UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Biotransformações dos terpenos β -cariofileno e ácido 3 β -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. Nieve 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

RESUMO

CARVALHO, T. C. **Biotransformações dos terpenos β -cariofileno e ácido 3 β -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 3 β -acetoxi-copálico e β -cariofileno, presentes em oleorresinas de *Copaifera*, bem como isolar os produtos de biotransformação para avaliação da citotoxicidade. 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 3 β -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 3 β -acetoxi-copálico apresentaram menor citotoxicidade frente as linhagens avaliadas do que o próprio ácido 3 β -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 3 β -acetoxi-copálico e atividade citotóxica

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 $2E$, $6E$, $10E$ -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 3 α -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 colaboradores 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 terrigena* 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 regioseletiva e enantioseletiva 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 11 α formando 11 α -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 11 β 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 enantiomericamente

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 Hirschman 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 isocuprêssico com *Cuninghamella 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 7 α ,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 imbricatólico

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 citotoxicidade 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 demonstram 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 citotoxicidade frente a linhagem AGP01. Para as linhagens HCT-116 e NIHOVCAR apenas o ácido 3-acetoxi-copálico apresentou citotoxicidade. Quanto a linhagem SF-295, a qual mostrou-se mais sensível, os diterpenos ácidos 3-hidróxi-copálico e 3-acetoxi-copálico apresentaram citotoxicidade 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 demonstrou-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 prever 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.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os processos realizados utilizando cromatografia líquida sob pressão reduzida foram eficientes e propiciaram o isolamento do ácido 3 β -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 3 β -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 3 β -acetoxi-copálico com os fungos filamentosos, todos esses produtos não apresentaram toxicidade frente as células de mamíferos testados, apresentando menor citotoxicidade 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. **Química 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. Strukturaufklärung 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 Mediciniais**. 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* isolates 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 aspilioides* 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, 2^a. West Sussex, Inglaterra, John Wiley & Sons, 2002.
- DISOTTO 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 química 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. 1 β ,7 β -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 kinetics. **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 subtilis* RCK 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 of *Madiaspecies*, 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 adrenocorticotrophic 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 solbrighi*. **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.; MCCHESENEY, 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* (*Copaifera* spp.) 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* oleoresin. **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 diterpenes ent-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 langsdorffii* 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 copaiba 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-inflammatory-related 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 Medicinai**s, 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 Tecnologias)**, 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 Biotechnology**, 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.; VERCRUYSSSE, 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 Environmental 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-16 α , 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 *Rhizopus* 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.