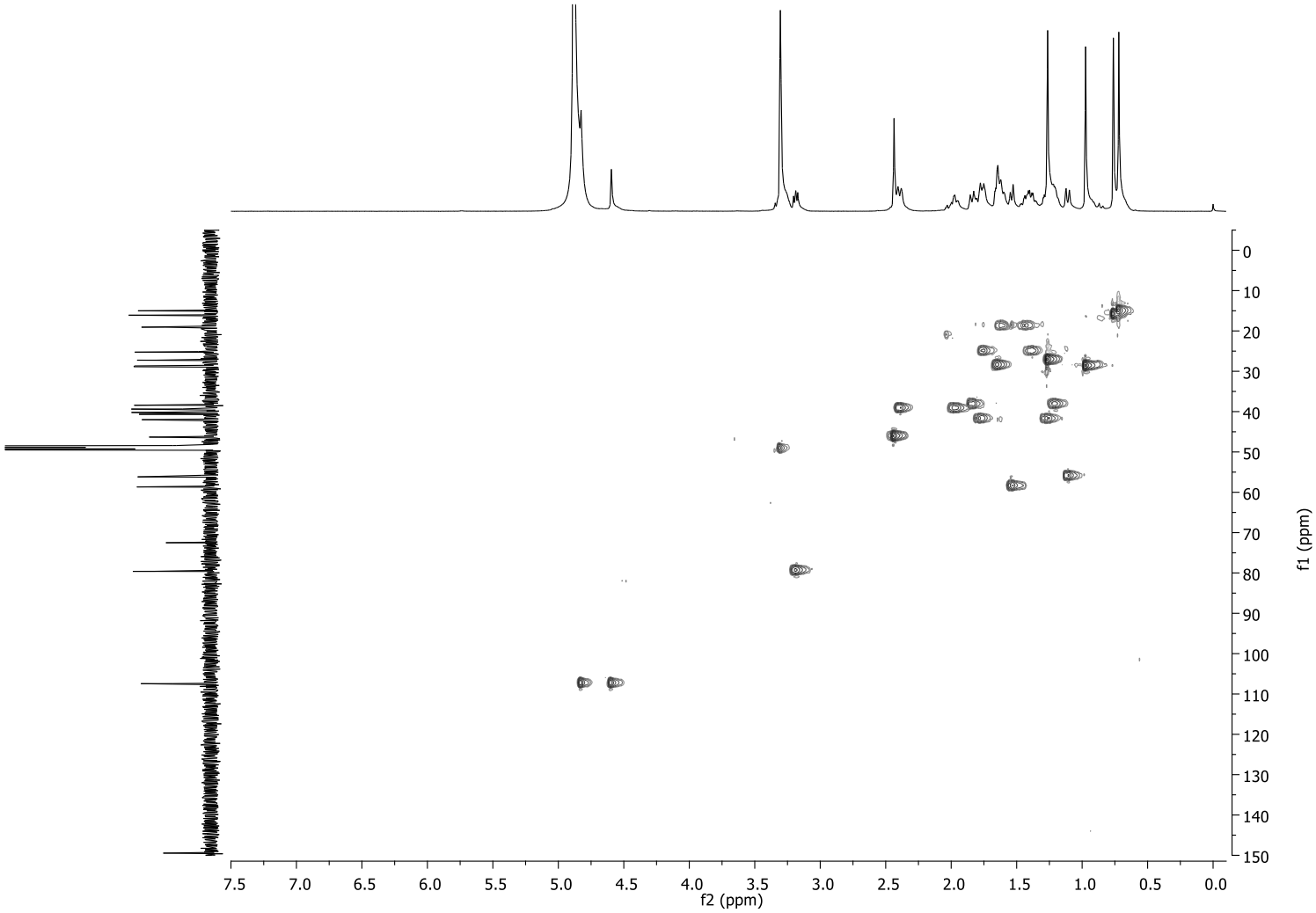
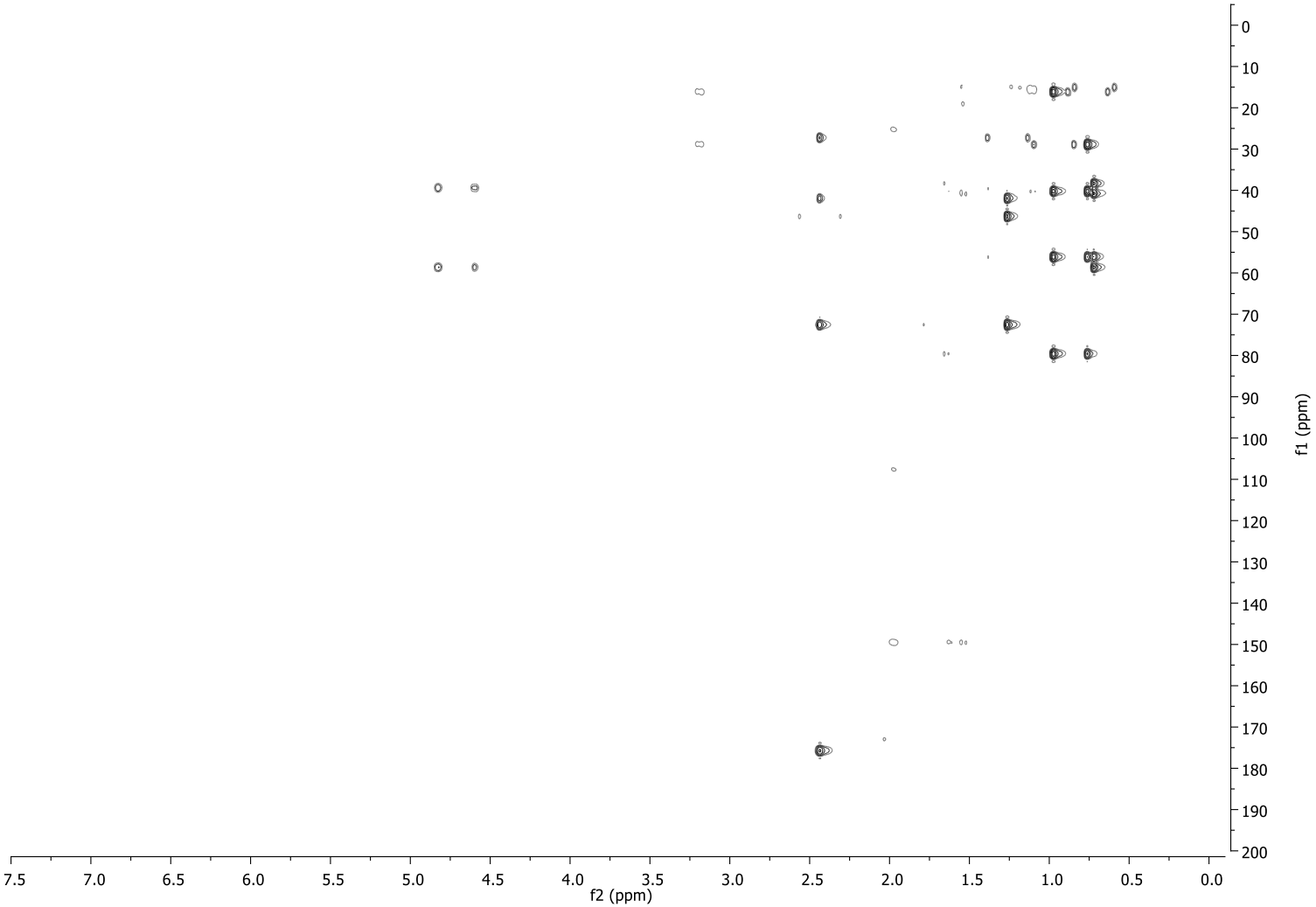
APÊNDICE 72: Espectro de RMN de ^{13}C do derivado An17 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 125 MHz)



APÊNDICE 73: Espectro de DEPT 135° do derivado An17 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 125 MHz)



APÊNDICE74: Mapa de contornos HMQC do derivado An17 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD,500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)



APÊNDICE 75: Mapa de contornos HMBC do derivado An17 isolado de *A. phoenicis* (CD_3OD, 500 MHz/^{1}H;125 MHz/^{13}C)