



MEISSA ROCHA ESSENFELDER ABRAHÃO

**Desenvolvimento de processo biotecnológico para produção de compostos
de aroma por fungos endofíticos**

**Biotechnological process development for the production of aroma
compounds through endophytic fungi**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MEISSA ROCHA ESSENFELDER ABRAHÃO

**Desenvolvimento de processo biotecnológico para produção de compostos
de aroma por fungos endofíticos**

**Biotechnological process development for the production of aroma
compounds through endophytic fungi**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestra em Ciência de Alimentos

Dissertation presented to the Faculty of Food
Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master in Food Science

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
MEISSA ROCHA ESSENFELDER ABRAHÃO
PROF^a. DR^a. GLÁUCIA MARIA PASTORE

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Ab89d Abrahão, Meissa Rocha Essenfelder, 1984-
Desenvolvimento de processo biotecnológico para produção de compostos de aroma por fungos endofíticos / Meissa Rocha Essenfelder Abrahão. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fungos. 2. Endofíticos. 3. Biotransformação. 4. Terpenos. 5. Aroma. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biotechnological process development for the production of aroma compounds through endophytic fungi

Palavras-chave em inglês:

Fungi

Endophytic

Biotransformation

Terpenes

Aroma

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Mário Roberto Maróstica Júnior

Daniele Souza de Carvalho

Data de defesa: 07-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Pastore (DCA/FEA/Unicamp) – Orientadora

MEMBRO

Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior (DEPAN/FEA/UNICAMP)

MEMBRO

Prof^ª. Dr^ª Daniele Souza de Carvalho (IFSP-Campus Avaré)

MEMBRO

Dr^ª Ana Paula Dionísio (CNPAT-EMBRAPA)

SUPLENTE

Prof. Dr. Yong Kun Park (DCA/FEA/UNICAMP)

SUPLENTE

RESUMO

A biotecnologia é uma área interdisciplinar que tem possibilitado inúmeros avanços no desenvolvimento de processos sustentáveis e na obtenção de novos produtos de interesse industrial. Entre estes exemplos estão os aromas naturais que, atualmente, são preferidos por muitos consumidores e já dominam o mercado em certas regiões como a Europa. Uma das opções biotecnológicas para a obtenção destes compostos ocorre pela biotransformação de terpenos, que são derivados de isoprenos, e substratos amplamente distribuídos na natureza. Estes compostos são classe relevante dentre os compostos de aroma e alguns podem ser obtidos a custos relativamente baixos. Limoneno e α -pineno, por exemplo, estão disponíveis como subprodutos de indústrias de frutas cítricas e de papel, respectivamente. Estes monoterpenos são considerados substratos ideais para obtenção de derivados oxigenados, os terpenóides, muitos dos quais de grande interesse comercial. Nessa perspectiva, 51 fungos endofíticos das frutas caju (*Anacardium occidentale* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.) e camu-camu (*Myrciaria dubia*), foram isolados durante este trabalho. As linhagens foram também avaliadas quanto ao potencial para biotransformação de limoneno ou α -pineno como fontes únicas de carbono. A partir deste segundo substrato, destacaram-se dois fungos produtores de verbenona, um dos compostos chave do aroma de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). A produção de verbenona por via biotecnológica mostrou um grande potencial para a continuidade dos estudos, tendo em vista que a concentração obtida foi de, aproximadamente, 200 mg/L após 288 horas de contato com o substrato α -pineno. Além disso, outro fungo apresentou produção de álcool perílico a partir da biotransformação de limoneno. Este produto é um terpenóide, cujos mecanismos de proteção contra o câncer já tem sido investigados e reconhecidos, aumentando o interesse na sua pesquisa e produção biotecnológica. No encerramento do trabalho, os três fungos com resultados positivos pra biotransformação de terpenos foram analisados em microscopia óptica para observação de suas morfologias e auxílio na identificação.

ABSTRACT

As an interdisciplinary field, biotechnology has allowed several advances for the development of sustainable processes and many achievements concerning production of new compounds with industrial interest. Natural aroma compounds have been frequently prioritized by costumers and dominate a considerable market share in some regions such as Europe, and one of biotechnological routes for obtaining these compounds occurs through the biotransformation of terpenes. These substrates are naturally available compounds derived from isoprene units, and represent a relevant class of aroma compounds, which can be often obtained at relatively low costs. Limonene and α -pinene, for instance, are available as by-products in citrus and pine industries, respectively. These monoterpenes represent ideal precursors for biotechnological production, leading to their oxygenated derivatives denominated terpenoids, some of which commercially valuable. In this perspective, fifty one endophytic fungi from Brazilian fruits, such as cashew (*Anacardium occidentale* L.), genipap (*Genipa americana* L.), sapodilla (*Manilkara zapota* L.) and camu-camu (*Myrciaria dubia*) were screened during this work. Furthermore, these fungal strains were tested in the biotransformation of limonene or α -pinene as sole carbon source. Amongst all fungi, two strains showed noteworthy capability to biotransform α -pinene into verbenone, key compound of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) aroma. The biotechnological production of verbenone proved to be an interesting strategy with a great future potential, considering that that the concentration of this product reached approximately 200 mg/L after 288 hours of contact with the substrate α -pinene. Moreover, from the biotransformation of limonene, one fungi produced perillyl alcohol. This important terpenoid presents protection mechanisms against cancer already investigated and recognized. The practical steps achieved in this project also involved the observation of these strains with positive results through optical microscopy, in order to verify their morphology and general characteristics.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
RESUMO.....	1
1. Aromas e mercado.....	2
1.1. Aromas naturais e suas aplicações na indústria.....	5
2. Definição e importância dos terpenos.....	7
2.1. Limoneno.....	10
2.2. Pinenos.....	10
2.3. Terpenóides.....	11
3. Frutas tropicais.....	12
3.1. Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	12
3.2. Jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.).....	13
3.3. Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>).....	14
3.4. Sapoti (<i>Manilkara zapota</i> L.).....	15
4. Obtenção de compostos de interesse por fungos.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 1. REVIEW ARTICLE: ENDOPHYTES: RECENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND THE POTENTIAL FOR FLAVOR PRODUCTION.....	25
ABSTRACT.....	25
1. Biotechnological flavors: general overview.....	26
1.1. Volatile organic compounds and their importance as flavoring agents.....	27
2. Plant-associated microorganisms as pleasant flavor resources.....	28
3. Endophytes: general concepts and relevance.....	28
3.1. Recent discoveries related to aroma compounds and endophytes.....	31
3.2. Recent studies from different fields involving endophytes.....	34
4. Benefits from genetic engineering and challenges to industry development.....	36
5. Conclusion.....	38
6. Acknowledgments.....	39
REFERENCES.....	40

CAPÍTULO 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FRUTAS TROPICAIS.....	48
RESUMO.....	48
1. Introdução.....	49
2. Materiais e métodos.....	54
2.1. Materiais.....	54
2.2. Metodologia de isolamento de micro-organismos endofíticos.....	54
2.2.1. Jenipapo, Caju, Sapoti.....	54
2.2.2. Camu-camu.....	55
2.3. Seleção de fungos biotransformadores de terpenos.....	56
2.3.1. Cultivo de fungos endofíticos para biotransformação.....	56
2.3.2. Análise por cromatografia gasosa (CG-DIC).....	57
2.3.3. Biotransformação de terpenos por fungos selecionados.....	58
2.3.4. Resistência da biomassa a diferentes concentrações de terpeno.....	59
2.3.5. Procedimento de microcultivo.....	60
3. Resultados e discussão.....	60
3.1. Isolamento e seleção de fungos endofíticos quanto ao potencial biotransformador de terpenos.....	60
3.2. Análises cromatográficas e seleção do potencial para biotransformação.....	61
3.3. Microcultivo para fungos biotransformadores.....	77
4. Conclusão.....	78
CONCLUSÃO GERAL.....	80
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO I.....	89
ANEXO II	90

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gilson e Stella, avó, Celme, e irmão, Luís Felipe, pelo amor incondicional. Aos pesquisadores que dedicam anos de trabalho à ciência, pela determinação.

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia Pastore, pela oportunidade, pela confiança, e pelos incentivos no trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e críticas construtivas que possibilitaram melhorias deste trabalho.

Aos meus queridos colegas do laboratório de bioaromas, em especial Nadir, Gustavo, Bruno, Angélica e Marina pela amizade, pelo companheirismo e pelos ensinamentos.

A Laura, Tássia, Alessandra e Érica, pessoas muito especiais, pela amizade e força em todos os momentos.

À Dra. Samara Kiihl, pelos conselhos profissionais.

A Alexandre e toda a família, pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 01. Empresas dominantes no mercado de flavorizantes e fragrâncias entre 2008 e 2012.....	02
Figura 02. Estrutura química do mentol.....	03
Figura 03. Estruturas químicas dos enantiômeros de carvona.....	04
Figura 04. Modelo de percepções de odor para diferentes enantiômeros de carvona.....	05
Figura 05. Isopreno, estrutura de referência para classificação de terpenos.....	07
Figura 06. Estruturas químicas de terpenos e terpenóides encontrados naturalmente.....	08
Figura 07. Representação esquemática para biossíntese de terpenos em vegetais superiores.....	09
Figura 08. Isômeros do Limoneno.....	10
Figura 09. (a) Caju (<i>A.occidentale</i>), (b) Jenipapo (<i>G.americana L.</i>) (c) <i>Myrciaria dubia</i>	13
Figura 10. Sapoti (<i>Manilkara zapota L.</i>).....	16

CAPÍTULO 1. REVIEW ARTICLE: ENDOPHYTES: RECENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND THE POTENTIAL FOR FLAVOR PRODUCTION

Figure 01. Chemical structures of important compounds concerning advances in biotechnology and flavors.....	29
---	----

CAPÍTULO 2. BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FRUTAS TROPICAIS

Figura 01. Limoneno e principais rotas de biotransformação.....	51
Figura 02. Rotas de biotransformação de α -pineno.....	53
Figura 03. Produção de álcool perílico por fungo endofítico L.B.-M.Z-3	62

Figura 04. Produção de verbenona a partir de α -pineno pelo fungo L.B.-M.D.1....	62
Figura 05. Produção de verbenona a partir de α -pineno pelo fungo L.B.-M.D.-4...	63
Figura 06. Estruturas químicas dos terpenóides obtidos.....	63
Figura 07. Produção média de álcool perílico ao longo de 96 h pelo fungo L.B.-M.Z.-3	66
Figura 08. Degradação de derivados perílicos.....	66
Figura 09. Produção média de verbenona pelo fungo L.B.-M.D.-1.....	68
Figura 10. Rendimentos médios de verbenona para o fungo L.B.-M.D.-4.....	68
Figura 11. Produções médias de verbenona a partir do fungo L.B.-M.D.-4, para diferentes condições de biotransformação.....	72
Figura 22. Modelos estimados de produção de verbenona ao longo do tempo, para cada tratamento, pelo fungo endofítico L.B.-M.D-4.....	73
Figura 13. Variação da biomassa do fungo L.B.-M.D.-4 em função de diferentes concentrações de α -pineno, em comparação com a massa inicial.....	76
Figura 14. Modelo de regressão para variação da biomassa em função da concentração de alfa pineno.....	76
Figura 15. Imagens do fungo LB-M.Z.- 3 por microscopia óptica após 24 h de crescimento em meio YM.	77
Figura 16. Imagens em 100, 200 e 400 vezes de aumento do fungo L.B.-M.D.-1, após 48 h de incubação em meio YM.....	77
Figura 17. Imagens após 72 h de incubação, apresentando o fungo L.B.-M.D.-4., ampliado 100, 200 e 400 vezes.....	78

ANEXO I

Figura 01. Isolamento de fungos endofíticos do camu-camu.....	89
Figura 02. Placa para microcultivo com L.B-M.Z.-3.....	89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. REVIEW ARTICLE: ENDOPHYTES: RECENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND THE POTENTIAL FOR FLAVOR PRODUCTION

Table 01. Natural aroma compounds resulted by endophytes biotransformation.....33

CAPÍTULO 2. BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FRUTAS TROPICAIS

Tabela 01. Lista da identificação de fungos endofíticos utilizados no trabalho.....61

Tabela 02. Médias de rendimento e erros-padrão para observações de triplicatas.....71

Tabela 03. Médias finais de massa para concentrações crescentes de α -pineno, e respectivos erros-padrão.....75

ANEXO II

Tabela 01. Teste de Wald para comparação rendimento de verbenona entre diferentes tratamentos.....90

Tabela 02. Diferenças estimadas entre tratamentos e diferenças significativas....90

Tabela 03. Análise de variância para variação de biomassa do fungo L.B.-M.D.-4 em função de concentrações crescentes de α -pineno91

Tabela 04. Diferenças estimadas de decréscimo de biomassa para diferentes tratamentos, em comparação com a amostra controle.....91

Tabela 05. Comparação entre tratamentos, dois a dois, na variação de biomassa do fungo L.B.-M.D.-4.....92

INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

Aromas influenciam diretamente a aceitabilidade de consumidores a alimentos. Fatores importantes relacionados a estes compostos são mencionados, tais como quiralidade, hidrofobicidade, volatilidade, *threshold*, e compostos-chave de impacto. A relevância da classe química de terpenos e seus derivados oxigenados, os terpenóides, é apresentada. Os aromas naturais já dominam alguns mercados, principalmente na Europa, e são geralmente preferidos por consumidores. As legislações de muitos países classificam como naturais não apenas os aromas obtidos por extrações tradicionais de matérias primas, mas também aqueles provenientes de processos biotecnológicos. Nesse contexto, bioprocessos para obtenção de aromas naturais têm sido cada vez mais estudados pelas indústrias. A biotransformação de terpenos é uma alternativa atraente, pela grande disponibilidade destes compostos na natureza, e presença em alguns resíduos industriais. A notável capacidade de transformação de fungos está relacionada à diversidade metabólica destes biocatalisadores, que têm contribuído para a produção biotecnológica de diversos produtos. Neste trabalho, os fungos foram isolados de frutas tropicais, apresentadas no final deste capítulo.

Palavras-chave: aromas, limoneno, α -pineno, fungos, biotransformação

1. Aromas e mercado

As indústrias de aromas estão principalmente sediadas na Europa, apesar de exercerem atividades em inúmeros países, e representam um mercado multimilionário. Este setor está em constante processo de desenvolvimento e inovação (SPEZIALI, 2012). A Figura 01 apresenta as empresas mais importantes economicamente neste setor entre 2008 e 2012:

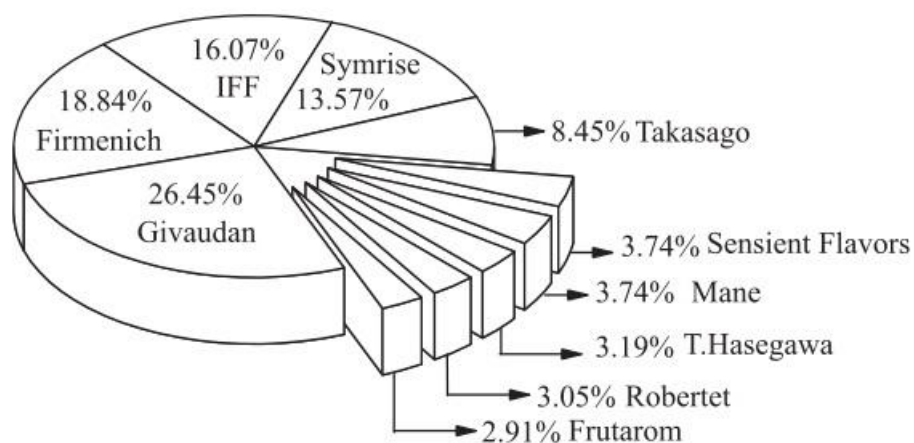


Figura 01. Empresas dominantes no mercado de flavorizantes e fragrâncias entre 2008 e 2012 (SPEZIALI, 2012)

Substâncias definidas como aromas são compostos orgânicos notavelmente perceptíveis pelo olfato, exercendo odores característicos, muitas vezes agradáveis (SURBURG e PANTEM, 2006b).

Compostos de aroma são predominantemente hidrofóbicos (FERON e WACHÉ, 2006), e são representados por diversos grupos químicos: alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos aromáticos, terpenos (SCHRADER, 2007). A vanilina, por exemplo, principal composto do aroma de baunilha (HAVKIN-FRENKEL e BELANGER, 2008), apresenta um grupo aldeído ligado ao anel aromático.

As substâncias não voláteis a temperatura ambiente como açúcares, ingredientes salgados ou amargos, contribuem em geral para o sabor de alimentos. Já as substâncias voláteis contribuem especialmente para o aroma, apesar de, em alguns casos, como no do mentol (Figura 02), podem exercer influência sobre o sabor (SERRA, 2007).

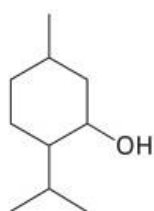


Figura 02. Estrutura química do mentol (ZACHARIAH e LEELA, 2006).

Apesar de aparência e textura serem os principais fatores de aceitação dos produtos por humanos, a importância dos aromas é fundamental (SURBURG e PANTEM, 2006b). A composição e intensidade de aromas e pigmentos influencia diretamente a aceitação pelos consumidores, assim como o valor comercial dos produtos (CSERHÁTI, 2010).

Um conceito muito aplicado para os compostos de aroma é denominado *threshold*, que pode ser definido como a concentração a partir da qual um aroma ou sabor é reconhecido, ou ainda, que é possível sua distinção de outros aromas (NOBLE e LESSCHAEVE, 2006). A presença de diferentes tipos de enantiômeros afeta a sensação associada ao odor e o *threshold* (BRENNAN, FUGANTI e SERRA, 2003).

O estudo químico de compostos - chave de impacto tem sido um grande alvo na pesquisa de aromas, visto que estão disponíveis na forma de complexas misturas de isômeros na natureza. Compostos - chave são particularmente importantes, uma vez que, se substituídos na formulação, modificam consideravelmente as características de odor. O mesmo não acontece com outros voláteis, cuja presença não é indispensável para a sensação final (SERRA, 2007).

A isomeria é outro fator relevante em aromas, visto que influencia na qualidade de sua percepção. Pela presença de um carbono quiral, a carvona apresenta dois enantiômeros (Figura 03), em consequência da distribuição espacial diferente de seus átomos (SELL, 2003). Enantiômeros compartilham propriedades físicas e químicas, mas apresentam propriedades de desvio de luz polarizada em direções opostas (SELL, 2003). Muitos aromas quirais são constituintes naturais de óleos essenciais em plantas.

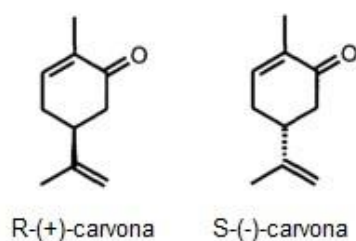


Figura 03. Estruturas químicas dos enantiômeros de carvona (adaptada) (SELL, 2003).

O enantiômero de R-(+)-carvona é principal responsável pelo aroma da alcarávia e componente majoritário (60%) do seu óleo essencial, enquanto o de S-(-)-carvona é lembrado pela nota de hortelã e compõe alta porcentagem do óleo desta planta (SCHRADER, 2007).

No processo de percepção, as informações sensoriais resultantes da interação entre moléculas de aromas com receptores olfativos e gustativos são processadas em determinadas áreas do cérebro, gerando a percepção (SURBURG e PANTEM, 2006b). A Figura 04 apresenta uma representação de influências da configuração química de isômeros de carvona na percepção sensorial.

As características que constituem os aromas têm sido elucidadas, visto a importância que tais atributos exercem sobre os consumidores. Nesse contexto, a seguir é destacada a relevância do desenvolvimento em pesquisa de aromas naturais.

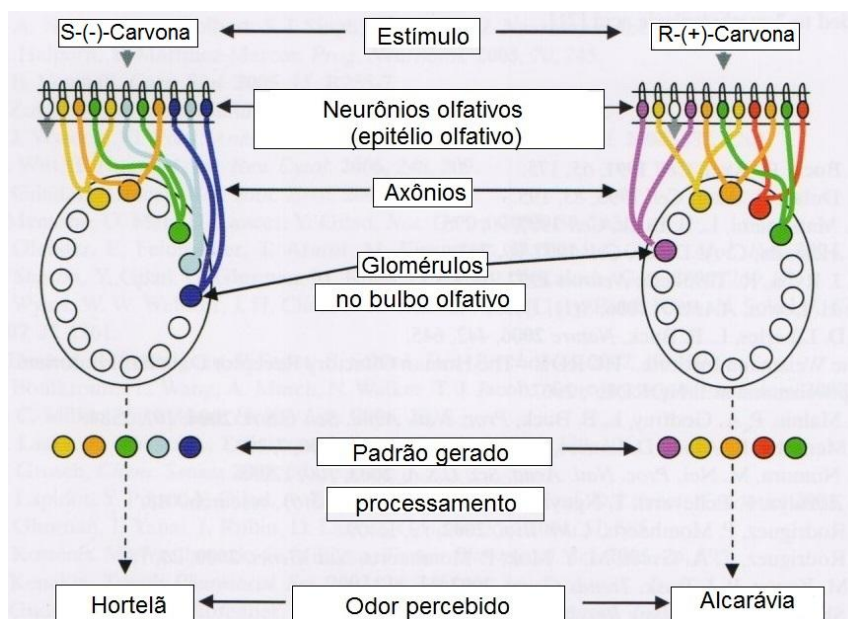


Figura 04. Modelo de percepções de odor para diferentes enantiômeros de carvona. Adaptação (KRAUTWURST, 2008).

1.1. Aromas naturais e suas aplicações na indústria

As indústrias de aromas sempre tiveram caráter inovador, e muitas investem até 8% do valor de suas vendas anuais em pesquisa e desenvolvimento, sendo um foco principal a obtenção de melhores características de seus produtos a baixos custos (GUENTHERT, 2007).

Os consumidores tendem a apreciar mais os produtos contendo aromas classificados como naturais, quando comparados aos aromas “idênticos aos naturais”, e isso influencia o preço de mercado dos primeiros, que são mais valorizados economicamente (SERRA, 2007). Até 2007, por exemplo, mais de 65% dos ingredientes de aromas nos Estados Unidos e União Européia já eram classificados como naturais (CRAVOTTO, 2007).

As legislações europeia e americana estabeleceram oficialmente que compostos classificados como naturais podem ser obtidos processos físicos, ou

seja, por extração de fontes naturais, ou ainda, por métodos enzimáticos ou microbianos, pela modificação de precursores naturais (SERRA, 2007).

Na legislação brasileira, aromas naturais são definidos pela Resolução RDC nº. 2, ANVISA, de 2007 como “aqueles obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais”, as quais são “produtos de origem animal ou vegetal aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como: torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático ou outros”.

Por muito tempo, a extração em tecidos de plantas foi a principal forma de obtenção de aromas, no entanto, existem algumas dificuldades relacionadas: compostos de interesse presentes em baixas concentrações, complexidade química da fonte exige formas elaboradas de extração (CRAVOTTO, 2007). Óleos essenciais, por exemplo, são misturas complexas quimicamente, podendo conter cerca de 100 componentes individuais (ZACHARIAH e LEELA, 2006). Outra limitação de métodos de extração natural seria a disponibilidade de matéria-prima, sujeita a limitações por sazonalidade (CRAVOTTO, 2007).

Assim, os setores relacionados a aromas e fragrâncias tem demonstrado interesse na substituição de compostos quimicamente sintetizados pelos de origem biotecnológica, que também podem ser classificados como naturais (SCHRADER e BERGER, 2008) sem, no entanto, serem extraídos na natureza. As principais vantagens de processos biotecnológicos para produção de aromas têm sido citadas, entre as quais: a maior aceitabilidade dos consumidores, alta especificidade da biocatálise e melhor qualidade dos químicos formados e processos sustentáveis, menos agressivos ao meio ambiente (SCHRADER e BERGER, 2008), a partir de substratos renováveis e condições operacionais mais brandas (BERGER, 2007).

2. Definição e importância dos terpenos

Terpenos ou isoprenóides são muito comuns na natureza e estão presentes principalmente, nos vegetais. Milhares destes compostos têm sido descritos como antibióticos, hormônios vegetais ou animais, lipídeos de membrana, mediadores de transportes eletrônicos essenciais à geração de energia, fragrâncias e sabores, e ainda, por sua capacidade de exercer atração sobre insetos (BUCKINGHAM, 2004; HUMPHREY e BEALE, 2006).

A fórmula geral atribuída aos terpenos $(C_5H_8)_n$ (REINECCIUS e HEATH, 1994) e a nomenclatura é atribuída de acordo com “n”, ou seja, o número de unidades isopreno (Figura 05) presentes na estrutura (ZACHARIAH e LEELA, 2006).

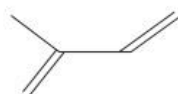


Figura 05. Isopreno, estrutura de referência para classificação de terpenos (ZACHARIAH e LEELA, 2006).

Muitos terpenos e seus derivados oxigenados estão presentes naturalmente em espécies de origem vegetal, como apresenta a Figura 06. O eucalipto *Eucalyptus citriodora*, representa uma fonte muito rica em citronelal (Figura 06 (c)), que constitui mais de 85% de seu óleo (SELL, 2003). O citronelol (Figura 6 (d)) é descrito como um aroma floral e está presente nos óleos de rosas (*Rosa* spp.) e do gerânio (*Pelargonium graveolens* L.) (SERRA, 2007).

O α -terpineol (Figura 06(a)) é um dos alcoóis mais disponíveis na natureza, presente em ervas como orégano e alecrim (SELL, 2003), e na *Mentha citrata* (ATTOKARAN, 2011). O Linalol (Figura 06 (b)), por sua vez, ocorre em ervas como coentro e manjeriço (SELL, 2003). O citral (Figura 06 (e)), que é um aroma característico do limão, pode ser obtido pela oxidação do geraniol (Figura 06 (f)), presente em flores como a rosa (SELL, 2003).

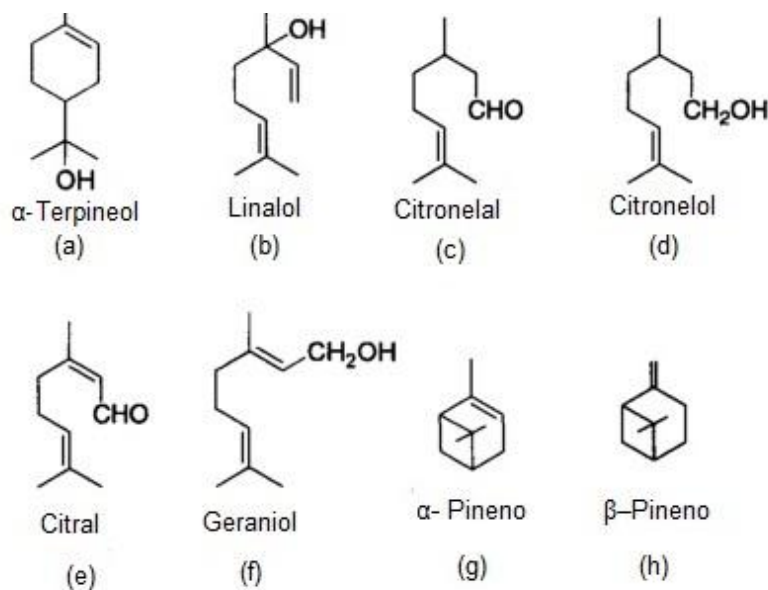


Figura 06. Estruturas químicas de terpenos e terpenóides encontrados naturalmente. Adaptação (SCHRADER e BERGER, 2008).

Acreditava-se que terpenos eram formados a partir de isoprenos, mas atualmente sabe-se que *in vivo* a formação dos mesmos ocorre a partir da construção de cadeias dos isômeros interconvertíveis de 5 carbonos, Isopentenil pirofosfato (IPP) e Dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) pela enzima prenil transferase (HUMPHREY e BEALE, 2006). O precursor das duas moléculas anteriormente descritas é o ácido mevalônico intermediário de seis carbonos que, por sua vez, foi formado a partir de duas moléculas de acetato, derivadas da acetil Coenzima A, através de uma rota bioquímica essencial à sobrevivência de vegetais superiores (ZACHARIAH e LEELA, 2006).

Os produtos dessa condensação entre IPP e DMAPP são geranil, farnesil, e geranil-geranil pirofosfatos, esqualeno e fitoeno, os principais precursores de outros terpenos (HUMPHREY e BEALE, 2006). A Figura 07 apresenta o esquema geral para biossíntese de terpenos.

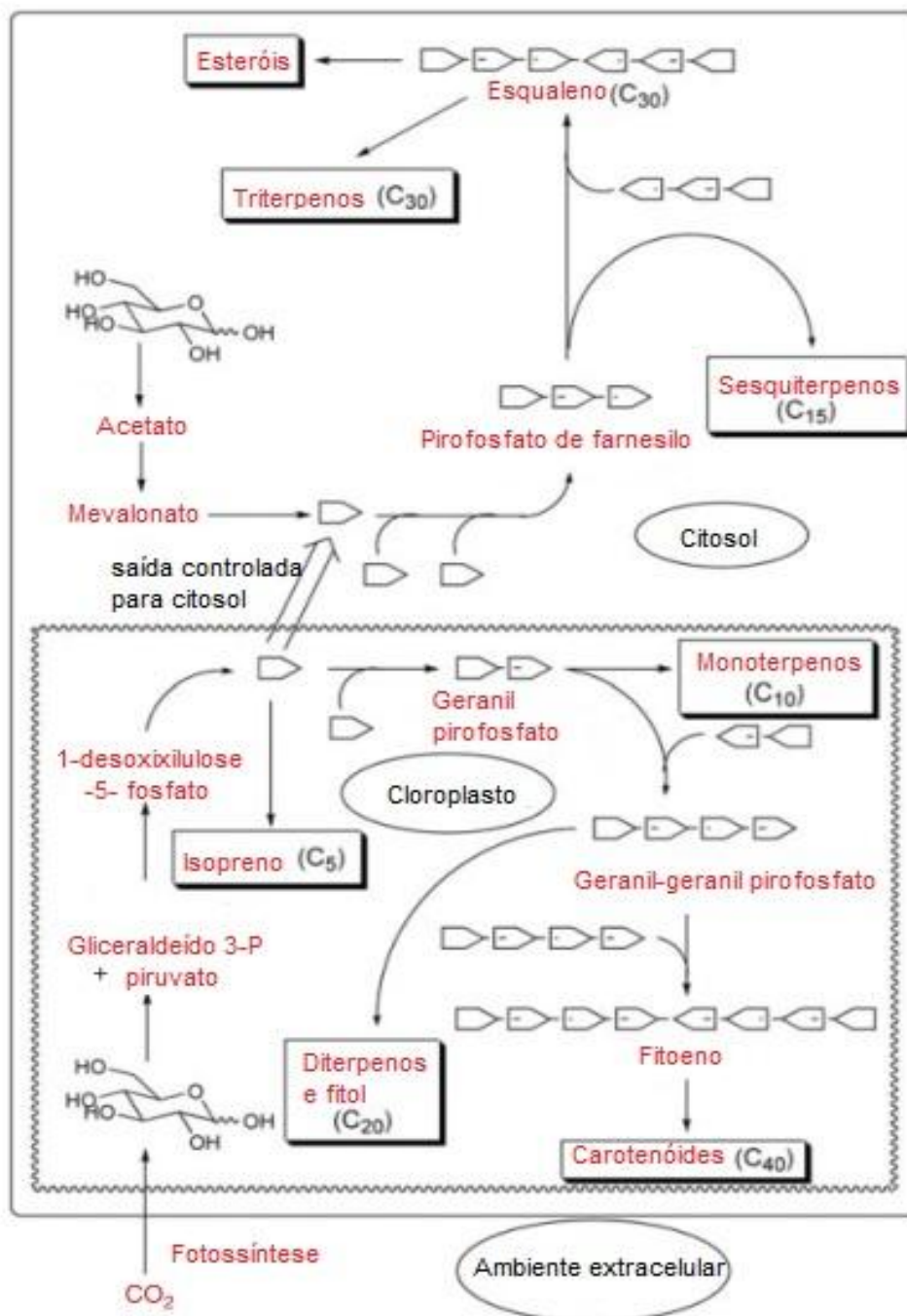


Figura 07. Representação esquemática para biossíntese de terpenos em vegetais superiores (adaptada) (HUMPHREY e BEALE, 2006). Blocos representam unidades isoprenil de 5 carbonos (IPP ou DMAPP).

2.1. Limoneno

Os enantiômeros do limoneno têm sido reportados como os terpenos monocíclicos mais abundantes na natureza: S(-)-limoneno está presente na *Mentha spp.* R(+)-limoneno, por sua vez, é o principal componente da casca de frutas como limão (DUETZ, BOUWMEESTER, BEILEN, *et al.*, 2003) e laranja, sendo que, nesta última, a composição é superior a 90% (SCHRADER, 2007). As estruturas dos enantiômeros do limoneno são apresentadas na Figura 08.

A utilização de R-(+)-limoneno para síntese de compostos de aroma e compostos funcionais tem sido considerada promissora do ponto de vista econômico (MARÓSTICA JÚNIOR e PASTORE, 2007). Além disso, importantes estudos feitos sobre doenças deste terpeno têm sido relatadas. Possíveis mecanismos de anticancerígenos do limoneno têm sido mencionados: indução de enzimas hepáticas detoxificantes (ELEGBEDE, MALTZMAN, ELSON, *et al.*, 1993), inibição da isoprenilação pós-translacional de pequenas proteínas G (CROWELL, CHANG, REN, *et al.*, 1991).

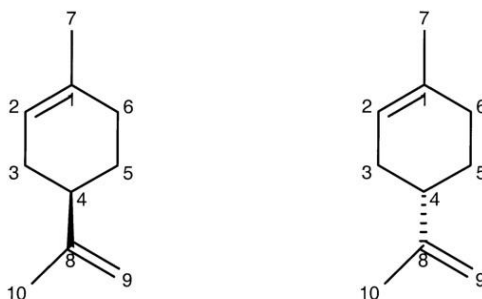


Figura 08. Isômeros de R-(+)-limoneno, à esquerda, e S(-)-limoneno, à direita. (DUETZ, BOUWMEESTER *et al.*, 2003).

2.2. Pinenos

α -Pinoeno (Figura 06 (g)) e β -Pinoeno (Figura 06 (h)) são os principais componentes do óleo de teribintina, de pinhos (BAŞER e DEMIRCI, 2007). α -Pinoeno puro pode ser obtido a partir da destilação do óleo de terebintina, e pode

ser utilizado para melhorar odores, mas sua maior utilização tem sido como precursor para síntese industrial de outros produtos (SURBURG e PANTEM, 2006a).

A taxa de diferentes pinenos na terebintina varia de acordo com as espécies vegetais de origem, mas em geral a quantidade de α -pineno é superior à de β -pineno no óleo (VAN DER SCHAFT, 2007).

Até 1950, a principal forma de obtenção de terebintina e pinenos era a partir de árvores vivas, mas nos últimos anos, a partir de métodos mais sustentáveis, estes compostos podem ser recuperados da terebintina sulfatada, através de resíduos de indústrias de papel (ERMAN e KANE, 2008). A terebintina sulfatada contém entre 20 e 25% de β -pineno e 60 a 70% de α -pineno (VAN DER SCHAFT, 2007).

2.3. Terpenóides

Os compostos oxigenados derivados dos terpenos são denominados terpenóides, sendo que muitos são caracterizados por odores agradáveis e marcantes (SURESH, RITU e RAVISHANKAR, 2006). Diversos grupos estão presentes: alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres (REINECCIUS e HEATH, 1994). Alguns derivados de terpenos são bastante valorizados na indústria de aromas e perfumaria (BUSMANN e BERGER, 1994), como linalol e álcool fenil etílico (BHAT, NAGASAMPAGI e SIVAKUMAR, 2005).

Os terpenóides estão frequentemente presentes nos óleos essenciais, sendo os principais responsáveis pelos seus aromas característicos (REINECCIUS e HEATH, 1994; SCHAFT, GEEL, JONG, *et al.*, 1994). Mono e sesquiterpenóides estão presentes especialmente nas plantas utilizadas para produção de óleos essenciais e, nesse sentido, várias famílias botânicas são importantes, como Lamiaceae, Verbenaceae, Valerianaceae, Araliaceae, Myrtaceae, Anarcadiaceae, Orchidaceae, entre outras (BHAT, NAGASAMPAGI *et al.*, 2005).

Ação preventiva contra o câncer tem sido atribuída a terpenóides, assim como a saponinas, carotenóides, flavonóides, isotiocianatos, vitaminas A, C, E, muitos destes compostos presentes em plantas (BIRT, SHULL e YAKTINE, 1998; BIRT, HENDRICH e WANG, 2001). Estudos recentes têm evidenciado propriedades biológicas de terpenóides da manga, sustentando esta fruta como um alimento funcional (RIBEIRO e SCHIEBER, 2010).

3. Frutas tropicais

3.1. Caju (*Anacardium occidentale* L.)

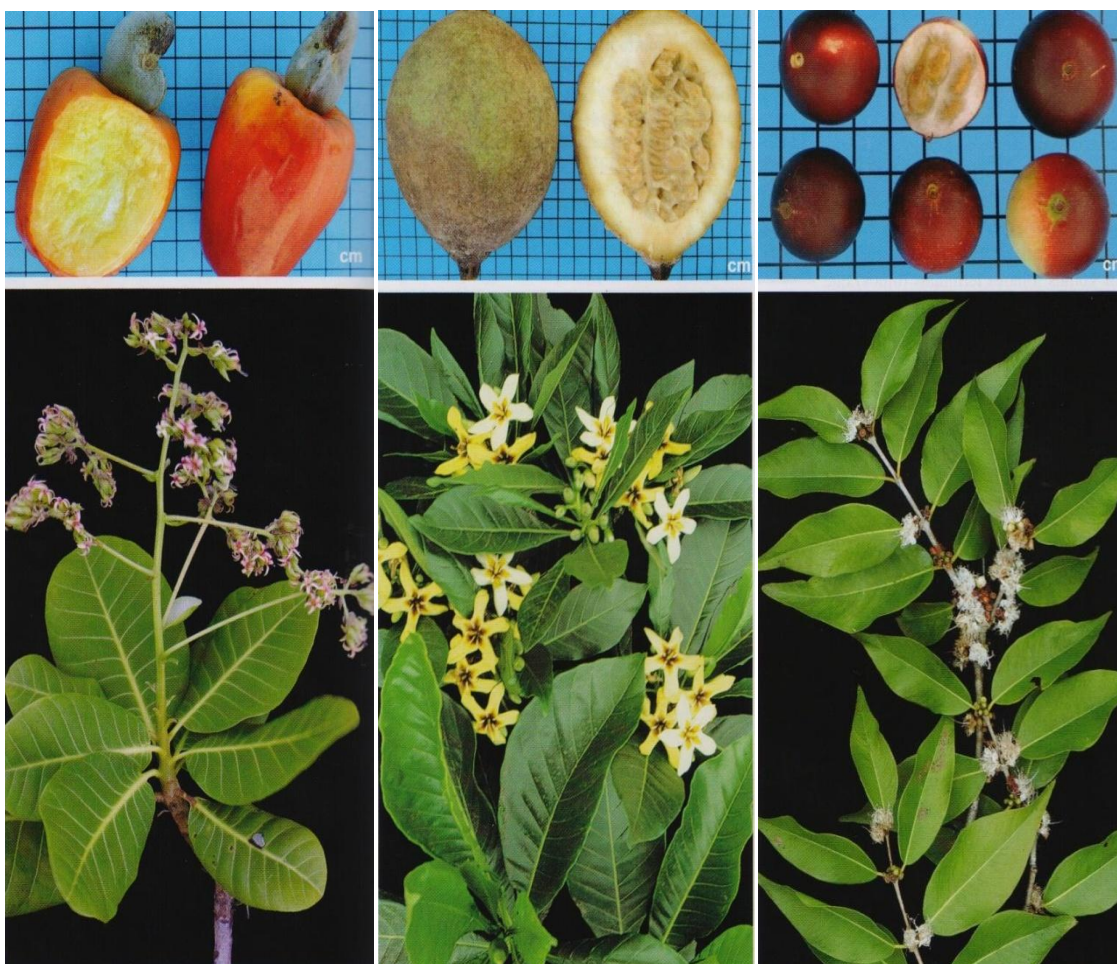
O caju está presente em todos os estados do Norte e Nordeste do Brasil, e pertence à família Anacardiaceae. É uma fruta de grande importância comercial e conhecida mundialmente (SILVA, 2006).

O caju é resultante do desenvolvimento do pedúnculo floral em pseudofruto carnosos. O mesocarpo do fruto contém uma óleo-resina cáustica (líquido da castanha de caju) e internamente está presente uma amêndoa comestível (LORENZI e MATOS, 2008).

O consumo *in natura* do caju é muito comum, mas a fruta é também utilizada em sucos, doces e sorvetes. A goma purificada deste fruto tem sido utilizada para agregação de comprimidos, em substituição à goma-arábica proveniente do continente africano (LORENZI e MATOS, 2008).

Recentemente, pesquisas têm sido feitas com propósito de desenvolver novos produtos, entre os quais *hamburgers* de baixo teor de gordura constituídos por pedúnculos de caju como fonte de fibras (PINHO, AFONSO, CARIOCA, *et al.*, 2011).

O aroma característico da fruta é atribuído aos compostos hexanal, limoneno e car-3-eno (LORENZI e MATOS, 2008). O caju é apresentado na Figura 09 (a) (LORENZI e MATOS, 2008).



(a)

(b)

(c)

Figura 09. (a) Caju (*A. occidentale*), (b) Jenipapo (*G. americana* L.) (c) *Myrciaria dubia* (LORENZI e MATOS, 2008).

3.2. Jenipapo (*Genipa americana* L.)

O fruto de 8 a 10 cm de diâmetro é descrito como globoso, de polpa adocicada e sementes achatadas de cor creme (LORENZI e MATOS, 2008). O consumo na forma de balas, geléias, sorvetes, sucos, licores é mais comum, ao invés do consumo direto como fruta fresca, devido ao sabor forte (BORGES e REZENDE, 2000). A Figura 09 (b) (LORENZI e MATOS, 2008) apresenta o jenipapo.

Um dos principais minerais mais presentes na *Genipa americana* L. é o cálcio com 13.23 mg/100 g de peso úmido, mas de maneira geral, este foi considerado um valor baixo se comparado ao valor da IDR (ingestão diária recomendada) para este mineral (DE SOUZA, PEREIRA, QUEIROZ, *et al.*, 2012).

A polpa e a semente de jenipapo são fontes consideráveis de fitoesteróis totais, com 216 mg/100g e 233 mg/100g, respectivamente (COSTA, BALLUS, TEIXEIRA-FILHO, *et al.*, 2010)

O potencial antioxidante do extrato etanólico da polpa de jenipapo foi estudado e sua utilização no desenvolvimento de novos produtos para retardar a ação dos radicais livres foi incentivada recentemente (OMENA, VALENTIM, GUEDES, *et al.*, 2012). Outra aplicação desta espécie seria na biorremediação de contaminação causada por íons Cr ⁺³ e Cr ⁺⁶ (SANTANA, DE ALMEIDA, SOUZA, *et al.*, 2012).

Voláteis presentes no jenipapo têm sido identificados: ácidos butírico, hexanóico 2-metil-butírico, 3-metil butírico, conferindo pungência, enquanto os etil ésteres dos dois últimos ácidos estão relacionados ao odor de frutas (BORGES e REZENDE, 2000).

Ácido geniposídico, de atividade antitumoral (ROBINEAU, 1995) e os ácidos genípico e genipíco, tem sido encontrados no jenipapo (LORENZI e MATOS, 2008), sendo que atividade antimicrobiana tem sido atribuída aos dois últimos ácidos (TALLENT, 1964). O manitol também faz parte da composição deste fruto, que tem sido recomendado contra pressão alta (ROBINEAU, 1995).

3.3. Camu-camu (*Myrciaria dubia*)

Os frutos globosos e arroxeados, apresentados na Figura 09 (c) apresentam polpa carnosa e ácida (LORENZI e MATOS, 2008). O Camu-Camu, natural da região amazônica, tem sido apresentado como excelente fonte de compostos bioativos, entre os quais vitamina C, compostos fenólicos e

carotenóides (AKTER, OH, EUN, *et al.*, 2011). Adicionalmente, esta fruta também é boa fonte de potássio, cálcio e fósforo, além de aminoácidos como serina, valina e leucina (ZAPATA e DUFOUR, 1993).

A composição desta fruta em vitamina C supera muitas frutas, uma vez que no Camu-camu ($1882 \pm 43.2/100$ g de matéria úmida), o conteúdo é bem superior ao de frutas como acerola (1357 ± 9.5 mg/100 g de matéria úmida) e açaí (84.0 ± 10 mg/100 g de matéria úmida) (RUFINO, ALVES, DE BRITO, *et al.*, 2010).

3.4. Sapoti (*Manilkara zapota* L.)

De todas as espécies derivadas do gênero *Manilkara*, esta é a espécie mais importante, pois dela são obtidos látex, a fruta e madeira serrada (MATHEWS e SCHULTZ, 2009). O látex de seu tronco é utilizado na fabricação de gomas de mascar (SILVA, 2006). Seus frutos podem crescer até 10 cm de diâmetro e a forma varia de arredondada a elíptica (MATHEWS e SCHULTZ, 2009). A fruta é caracterizada por uma casca marrom, e polpa amarelada ou avermelhada, aroma e sabor agradáveis, podendo pesar entre 70 e 200 g (KUTE, 1995). A fruta é apresentada na Figura 10 (adaptada).

Este fruto é nativo do Sul do México e da América Central, mas está presente desde o estado de São Paulo até a Região Amazônica. O nordeste do Brasil é grande região produtora, destacando-se Pernambuco (BRITO, MENDONÇA, DE MEDEIROS, *et al.*, 2007).

O sapoti já era apreciado por maias e astecas desde os tempos antigos (SILVA, 2006). A planta pertence à família Sapotaceae, e seu fruto, frequentemente consumido *in natura* ou como doces e geléias, apresenta sabor adocicado, e levemente adstringente (MIRANDA, SILVA, FILGUEIRAS, *et al.*, 2002). A adstringência no sabor tem sido atribuída à alta presença de taninos (MATHEWS e SCHULTZ, 2009).

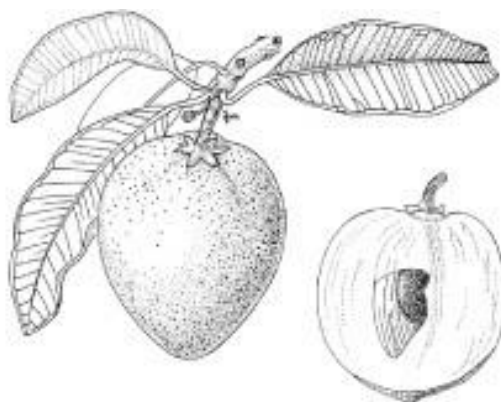


Figura 10. Sapoti (*Manilkara zapota* L.) (PAULL, 2012).

Pesquisas tem sugerido grande potencial para aplicação do extrato da casca de semente de sapoti em cosméticos capazes de retardar o envelhecimento (KANLAYAVATTANAKUL e LOURITH, 2011). A atividade antioxidante destes frutos foi atribuída à presença de polifenóis como catequina e galocatequina (SHUI, WONG e LEONG, 2004).

4. Obtenção de compostos de interesse por fungos

O progresso biotecnológico na obtenção de produtos por micro-organismos nos últimos anos tem sido considerável: destacam-se fungos filamentosos, que tem sido biocatalisadores para produção de enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, e compostos de aroma (ARCHER, CONNERTON e MACKENZIE, 2008). A versatilidade metabólica destes micro-organismos tem favorecido tais avanços, assim como os recentes estudos sobre as sequências genômicas envolvidas nas sínteses (ARCHER, CONNERTON *et al.*, 2008)

Fungos exercem notável capacidade de transformação sobre substratos abundantes, como terpenos, muito disponíveis na natureza, e possibilitam a oportunidade de melhora da viabilidade econômica de processos biotecnológicos (AGRAWAL, 2004).

Interações entre micro-organismos e plantas são importantes para a saúde e vigor das plantas e as novas espécies microbianas simbiotes tem

desempenhado importância em diversas indústrias dos setores farmacêutico, biotecnológico e alimentício, assim como na agricultura (JEFFRIES, 2004). Evidências científicas sugerem fungos endofíticos como fontes de diversidade genética e de espécies inexploradas, e o potencial como agentes de controle biológico e produtores de novos metabólitos na medicina já é conhecido (STONE, BACON e JR, 2000). A associação dos endofíticos a seus hospedeiros envolve neutralização das defesas dos mesmos, interação bioquímica e adaptação de rotas, e tais mecanismos são muitas vezes intermediados por metabólitos secundários (JEFFRIES, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R. **Flavors and Aromas**. New York, Marcel Dekker, v.21 2004. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications.

AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J.-B., *et al.* Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v.44, n. 7, p.1728-1732 2011.

ARCHER, B. D.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. **Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids - Food Biotechnology**. Berlin, Springer, v.111 2008. Advances in Biochemical and Engineering/Biotechnology.

ATTOKARAN, M. **Natural Food Flavors and Colorants**, Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, 2011.

BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, F. **Chemistry of Essential Oils**, Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

BERGER, R. G. **From fermentation to white biotechnology: how microbial catalysts generate flavours**. Boca Raton, CRC Press, 2007. Modifying flavour in food.

BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Terpenoids**, Narosa Publishing House, 2005. Chemistry of Natural Products.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Q. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids **Pharmacology & therapeutics**, v.90, n. 155-177 2001.

BIRT, D. F.; SHULL, J. D.; YAKTINE, A. **Chemoprevention of cancer**. Baltimore, Williams & Wilkins, v.81 1998. Modern Nutrition in Health and Disease.

BORGES, E. S.; REZENDE, C. M. Main Aroma Constituents of Genipap (*Genipa americana* L.) and Bacuri (*Platonia insignis* M.). **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n. 1, 2000/01/01, p.71-74 2000.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: asymmetry**, v.14, n. 1, p.1-42 2003.

BRITO, C. D. C.; MENDONÇA, V.; DE MEDEIROS, P. V. Q., *et al.* Adubação nitrogenada em cobertura na produção de porta-enxertos de saptizeiro [*Manilkara Zapota* (L.) Von Royen] **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.03, p.08-13 2007.

BUCKINGHAM, J. Dictionary of Natural Products - Version 9.2 CD-ROM. London, New York: Chapman & Hall/ CRC Press 2004.

BUSMANN, D.; BERGER, R. G. **Bioconversion of terpenoid hydrocarbons by basidiomycetes**, Elseiver, v.35 1994. Developments in Food Science - Trends in Flavor Research.

COSTA, P. A. D.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J., *et al.* Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v.43, n. 6, p.1603-1606 2010.

CRAVOTTO, G. **Extraction of flavourings from natural sources**. Boca Raton, CRC Press, 2007. Modifying flavour in food.

CROWELL, P. L.; CHANG, R. R.; REN, Z., *et al.* Selective Inhibition of Isoprenylation of 21-26-kDa Proteins by the Anticarcinogen d-Limonene and its Metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n. 26, p.17679-17685 1991.

CSERHÁTI, T. **Food and Food Products**, Springer, 2010. Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances.

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F., *et al.* Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v.134, n. 1, p.381-386 2012.

DUETZ, W. A.; BOUWMEESTER, H.; BEILEN, J. B., *et al.* Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n. 4, 2003/05/01, p.269-277 2003.

ELEGBEDE, J. A.; MALTZMAN, C. E.; ELSON, C. E., *et al.* Effects of Anticarcinogenic Monoterpenes on Phase II Hepatic Metabolizing Enzymes **Carcinogenesis**, v.14, n. 6, p.1221-1223 1993.

ERMAN, M. B.; KANE, B. J. **Chemistry Around Pinene and Pinane: A Facile Synthesis of Cyclobutanes and Oxatricyclo-Derivative of Pinane from cis- and trans- Pinanols.** Zurich, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2008. Current Topics in Flavor and Fragrance Research.

FERON, G.; WACHÉ, Y. **Microbial Biotechnology of Food Flavor Production.** Boca Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology.

GUENTHER, M. **The Flavour and Fragrance Industry—Past, Present, and Future** Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. **Biotechnological production of Vanillin,** Blackwell Publishing Ltd, v.83-103 2008. Biotechnology in Flavor Production.

HUMPHREY, A.; BEALE, M. H. **Terpenes,** Blackwell Publishing Ltd, 2006. Plant Secondary Metabolites.

JEFFRIES, P. **Microbial Symbioses with Plants.** Washington, D.C., ASM Press, 2004. Microbial Diversity and Bioprospecting.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic applications. **Process Biochemistry**, v.46, n. 11, p.2215-2218 2011.

KRAUTWURST, D. **Human Olfactory Receptor Families and Their Odorants**. Zurique, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2008. Current Topics in Flavor and Fragrance Research.

KUTE, L. S. **Sapota (Sapodilla)**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995. Handbook of Fruit Science and Tecnology.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil - Nativas e exóticas**, Instituto Plantarum de estudos da flora Ltda - RR Donnelley, 2008.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v.30, p.382-387 2007.

MATHEWS, J. P.; SCHULTZ, G. P. **Chicle : the chewing gum of the Americas, from the ancient Maya to William Wrigley**. Tucson, University of Arizona Press, 2009.

MIRANDA, M. R. A. D.; SILVA, F. S. D. A., RICARDO ELESBÃO;; FILGUEIRAS, H. A. C., *et al.* Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condição de ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.24, n. 3, p.644-646 2002.

NOBLE, A. C.; LESSCHAEVE, I. **Sensory analysis of food flavor**, CRC Press, 2006. Flavor in Food.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. D. S., *et al.* Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v.49, n. 1, p.334-344 2012.

PAULL, R. E. American fruit. **Crop Production Science in Horticulture**. PAULL, R. E. e DUARTE, O.: CAB International. 2 2012.

PINHO, L. X.; AFONSO, M. R. A.; CARIOCA, J. O. B., *et al.* The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Food Science and Technology**, v.31, p.941-945 2011.

REINECCIUS, G.; HEATH, H. B. **Flavor Chemistry**, Aspen Publishers, Inc., 1994. Source Book of Flavors.

RIBEIRO, S. M. R.; SCHIEBER, A. **Bioactive compounds in mango**, Elsevier Inc., 2010. Bioactive Foods in Promoting Health - Fruits and Vegetables.

ROBINEAU, L. G. **Hacia una farmacopea caribeña**. Santo Domingo, Enda-Caribe UAG & Universidad de Antioquia, 1995. 696p p.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S., *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, n. 4, p.996-1002 2010.

SANTANA, K. B.; DE ALMEIDA, A. A. F.; SOUZA, V. L., *et al.* Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v.80, p.35-42 2012.

SCHAFT, P. V. D.; GEEL, I. V.; JONG, D. G., *et al.* **Microbial production of natural furfurylthiol**, Elsevier Science B.V., v.35 1994. Trends in Flavour Research.

SCHRADER, J. **Microbial flavour production**, Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

SCHRADER, J.; BERGER, R. G. **Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds**, Wiley - VCH, v.10 2008. Biotechnology: Special processes.

SELL, C. S. **A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry** Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2003.

SERRA, S. **Chiral chemistry and food flavourings**. Boca Raton, CRC Press, 2007. Modifying flavour in food

SHUI, G.; WONG, S. P.; LEONG, L. P. Characterization of Antioxidants and Change of Antioxidant Levels during Storage of Manilkara zapota L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n. 26, 2004/12/01, p.7834-7841 2004.

SILVA, S. **Maravilhas do Brasil - Frutas** São Paulo Escrituras editora, 2006.

SPEZIALI, M. G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do "cheiro". **Química Nova**, v.35, p.861-864 2012.

STONE, J. K.; BACON, C. H.; JR, J. F. W. **An overview of endophytic microbes: Endophytism defined**. New York, Marcel Dekker, Inc., 2000. Microbial Endophytes.

SURBURG, H.; PANTEM, J. **Individual Fragrance and Flavor Materials** Weinheim, Wiley-VCH, 2006a. Common Fragrance and Flavor Materials.

SURBURG, H.; PANTEM, J. **Introduction**. Weinheim, Wiley-VCH, 2006b. Common Fragrance and Flavor Materials.

SURESH, B.; RITU, T.; RAVISHANKAR, G. A. **Biostranformations as Applicable to Food Industries**. Boc Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology.

TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**, v.20, n. 7, p.1781-1787 1964.

VAN DER SCHAFT, P. H. **Chemical Conversions of Natural Precursors**, Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

ZACHARIAH, T. J.; LEELA, N. K. **Volatiles from herbs and spices**. Boca Raton, CRC Press, v.3 2006. Handbook of herbs and spices.

ZAPATA, S. M.; DUFOUR, J.-P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: Chemical composition of fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.61, n. 3, p.349-351 1993.

CAPÍTULO 1 – REVIEW ARTICLE

ENDOPHYTES: RECENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND THE POTENTIAL FOR FLAVOR PRODUCTION

Artigo publicado na Food Research International 52 (2013) 367–372.

ABSTRACT

The ongoing development of biotechnology-produced flavor compounds has led to the utilization of a special group of plant-associated microbes, called endophytes, which have emerged as a promising resource for new bioactive compounds. Through a long-term coexistence with their hosts, these microbes have developed powerful metabolic pathways from which numerous highly beneficial volatile organic compounds have been reported. With a focus on new potential flavor compounds, this review aims to present recent discoveries and research that points to endophytes as promising biocatalysts of the future.

Keywords: flavor compounds, volatile compounds, biotransformation, bioconversion, endophytes

1. Biotechnological flavors: general overview

The trending concept “green label” refers to the preference of consumers for ingredients and food additives that are organic/natural (JOPPEN, 2006). Similarly, an increasing sensitivity toward ecological systems has resulted in a demand for environmentally friendly processes, a trend that has strengthened the market for flavor compounds of biotechnological origin (DUBAL, TILKARI, MOMIN, *et al.*, 2008).

Biotransformation catalysis can be carried out under mild conditions, such as ambient temperature, without the need for high pressures and extreme conditions, which effectively decreases energy demands and therefore costs (SURESH, RITU e RAVISHANKAR, 2006).

As biocatalysts, microorganisms add stereospecificity to bioprocesses, thereby reducing complicated separation and purification steps (BORGES, BORGES, PUPO, *et al.*, 2008). This feature is especially applicable to flavor compounds, once different isomers of the same compound possess their own unique aromatic properties (DE CARVALHO e DA FONSECA, 2006).

Because biotechnology presents a cost-effective and renewable source of bioactive products, many flavor compounds obtained by this means are likely to become substitutes for their synthetic counterparts (ROTTAVA, CORTINA, ZANELLA, *et al.*, 2010; PIMENTEL, MOLINA, DIONISIO, *et al.*, 2011).

The bio-route for flavor synthesis is based on *de novo* microbial processes (fermentation) or on bioconversions of natural precursors with microbial cells or enzymes (biotransformation) (FERON e WACHÉ, 2006). In general, microorganisms are capable to produce an amazingly broad array of flavor compounds, by *de novo* synthesis, such as monoterpenes and esters by *Saccharomyces cerevisiae* (CARRAU, MEDINA, BOIDO, *et al.*, 2005; CARRAU, MEDINA, FARIÑA, *et al.*, 2010). On the other hand, biotechnologists have focused on bioconversion processes that offer more economic advantages (FERON e WACHÉ, 2006).

Different classes of microorganisms have been described by relating their individual biosynthetic pathways to the production of specific flavor compounds. For example, whereas yeasts have developed carbon-carbon coupling and powerful esterification capabilities, bacteria are recognized more for producing metabolites such as carboxylic acids and simple alcohols (BERGER, 2009). In addition to a remarkable plant-like flavor metabolism by basidiomycetes reported by the same author, other important odor-active compounds, such as monoterpenol p-mentha-1,4-dien-9-ol, have also been discovered (KRINGS, BRAUER, KASPERA, *et al.*, 2005). Either as pure compounds or as constituents of proprietary mixtures, more than 100 commercially available flavors are produced through biotechnology (BERGER, KRINGS e ZORN, 2010).

1.1. Volatile organic compounds and their importance as flavoring agents

Volatile organic compounds (VOCs) are described as carbon-based solids and liquids capable of entering the gas phase by vaporization at 0.01 kPa and temperatures near 20 °C (PAGANS, FONT e SÁNCHEZ, 2006).

These compounds can be also defined as any compound of carbon, excluding carbon monoxide, carbon dioxide, carbonic acid, metallic carbides or carbonates, and ammonium carbonate, which participates in atmospheric photochemical reactions, except those designated by EPA (United States Protection Environmental Agency) as having negligible photochemical reactivity (Code of Federal Regulations, 40: Chapter 1, Subchapter C, Part 51, Subpart F, 51100).

Diverse chemical species such as alkanes, alkenes, alcohols, carbonyls, esters and acids are examples of VOCs (PEÑUELAS e LLUSIÀ, 2001). Isoprene (Fig. 1-G) and monoterpenes are especially noteworthy as they were previously reported as the primary volatile organic compounds emitted by plants (GUENTHER, HEWITT, ERICKSON, *et al.*, 1995). Menthol (Fig. 1-A), fruit esters, vanillin (Fig. 1-B) and other volatile flavors are considered the most valuable compounds in food formulations (BERGER, SCHEPER e SCHÜGERL, 2005).

2. Plant-associated microorganisms as pleasant flavor resources

Plant-associated microorganisms such as fungi are known to exist both on plant surfaces (epiphytes) and inside plant tissues (endophytes). Though epiphytes and endophytes coexist within only millimeters of each other, they are usually studied separately (SANTAMARÍA e BAYMAN, 2005).

Scientists studying diverse plant-associated microbes for their potential roles in the production of volatile flavor compounds have achieved interesting results. For example, *Penicillium solitum*, isolated from the surface of kiwi (*Actinidia deliciosa*) has revealed a high tolerance for monoterpenes and can transform α -pinene (Fig. 1-C) into verbenone (Fig. 1-D), yielding 35 mg/L after 11 days in shaker flasks (PESCHECK, MIRATA, BRAUER, *et al.*, 2009). Additionally, verbenone represents a valuable aroma compound costing on average, US\$ 500,00/kg (assay \geq 93%, Sigma-Aldrich Corporation).

A biotechnological application for the epiphytic methylotrophic bacteria as a promising flavor-stimulating agent has recently been suggested. Using greenhouse-grown plants, scientists evaluated the interaction between this microorganism and strawberries. Spraying *Methylobacterium extorquens*, DSM 21961, on strawberry plants during the flowering stage resulted in a higher concentration of the important aroma compound, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furanone (DMHF, Fig. 1-P), compared to untreated plants (VERGINER, SIEGMUND, CARDINALE, *et al.*, 2010).

3. Endophytes: general concepts and relevance

Regarded as underexplored biocatalysts (RODRÍGUEZ, REYES, BARTON, *et al.*, 2011), endophytes species are able to live inside plant tissues without inducing any apparent symptoms in their hosts; for this reason,

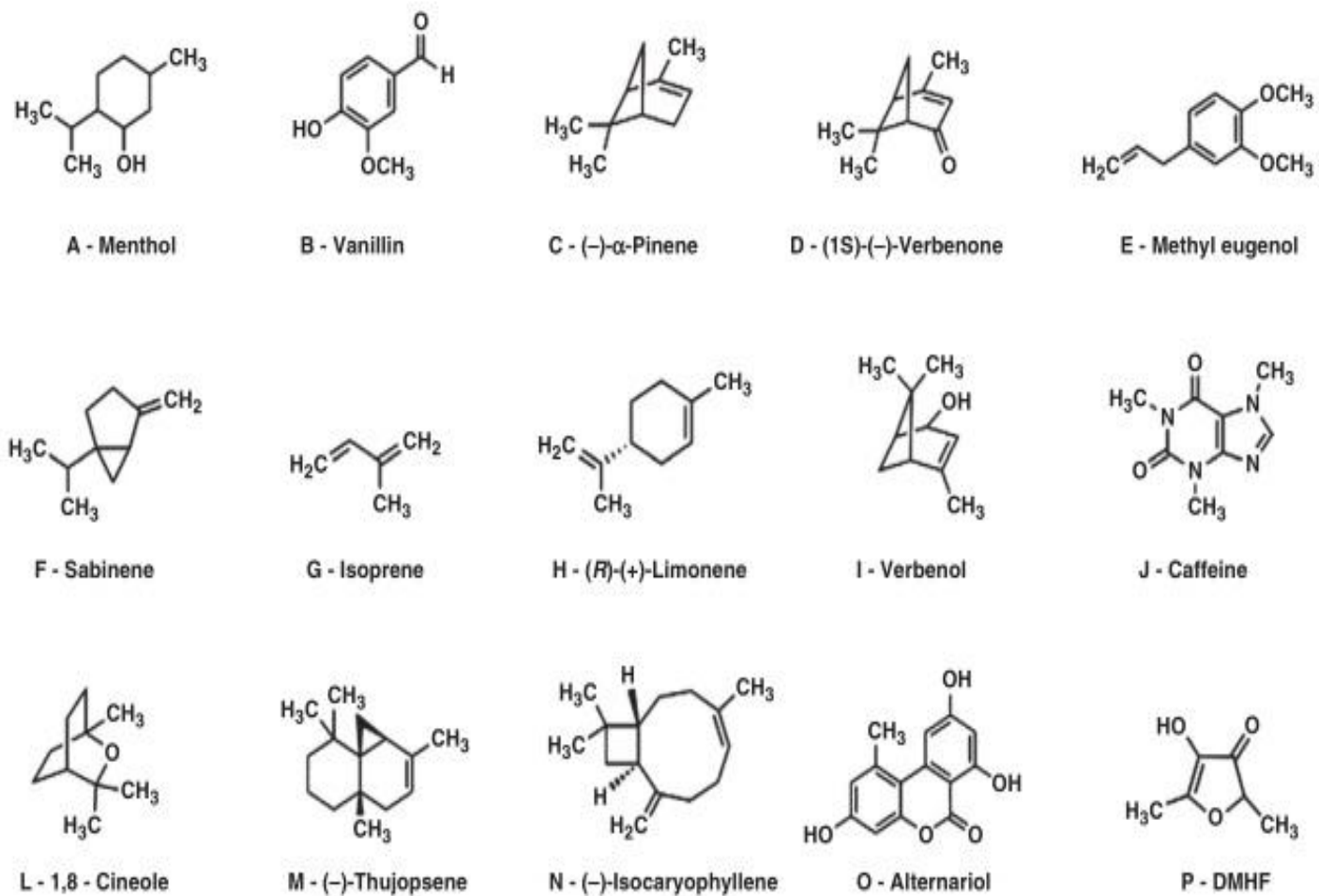


Figure 01. Chemical structures of important compound concerning andances in biotechnology and flavors.

endophytes have been receiving increasing attention from scientists since the latter part of the twentieth century (ZABALGOGEAZCOA, 2008). Fungi and bacteria are the most common microbes that exist as endophytes (STROBEL e DAISY, 2003).

Ecosystems exhibiting the greatest plant diversity are highly competitive and are likely to contain abundant endophytic populations, and these environments require that microorganisms are properly adapted to chemical diversity (STROBEL e DAISY, 2003). Brazil, for example, could be a source of such endophytic populations as it is home to over 40,000 vegetable-rich plant species that have yet to be used to their full potential (OLIVEIRA, YAMADA, FAGG, *et al.*, 2012).

Previous reports have suggested that endophytes may have developed genetic systems that allow the transfer of information between themselves and the host plant (BORGES, BORGES, BONATO, *et al.*, 2009). In addition, long-term coexistence with their hosts has resulted in a coevolutionary process through which these microorganisms have acquired interesting capabilities, such as powerful transformation. For instance, some endophytes are able to synthesize biologically active substances similar to the secondary metabolites produced by their hosts (WANG e DAI, 2011). This feature, if properly harnessed through biotechnology, could be very beneficial.

Endophytes have been recognized as outstanding sources of novel bioactive compounds (STROBEL, 2003). Their volatile organic compounds benefit host plants by providing additional lines of defense against pathogens (MACÍAS-RUBALCAVA, HERNÁNDEZ-BAUTISTA, OROPEZA, *et al.*, 2010). Recent studies on endophytes, however, have highlighted these small gas-phase molecules more for their potential exploitation through biotechnology (MORATH, HUNG e BENNETT, 2012). A group of microorganisms that is of particular interest from a biotechnology standpoint is the volatile producing endophytes (VPEs), which are known for their ability to produce a broad spectrum of aromatic compounds, including pleasant VOCs, which possess useful agricultural and industrial properties (ZHI-LIN, YI-CUN, BAI-GE, *et al.*, 2012).

Applications for the natural products of endophytes have included antibiotics, anticancer treatment, biological control and others (JOSEPH e PRIYA, 2011). Considering their enormous potential, endophytes should also be explored for new compounds of industrial and economic interest.

3.1. Recent discoveries related to aroma compounds and endophytes

Recognized as an important bioactive substance, methyl eugenol (Fig. 1-E) is used in the pharmaceutical and flavor industries. The compound has been used as a flavoring agent in the production of non-alcoholic beverages, jellies, pudding, candy, relish and baked goods (KAUL, WANI, DHAR, *et al.*, 2008). This substance has been described as the main natural component in Mexican pimento (*Pimenta dioica Merrill*), berry oil (GARCÍA-FAJARDO, MARTÍNEZ-SOSA, ESTARRÓN-ESPINOSA, *et al.*, 1997) and *Ocimum sanctum* leaf oil (VANI S. R., 2009). Methyl eugenol is also a volatile component in rose oil (JIROVETZ, BUCHBAUER, STOYANOVA, *et al.*, 2005). Scientists first reported methyl eugenol as a secondary metabolite produced by endophytic strains of *Alternaria* isolated from both cultivated and wild *Rosa damasceana* (KAUL, WANI *et al.*, 2008), thereby affirming the strong association between microorganisms of this sort and their hosts.

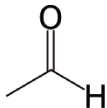
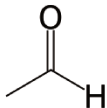
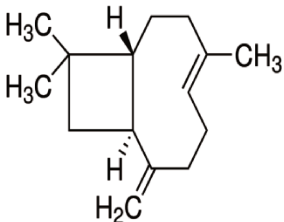
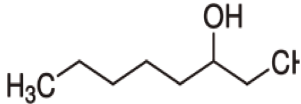
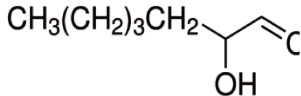
Compounds including β -caryophyllene (Table 1-R), acetaldehyde (Table 1-Q), 3-octanol (Table 1-S) and 1-octen-3-ol (Table 1-T) were previously described as natural, commercial aroma chemicals (SCHRADER, 2007). Acetaldehyde imparts sweetness and sourness (PLOTTO, MARGARÍA, GOODNER, *et al.*, 2004); whereas β -caryophyllene is perceived as terpene-like and spicy (QIAN e WANG, 2005). On the other hand, 1-octen-3-ol yields fungal (KAMINSKI, STAWICKI e WASOWICZ, 1974) odor. These substances were reported recently as volatile organic compounds produced by endophytic fungi (BÄCK, AALTONEN, HELLÉN, *et al.*, 2010; BANERJEE, STROBEL, BOOTH, *et al.*, 2010). Table 1 lists examples of compounds obtained from endophytic microorganisms.

An endophytic fungus identified as a rare species of *Phomopsis* (EC-4) was isolated from *Odontoglossum* sp. (Orchidaceae family), and an interesting peppery aroma resulted from a mixture of volatiles also obtained from the organism. Among the compounds in the mixture, sabinene (Fig. 1-F) was reported as the primary substance of interest (SINGH, STROBEL, KNIGHTON, *et al.*, 2011). According to the authors, sabinene had never before been obtained from fungi. Sabinene is a monoterpene hydrocarbon present in orange peel oil (NISPEROS-CARRIEDO e SHAW, 1990) and detected in appreciable amounts in mandarin juice (variety Hernandina) and to a lesser extent in the clementine (*Citrus reticulata blanco cv. Fina*) (PÉREZ, LUACES, OLIVA, *et al.*, 2005) and *Schinus molle* essential oil (DÍAZ, QUESADA, BRENES, *et al.*, 2008).

(BÄCK, AALTONEN *et al.*, 2010) measured the microbial volatile organic compound emission rate and spectra of eight fungi, two of which endophytic (*Meliniomyces variabilis*, *Phialocephala fortini*) occur in boreal forest soils. The results demonstrated that emissions contained 21 known and 6 unidentified compounds. Among the abundant compounds, authors identified short-chain carbonyl compounds, terpenoids, mono and sesquiterpenes. Main group-specific differences were related to oxygenated compound emissions: great quantities of acetaldehyde were detected from endophytes group, whereas decomposers and ectomycorrhiza produced acetone. Additionally, small amounts of sesquiterpene emissions were reported only by the endophytes group and one of the decomposers.

In another approach, terpenes can be considered as interesting starting material for the production of natural flavor compounds through biotransformation or bioconversion processes. Terpenes are unsaturated hydrocarbons derived from isoprene, which is widely occurring in nature (ROTTAVA, CORTINA *et al.*, 2010). Terpene hydrocarbons are often separated from essential oils due to their weak aromatic properties and chemical instability (KRINGS, HARDEBUSCH, ALBERT, *et al.*, 2006). Large quantities of monoterpenes, such as (R)-(+)-limonene (Fig. 1-H) and α -pinene (Fig. 1-C), are inexpensive and found worldwide as by-products

Table 01. Natural aroma compounds resulted by endophytes biotransformation.

Substance	Structure		Endophyte	Host Plants	References
Acetaldehyde		Q	<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Pinus Sylvestris</i>	Bäck et al. (2010)
Acetaldehyde			<i>Meliniomyces variabilis</i>	<i>Pinus Sylvestris</i>	Bäck et al. (2010)
β -Caryophyllene		R	<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Pinus Sylvestris</i>	Bäck et al. (2010)
3-Octanol		S	<i>Myrothecium inundatum</i>	<i>Acalypha indica</i>	Banerjee et al. (2010)
1-Octen-3-ol		T	<i>Meliniomyces variabilis</i>	<i>Pinus Sylvestris</i>	Bäck et al. (2010)

of citrus oil (MARÓSTICA JÚNIOR e PASTORE, 2007) and wood production (MOLINA, PIMENTEL, BERTUCCI, *et al.*, 2012), respectively.

Terpene oxygenated derivatives, usually classified as terpenoids, are important flavor compounds (ROTTAVA, CORTINA *et al.*, 2010) that have a major impact on the sensory profile of many foods and beverages (SCHEWE, PESCHECK, SELL, *et al.*, 2006). The increasing number of studies on terpenoids extracted from endophytic fungi in recent years reflects a growing interest in the scientific community (SOUZA, VIEIRA, RODRIGUES-FILHO, *et al.*, 2011).

Recently, five fungal endophyte strains isolated from Baru fruits (*Dipteryx alata*) were evaluated for their biotechnological potential using α -pinene as a substrate. Three strains presented the ability to biotransform α -pinene into verbenol (Fig. 1-I), suggesting that the previously reported biochemical reaction of hydroxylation was involved. The maximum output of the biotransformation was 80 mg/L after 72 h of incubation at 30 °C (MOLINA, PIMENTEL *et al.*, 2012). Verbenol is a secondary allylic alcohol that has camphor and mint-like flavor properties (SCHRADER e BERGER, 2008; ROTTAVA, CORTINA *et al.*, 2010). The enzymatic conversion of α -pinene to verbenol by the edible basidiomycete, *Pleurotus sapidus* has been published previously (KRINGS, LEHNERT, FRAATZ, *et al.*, 2009). The same oxidation capability exhibited by *P. sapidus* was also detected in 31 different microbial strains during another study. Among those microorganisms, a yeast obtained from industrial orange juice residue resulted in the highest verbenol concentration, generating 125.6 mg/L (ROTTAVA, CORTINA *et al.*, 2010). However, it was one of the first reports of verbenol being obtained from endophytes (MOLINA, PIMENTEL *et al.*, 2012).

3.2. Recent studies from different fields involving endophytes

Caffeine (Fig. 1-J), a purine alkaloid, is a key component found in popular beverages such as tea and coffee (GOKULAKRISHNAN, CHANDRARAJ e GUMMADI, 2007). It is known for its physiological role as a stimulant (ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012). However, sensitive individuals can experience undesirable affects as a consequence of these properties, including palpitations, insomnia and increased blood

pressure (VINOD e SURYAKUMAR, 2004). An increasing demand for decaffeinated beverages has led scientists to explore biodecaffeination by endophytic bacterial flora obtained from *Coffee arabica* L. Maximum caffeine degradation rates were achieved at pH values between 8 and 8.5 with agitation set to 180 rpm, and the article reported a significant decaffeination of 98.61% (BAKER, SAHANA, RAKSHITH, *et al.*, 2012). Though traditional decaffeination methods such as solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction are available (DIXON e JOHNSTON, 2000), these methods generally result in poor quality beverages due to low caffeine specificity (BAKER, SAHANA *et al.*, 2012) .

Furthermore, the interaction between plant-endophytes has been exploited for the remediation of contaminated soils and water. It is believed that endophytes have considerable biotechnological potential to improve the applicability and efficiency of phytoremediation processes. For organic contaminants, the degradation pathways and metabolic capabilities of endophytes can benefit the reduction of volatile contaminants, while the phytoremediation of toxic metals, the metal-resistance of these microorganisms can lower metal phytotoxicity and improve metal translocation to the above ground plant parts (WEYENS, VAN DER LELIE, TAGHAVI, *et al.*, 2009).

Also, biofuel, mycofumigation and biocontrol have been discussed as potential applications for fungal volatile organic compounds (MORATH, HUNG *et al.*, 2012). Recently, the endophytic fungus *Gliocladium roseum* was found to have the ability to produce diverse hydrocarbon compounds normally associated with diesel fuel. Consequently, these volatiles have been dubbed 'myco-diesel' (STROBEL, KNIGHTON, KLUCK, *et al.*, 2008). *Hypoxyton* sp., an endophyte of *Persea indica*, has been described as a VOC producer and a potential source of compounds with applications as fuels or fuel additives and is the first recorded endophytic fungus to produce the octane derivative and monoterpene 1,8-cineole (TOMSHECK, STROBEL, BOOTH, *et al.*, 2010). 1,8-Cineole (Fig. 1-L) is useful as an additive in ethanol-gasoline fuel blends that are used to prevent phase separation; previous publications have also ascribed anti-inflammatory properties to the compound (BERGER, 2009).

Volatile-producing endophytes (VPEs) have been purported as potential sources of new fumigants. The term mycofumigation has been used to describe volatile

antibiotics produced by fungi for the control of pathogens. The antibiotic properties of VPE bioactive compounds are attractive for their broad-spectrum and long-acting anti-pathogenic activity (ZHI-LIN, YI-CUN *et al.*, 2012). Among these microbes, the genus *Muscodor* is considered one of the best studied antibiotic VPE groups, and recently, a novel species called *Muscodor sutura* was introduced and reported to be the first member of this group to produce the volatile compounds thujopsene (Fig.1-M) and isocaryophyllene (Fig. 1-N) (KUDALKAR, STROBEL, RIYAZ-UL-HASSAN, *et al.*, 2012). Recently, VOCs from *Muscodor crispans* have shown effective action against a wide range of microbes, including *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, recognized as a serious bacterial pathogen of citrus. Furthermore, human pathogens such as *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus* have been killed by this fungus volatiles (DESHMUKH e VEREKAR, 2012).

In 2012, scientists reported eleven new compounds isolated from *Pseudomonas brassicacearum*, an endophytic bacterium of the herbal plant *Salvia miltiorrhiza*, which is often used in Chinese medicine. Their findings suggested a likely defense role from endophytic bacteria through cyclodipeptides and presented possible benefits to the host plant (LI, TANG, DUAN, *et al.*, 2012).

With the aim of reducing the cost of producing natural bioactive products from endophytic fungi, four different agro-industrial solid wastes were presented as possible alternative culture mediums for the strain, *Alternaria alternate*. Sugarcane bagasse, corn-bran, wheat- bran and fenugreek straw were tested as nutritional stress agents to induce fungal secondary metabolites. Compounds isolated and identified as alternariol (Fig. 1-O), alternariol methyl ether, and tenuazonic acid showed cytotoxicity against the mouse lymphoma cancer cell line L5178Y. Strong antibacterial activity from tenuazonic acid against *Pseudomonas aeruginosa* was also described (ASHOUR, YEHA e PROKSCH, 2011).

4. Benefits from genetic engineering and challenges to industry development

There is enormous potential for breakthroughs in aroma biotechnology through the implementation of new genetic engineering tools. Research on flavor coding genes

has enabled the creation of genome databases for key species in the flavor industry (BERGER, 2009). When key genes and enzymes involved in VOC pathways are determined, greater amounts of pleasant flavor compounds will be possible through the genetic manipulation of VPEs (EZRA, SKOVORODNIKOVA, KROITOR-KEREN, *et al.*, 2009).

Despite this great potential, there is little information and data from genetic engineering to provide the necessary support for the development of these areas. One of the works that represent this great challenge and potential showed the only profiled fungal endophyte genome currently available and its complexity. Using transcriptomic and metabolomic data, (GIANOULIS, GRIFFIN, SPAKOWICZ, *et al.*, 2012) realized the genomic characterization of *Ascocoryne sarcoides* and the genes involved in cellulose degradation to provide hypotheses for the biofuel production pathways, due to the capability of this fungal endophyte to produce potential-biofuel metabolites. Authors found that the classes of genes most frequently involved in secondary metabolite production were polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and almost 80 biosynthetic clusters were identified, including several previously found only in plants. When they evaluated the correlation between VOC production with gene expression aiming to elucidate biosynthetic pathways, interestingly, from among the 60 genes with homology to putative alcohol dehydrogenases, only three played a key role in the production of the medium-chain alcohol metabolites (such as 3-methyl butanol, 3-methyl-3-buten-1-ol, and 2-methyl-1-propanol). This breakthrough can contribute to the understanding of complex metabolic pathways of these microorganisms and their secondary metabolites production.

Moreover, known for exhibiting antioxidant, flavor-enhancing and bitterness-masking properties, vanillin is recognized as the world's first flavor chemical (BERGER, KRINGS *et al.*, 2010). A recently developed mutant identified as *Rhodococcus opacus* was reported to possess the ability to convert eugenol to ferulic acid, which made available the possibility for alternative substrate options during the production of "Biotech vanillin" (BERGER, 2009). This flavor substance is currently produced by vanillin-tolerant strains of *Pseudomonas* using the substrate ferulic acid (HAVKIN-FRENKEL e BELANGER, 2008; BERGER, 2009).

Though many developments in biotechnology have been made in recent years, future efforts should be focused on the development of methods or formulations that achieve the greatest efficacy and cost-efficiency (ZHI-LIN, YI-CUN *et al.*, 2012). Challenges concerning the production of natural aroma compounds include the following:

- Engineering factors during bioreactor design, such as improved mass and energy transfer and improvements to product recovery (BERGER, KRINGS *et al.*, 2010) to reduce the proportion of flavor compound lost through the waste stream (BERGER, 2009).

- Bioflavors are often obtained through substrates that are chemically unstable and poorly water soluble (BERGER, 2009).

- Possible cytotoxic effects of both precursors and products and low transformation rates (KRINGS e BERGER, 1998).

5. Conclusion

Biotechnology is considered an essential, environmentally friendly option for the discovery and production of volatile compounds of interest. Recent studies have reported endophytes as being powerful organisms capable of producing bioactive metabolites through complex biosynthetic pathways.

Volatile-producing endophytes (VPEs) have been a remarkable niche of microorganisms able to produce substances suitable for applications in medicine, industry and agriculture. In this paper, pleasant odor compounds such as methyl eugenol, verbenol and sabinene, already produced by endophytes, were described as attractive alternatives in aroma biotechnology.

Considering the great diversity of ecosystems worldwide within which endophytes can be hosted and that only recently have these plant-associated microbes been prospected as metabolite producers, there are likely a vast number of potential substances remaining to be exploited.

Interdisciplinary improvements in biotechnological processes and biocatalysts could provide new, more cost-effective flavor compounds. Applying bioengineering tools

aimed at developing high-yielding biocatalysts and designing improved bioreactors would enhance volatile compound concentrations. Furthermore, vegetable wastes have been given consideration as affordable substrate alternatives, thereby improving cost-effectiveness.

6. Acknowledgments

The authors acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for the support.

REFERENCES

- ASHOUR, M.; YEHA, H. M.; PROKSCH, P. Utilization of Agro-industrial by-products for production of bioactive natural products from endophytic fungi **Journal of Natural Products**, v.4, p.108-114 2011.
- BÄCK, J.; AALTONEN, H.; HELLÉN, H., *et al.* Variable emissions of microbial volatile organic compounds (MVOCs) from root-associated fungi isolated from Scots pine. **Atmospheric Environment**, v.44, n. 30, p.3651-3659 2010.
- BAKER, S.; SAHANA, S.; RAKSHITH, D., *et al.* Biodecaffeination by endophytic *Pseudomonas* sp. isolated from *Coffea arabica* L. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n. 7, p.3654-3657 2012.
- BANERJEE, D.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E., *et al.* An endophytic *Myrothecium inundatum* producing volatile organic compounds. **Mycosphere** v.1, n. 3, p.229-240 2010.
- BERGER, R. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnology Letters**, v.31, n. 11, p.1651-1659 2009.
- BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Biotechnological Flavour Generation. In: (Ed.). **Food Flavour Technology**: Wiley-Blackwell, 2010. Biotechnological Flavour Generation, p.89-126.
- BERGER, R. G.; SCHEPER, T.; SCHÜGERL, K. Scale-up of natural product formation and isolation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, n. 8, p.732-743 2005.
- BORGES, K. B.; BORGES, W. D. S.; PUPO, M. T., *et al.* Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, n. 5, p.945-952 2008.
- BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S., *et al.* Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v.13, n. 12, p.1137-1163 2009.

CARRAU, F.; MEDINA, K.; FARIÑA, L., *et al.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. **International Journal of Food Microbiology**,, v.143, n. 1-2, p.81-85 ,2010.

CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; BOIDO, E., *et al.* *De novo* synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n. 1, p.107-115 2005.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v.24, n. 2, p.134-142 2006.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A. Fungal endophytes: A potential source of antifungal compounds. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, n. 4, p.2045-2070 2012.

DÍAZ, C.; QUESADA, S.; BRENES, O., *et al.* Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. **Natural Product Research**, v.22, n. 17, p.1521-1534 2008.

DIXON, D. J.; JOHNSTON, K. P. Supercritical Fluids. In: (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**: John Wiley & Sons, Inc., 2000. Supercritical Fluids.

DUBAL, S. A.; TILKARI, Y.; MOMIN, S. A., *et al.* Biotechnological routes in flavour industries. **Advance Biotech.**, v.3, n. 20-31 2008.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v.46, n. 2, p.488-495 2012.

EZRA, D.; SKOVORODNIKOVA, J.; KROITOR-KEREN, T., *et al.* Development of methods for detection and Agrobacterium-mediated transformation of the sterile, endophytic fungus *Muscodor albus*. **Biocontrol Science and Technology**, v.20, n. 1, 2010/01/01, p.83-97 2009.

FERON, G.; WACHÉ, Y. **Microbial Biotechnology of Food Flavor Production**. Boc Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology.

GARCÍA-FAJARDO, J.; MARTÍNEZ-SOSA, M.; ESTARRÓN-ESPINOSA, M., *et al.* Comparative Study of the Oil and Supercritical CO₂ Extract of Mexican Pimento (*Pimenta dioica* Merrill). **Journal of Essential Oil Research**, v.9, n. 2, 1997/03/01, p.181-185 1997.

GIANOULIS, T. A.; GRIFFIN, M. A.; SPAKOWICZ, D. J., *et al.* Genomic analysis of the hydrocarbon-producing, cellulolytic, endophytic fungus *Ascocoryne sarcoides*. **PLoS Genetics**, v.8, n. 3 p.e1002558 2012.

GOKULAKRISHNAN, S.; CHANDRARAJ, K.; GUMMADI, S. N. A preliminary study of caffeine degradation by *Pseudomonas* sp. GSC 1182. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n. 3, p.346-350 2007.

GUENTHER, A.; HEWITT, C. N.; ERICKSON, D., *et al.* A global model of natural volatile organic compound emissions. **J. Geophys. Res.**, v.100, n. D5, p.8873-8892 1995.

HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. C. **Biotechnological production of Vanillin**, Blackwell Publishing Ltd, v.83-103 2008. *Biotechnology in Flavor Production*.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOYANOVA, A., *et al.* Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of *Rosa damascena* L. from China. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, n. 1, p.7-12 2005.

JOPPEN, L. Taking out the chemistry. **Food Engineering & Ingredients** v.31, n. 2, p.38-89, 41 2006.

JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology** v.1 n. 3, p.291-309 2011.

KAMINSKI, E.; STAWICKI, S.; WASOWICZ, E. Volatile Flavor Compounds Produced by Molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. **Applied Microbiology**, v.27, n. 6, June 1, 1974, p.1001-1004 1974.

KAUL, S.; WANI, M.; DHAR, K. L., *et al.* Production and GC-MS trace analysis of methyl eugenol from endophytic isolate of *Alternaria* from Rose. **Annals of Microbiology**, v.58, n. 3, p.443-445 2008.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, n. 1, p.1-8 1998.

KRINGS, U.; BRAUER, B.; KASPERA, R., *et al.* Biotransformation of α -terpinene using *Stemphylium botryosum* (Wallroth) yields p -mentha-1,4-dien-9-ol, a novel odorous monoterpenol. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.23, n. 6, p.457-463 2005.

KRINGS, U.; HARDEBUSCH, B.; ALBERT, D., *et al.* Odor-Active Alcohols from the Fungal Transformation of α -Farnesene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n. 24, 2006/11/01, p.9079-9084 2006.

KRINGS, U.; LEHNERT, N.; FRAATZ, M. A., *et al.* Autoxidation versus Biotransformation of α -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of α -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n. 21, 2009/11/11, p.9944-9950 2009.

KUDALKAR, P.; STROBEL, G.; RIYAZ-UL-HASSAN, S., *et al.* *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. **Mycoscience**, v.53, n. 4, p.319-325 2012.

LI, X.-J.; TANG, H.-Y.; DUAN, J.-L., *et al.* Bioactive alkaloids produced by *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *Neaurantiaca*, an endophytic bacterium from *Salvia miltiorrhiza*. **Natural Product Research**, p.1-4 2012.

MACÍAS-RUBALCAVA, M.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.; OROPEZA, F., *et al.* Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*; a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, n. 10, p.1122-1131 2010.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v.30, p.382-387 2007.

MOLINA, G.; PIMENTEL, M. R.; BERTUCCI, T. C. P., *et al.* Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, v.27, p.289-294 2012.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v.26, n. 2-3, p.73-83 2012.

NISPEROS-CARRIEDO, M. O.; SHAW, P. E. Comparison of volatile flavor components in fresh and processed orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n. 4, 1990/04/01, p.1048-1052 1990.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W., *et al.* Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, n. 1, p.170-179 2012.

PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration. **Journal of Hazardous Materials**, v.131, n. 1–3, p.179-186 2006.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. The Complexity of Factors Driving Volatile Organic Compound Emissions by Plants. **Biologia Plantarum**, v.44, n. 4, p.481-487 2001.

PÉREZ, A. G.; LUACES, P.; OLIVA, J., *et al.* Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. **Food Chemistry**, v.91, n. 1, p.19-24 2005.

PESCHECK, M.; MIRATA, M.; BRAUER, B., *et al.* Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium sp.* by use of a closed gas loop bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, n. 6, p.827-836 2009.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONISIO, A. P., *et al.* The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. **Biotechnology Research International**, v.2011, p.1-11 2011.

PLOTTO, A.; MARGARÍA, C. A.; GOODNER, K. L., *et al.* Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: terpenes and aldehydes. **Flavor and Fragrance Journal**, v.19, p.491-498 2004.

QIAN, M. C.; WANG, Y. Seasonal Variation of Volatile Composition and Odor Activity Value of 'Marion'(Rubus spp. hyb) and 'Thornless Evergreen'(R. laciniatus L.) Blackberries. **Journal of Food Science**, v.70, n. 1, p.C13-C20 2005.

RODRÍGUEZ, P.; REYES, B.; BARTON, M., *et al.* Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic bacteria and yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.71, n. 3–4, p.90-94 2011.

ROTTAVA, I.; CORTINA, P.; ZANELLA, C., *et al.* Microbial Oxidation of (-)- α -pinene to Verbenol Production by Newly Isolated Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, n. 8, p.2221-2231 2010.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (Coffea arabica) **Microbial Ecology**, v.50, n. 1, p.1-8 2005.

SCHEWE, H.; PESCHECK, M.; SELL, D., *et al.* **Biotechnological production of terpenoid flavour and fragrance compounds in tailored bioprocesses**, Elsevier, v.Volume 43 2006. 45-48 p. Developments in Food Science.

SCHRADER, J. **Microbial flavour production**, Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

SCHRADER, J.; BERGER, R. G. **Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds**, Wiley - VCH, v.10 2008. Biotechnology: Special processes.

SINGH, S.; STROBEL, G.; KNIGHTON, B., *et al.* An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. **Microbial Ecology**, v.61, n. 4, p.729-739 2011.

SOUZA, J. J. D.; VIEIRA, I. J. C.; RODRIGUES-FILHO, E., *et al.* Terpenoids from Endophytic Fungi. **Molecules**, v.16, n. 12, p.10604-10618 2011.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p.491-502 2003.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, n. 6, p.535-544 2003.

STROBEL, G. A.; KNIGHTON, B.; KLUCK, K., *et al.* The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v.154, n. 11, November 1, 2008, p.3319-3328 2008.

SURESH, B.; RITU, T.; RAVISHANKAR, G. A. **Biostranformations as Applicable to Food Industries**. Boc Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology

TOMSHECK, A. R.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E., *et al.* *Hypoxyton* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. **Microb Ecol.** 2010 **Nov;60(4):903-1**, v.60, n. 4, p.903-914 2010.

VANI S. R., C., S. F., CHUAH, C. H. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. **American Journal of Applied Sciences**, v.6, n. 3, p.523-528 2009.

VERGINER, M.; SIEGMUND, B.; CARDINALE, M., *et al.* Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **FEMS Microbiology Ecology**, v.74, n. 1, p.136-145 2010.

VINOD, K. K.; SURYAKUMAR, M. Breeding for quality improvement in plantation crops **Proceedings of the training programme on "Plant Breeding Approaches for Quality improvement of crops"** n. 53, p.535-547 2004.

WANG, Y.; DAI, C.-C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v.61, n. 2, p.207-215 2011.

WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S., *et al.* Phytoremediation: Plant–endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n. 2, p.248-254 2009.

ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. **Spanish Journal of Agricultural Research** v.6, n. Special issue, p.138-146 2008.

ZHI-LIN, Y.; YI-CUN, C.; BAI-GE, X., *et al.* Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, n. 4, 2012/12/01, p.363-373 2012.

CAPÍTULO 2

BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FRUTAS TROPICAIS

RESUMO

A biotecnologia tem sido bastante útil no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. A associação de micro-organismos e suas diversificadas rotas metabólicas a produções industriais tem sido apresentada como uma alternativa a processos tradicionais. Nesse sentido, a seleção de biocatalisadores promissores para aplicações biotecnológicas é uma necessidade. Nesse trabalho, cinquenta e um fungos endofíticos foram obtidos por isolamento das frutas: caju (*Anacardium occidentale* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.) e camu-camu (*Myrciaria dubia*). Do total de fungos, três apresentaram potencial biotransformador para terpenos. O fungo L.B.-M.Z.-3. foi capaz de utilizar limoneno como fonte única de carbono, com rendimento médio máximo de 17,4 mg.L⁻¹ após 96 h de contato com o substrato. Os fungos capazes de metabolizar α -pineno apresentaram rendimentos melhores, produzindo verbenona. O fungo L.B.-M.D.-1 teve produção máxima de 101,1 mg.L⁻¹ após 144 h de experimento, enquanto o fungo endofítico L.B.-M.D.-4 revelou-se o mais promissor, alcançando 192,5 mg.L⁻¹ após 288 h. Este último fungo foi testado também para biotransformação de α -pineno em água sem indução enzimática e em meio mineral com indução enzimática, mas o procedimento tradicional revelou-se mais produtivo. Houve ainda, um teste de variação de biomassa do fungo L.B.-M.D.-4 em função de concentrações crescentes de α -pineno, em que a linhagem apresentou sensibilidade ao terpeno. Os três fungos de resultado positivo foram observados em microscópio óptico para observação das respectivas morfologias.

Palavras-chave: verbenona, endofíticos, álcool perílico, biotransformação, fungos

1. Introdução

A limitada disponibilidade de recursos no planeta tem influenciado a Comissão Europeia a estimular o desenvolvimento da biotecnologia branca, que está relacionada a processos sustentáveis de notável compatibilidade ecológica, que sejam possíveis por catalisadores biológicos, fontes renováveis, e por pouca demanda de água e energia e ainda, minimizem a geração de resíduos e utilização de solventes tóxicos comparados a processos tradicionais (BERGER, 2007).

Paralelamente à necessidade de desenvolvimento de processos sustentáveis, os consumidores estão cada vez mais exigentes, e o conceito de qualidade relacionada a produtos é cada vez mais complexo, sendo a associação do termo “saudável” muito valorizada. Fatores sensoriais, conveniência e detalhes de processo como produção natural, cultivo orgânico, bem-estar animal, e a não utilização de organismos geneticamente modificados contribuem para a avaliação final de consumidores sobre o produto (GRUNERT, 2007).

Dessa forma, as indústrias têm se posicionado a favor de tais tendências, até mesmo para aromas naturais, para melhor atender os consumidores e suas demandas, inclusive para o desenvolvimento de processos sustentáveis.

A produção microbiana de aromas é uma das áreas emergentes de mais destaque na biotecnologia industrial (BERGER, 2007). Compostos de interesse industrial têm sido obtidos pela biotransformação de terpenos: carvona e α -terpineol a partir do limoneno, óxido de linalol a partir de linalol, óxido de rosas a partir de citronelol (MOLINA, PINHEIRO, PIMENTEL, *et al.*, 2013). Outro exemplo seria a produção de furfuriltiol, composto-chave de aromas de café e carne assada, a partir da *Enterobacter cloacae* (SCHAFT, GEEL, JONG, *et al.*, 1994).

Compostos de aromas podem ser obtidos biotecnologicamente pela biotransformação ou bioconversão de precursores a produtos sensorialmente interessantes, ou ainda, pela síntese *de novo* (AGRAWAL, 2004). Esta síntese ocorre a partir de substratos simples na formulação do meio de cultura, como glicose, ou outras fontes de carbono, diferentemente da biotransformação, em

que acontece modificação sobre precursores específicos adicionados externamente (SCHRADER, 2007).

A obtenção de terpenóides por síntese *de novo* utilizando micro-organismos e fungos superiores tem sido estudada, entretanto, esta técnica apresenta rendimentos muito baixos (limites de 100mg/L), inviabilizando, assim, a aplicação comercial deste mecanismo biossintético para a produção de aromas (SCHRADER, 2007). De maneira geral, o rendimento padrão de um processo economicamente interessante seria a partir de 1 g.L⁻¹, e muitas melhorias ainda são necessárias para aplicação de sistemas biocatalíticos em escala industrial (BERGER, KRINGS e ZORN, 2010).

As concentrações de aromas obtidas por bioconversão são geralmente superiores às relacionadas à síntese *de novo*, possibilitando a viabilidade para aplicação industrial (FERON e WACHÉ, 2006). Nesse sentido, processos de bioconversão têm sido mais atraentes para biotecnologistas no que se refere à viabilidade econômica (FERON e WACHÉ, 2006).

É notável o interesse das indústrias para obtenção de terpenóides pela biotransformação de monoterpenos como R-(+)-limoneno e α -pineno, compostos de baixo custo e alta disponibilidade na natureza (SURESH, RITU e RAVISHANKAR, 2006). Tais terpenos representam substratos ideais, uma vez que estão amplamente distribuídos na natureza por serem os principais componentes dos óleos de frutas cítricas e terebintina, respectivamente (SCHRADER, 2007). No caso deste último, por exemplo, até 1997, cerca de 100.000 toneladas das 250 a 300.000 totais produzidas de terebintina já eram utilizadas para a produção de terpenóides por indústrias de fragrâncias (BOELEN, 1997).

A obtenção de compostos de aroma por micro-organismos ou suas enzimas isoladas a partir de moléculas precursoras tem progredido, e os processos de bioconversão e biotransformação têm sido consolidados como boas alternativas para a síntese de químicos puros (ARCHER, CONNERTON e MACKENZIE, 2008).

A seguir, são discutidas as principais vias metabólicas e compostos produzidos em processos biotecnológicos a partir de terpenos. As rotas envolvidas na biotransformação de limoneno são apresentadas na Figura 01, com os possíveis derivados.

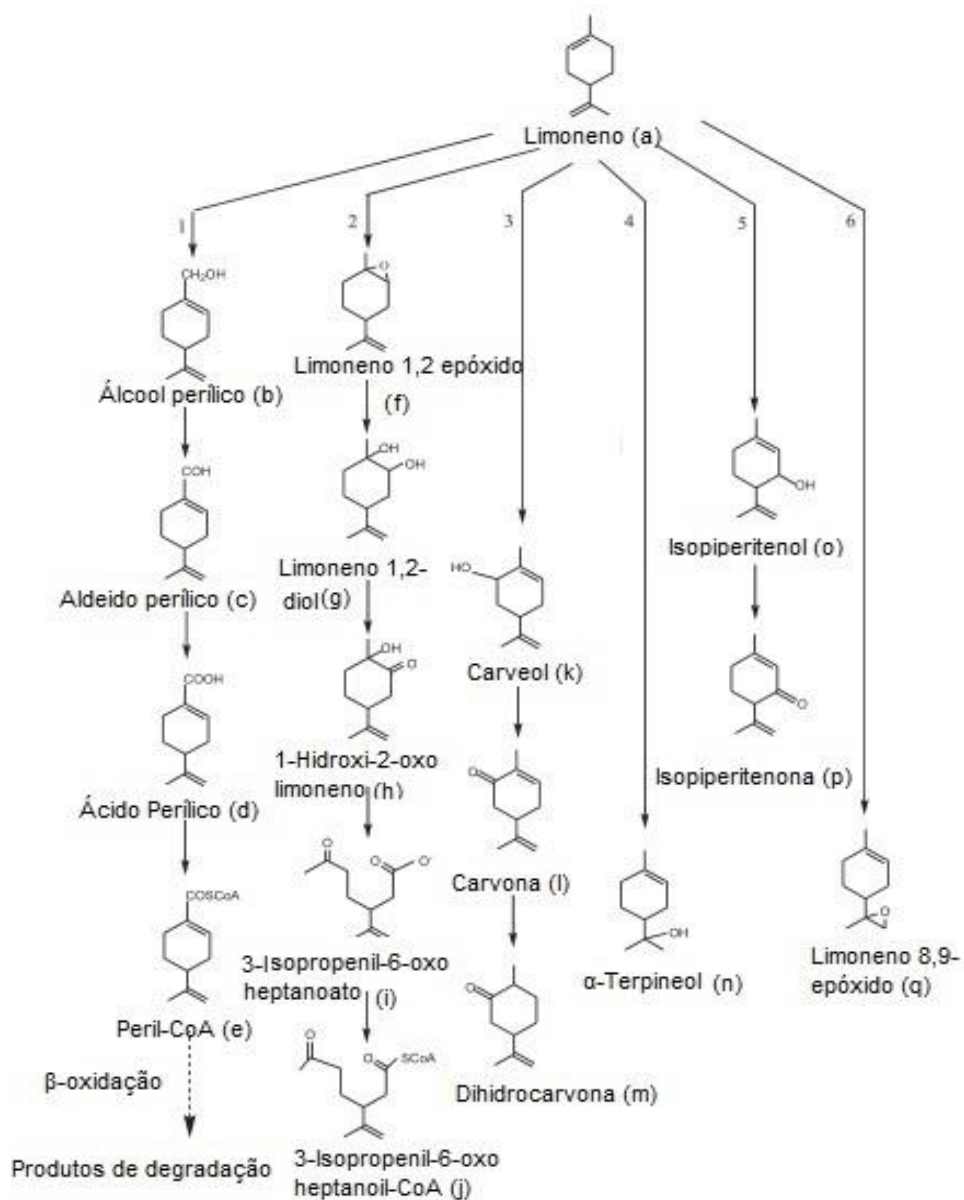


Figura 01. Limoneno e principais rotas de biotransformação (figura adaptada) (MARÓSTICA JÚNIOR e PASTORE, 2007)]

A partir do limoneno como substrato, podem ser obtidos derivados oxigenados muito. Entre os produtos destacam-se o α -terpineol (Figura 01(n)), álcool perílico (Figura 01(b)), carveol (Figura 01(k)), carvona (Figura 01(l)) (DUETZ, BOUWMEESTER, BEILEN, *et al.*, 2003). Como mencionado anteriormente, os enantiômeros de carvona apresentam aplicações como aromatizantes em bebidas e alimentos. A produção de S-(-)-Carvona demanda maior escala e tem grande aplicação em produtos de higiene bucal (SURBURG e PANTEM, 2006).

A biotransformação de monoterpenos é favorecida em relação a sesquiterpenos, e diferentes mecanismos têm sido descritos: oxidação de alcoóis a compostos carbonila, clivagem de ligações carbono-carbono, hidroxilação de posições alílicas, oxigenação de duplas ligações (BUSMANN e BERGER, 1994). Enzimas microbianas como hidrolases e óxido-redutases têm sido citadas como importantes no mecanismo de biotransformação de monoterpenos, em que muitos produtos de interesse podem ser obtidos (SURESH, RITU *et al.*, 2006). α -Terpineol é muito estável, além de um dos compostos de odor mais utilizados, principalmente em cosméticos e sabonetes (SURBURG e PANTEM, 2006). Produtos de biotransformação como álcool perílico, aldeído perílico e ácido perílico estão presentes em vários óleos essenciais de aplicação em indústrias farmacêuticas (SURESH, RITU *et al.*, 2006).

Muitos produtos podem ser obtidos a partir da biotransformação do α -pineno, como indica a Figura 02. Verbenona (Figura 02(i)), aroma de impacto do óleo de alecrim; borneol, (Figura 02(b)) muito utilizado em aromas de frutas; isonovalal (Figura 02(g)), com potencial aplicação em formulações de perfumes e odor cítrico; verbenol (Figura 02(j)), composto valorizado de aroma fresco (SCHRADER, 2007), entre outros.

Outro exemplo é o isômero (-)- α da thujona (Figura 02(a)), por sua vez, está presente no óleo de absinto (*Artemisia absinthum*), e o principal composto bioativo do licor de absinto (HUMPHREY e BEALE, 2006). A thujona está presente nos óleos de cedros como o *Thuja occidentalis* em cerca de 50%, e

também compõe 25 a 30% do óleo de sálvia (*Salvia officinalis*) (MOTHERWELL, 2003).

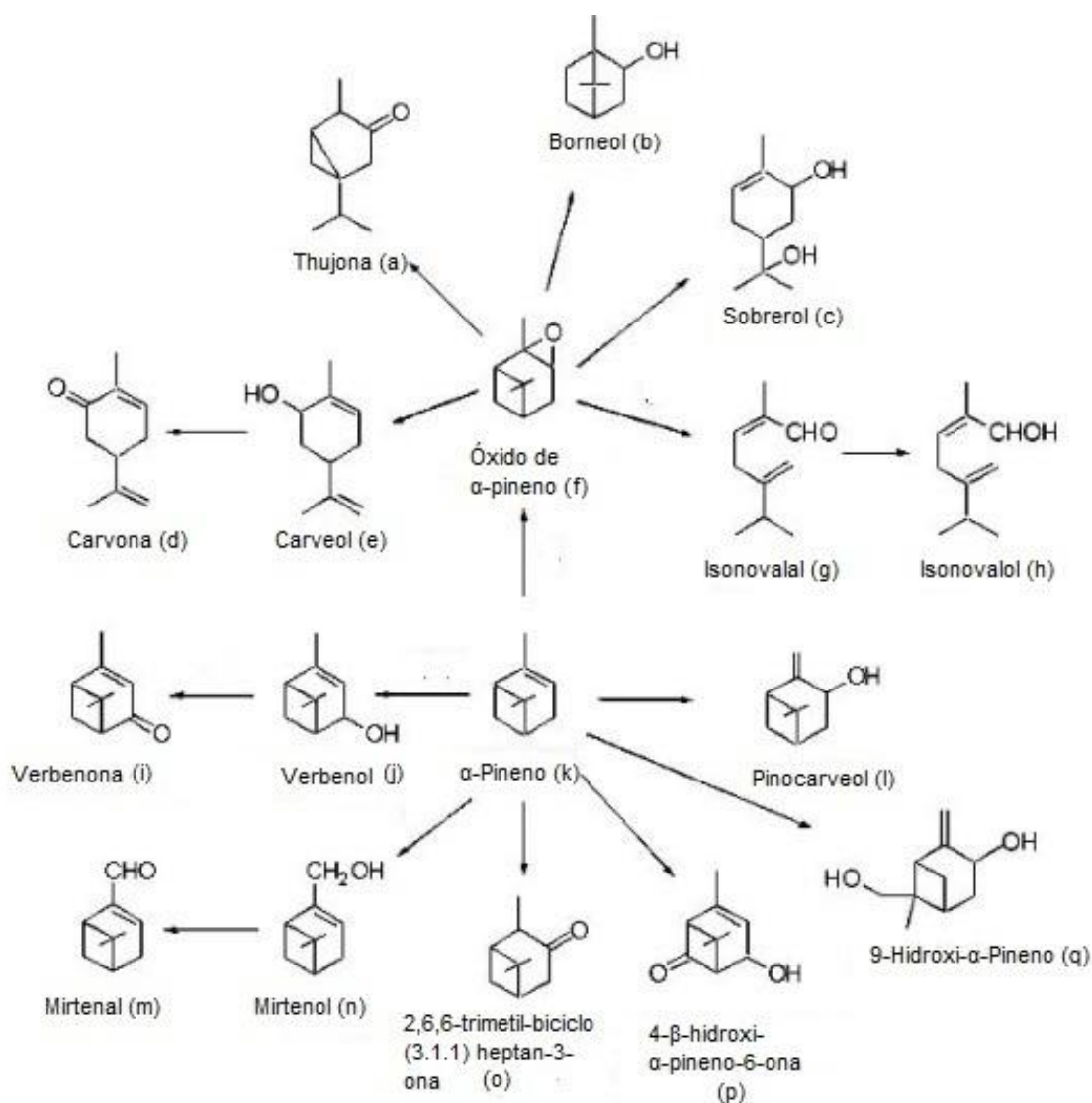


Figura 02. Rotas de biotransformação de α -pineno (adaptada) (SCHRADER, 2007).

Fungos superiores demonstraram capacidade de biotransformação para diferentes tipos de pinenos. Basidiomicetos demonstraram capacidade de biotransformar α -pineno, gerando verbenona e verbenol pela oxidação da posição alílica, destacando-se os gêneros *Pholiota squarrosa*, *Marasmius alliaceus* e *Kuehneromyces mutabilis* (BUSMANN e BERGER, 1994). Também foram obtidos

carvona a partir de limoneno, mircenol a partir de mirceno, mirtenol e mirtenal a partir de β -pineno (BUSMANN e BERGER, 1994).

Os objetivos deste trabalho foram o isolamento de fungos endofíticos das frutas caju (*Anacardium occidentale* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.) e camu-camu (*Myrciaria dubia*), e a subsequente seleção de fungos biotransformadores de limoneno e α -pineno.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As frutas caju (*Anacardium occidentale* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.), sapoti (*Manilkara zapota* L.) foram adquiridas no Mercado Municipal da cidade de São Paulo. As frutas de camu-camu (*Myrciaria dubia*) foram cedidas por um colecionador da região de Governador Valadares, localizada em Minas Gerais.

Os terpenos utilizados como substratos foram (R)-(+)-Limoneno $\geq 93\%$ e (1S)-(-)- α -Pineno $98\geq\%$, ambos fabricados pela Sigma-Aldrich. Para a extração dos compostos de biotransformação, foi utilizado acetato de etila P.A. (marca Synth).

Os padrões utilizados para confirmação dos produtos foram também da empresa Sigma-Aldrich: (S)-(-)-Alcool Perfílico $\geq 96\%$, e ainda, (1S)-(-)- Verbenona $\geq 93\%$.

2.2. Metodologia de isolamento de micro-organismos endofíticos

2.2.1. Jenipapo, Caju, Sapoti

As frutas selecionadas para isolamento dos fungos endofíticos foram lavadas em água corrente, sanitizadas em álcool 70% por 30 s e hipoclorito de sódio 1,5% por 4 min. Em seguida foram transferidas para a capela de fluxo

laminar, onde foram lavadas com água destilada estéril e finalmente secas em papel filtro estéril sob a presença de luz ultra-violeta por 15 min. Este procedimento foi adaptado de um trabalho anterior (SILVA, LUZ, SILVEIRA, *et al.*, 2006). Após o processo de desinfecção, fragmentos das frutas foram transferidos para placas de Petri contendo um dos seguintes meios:

- Meio PDA (meio potato-dextrose-ágar) Potato Dextrose agar (HIMEDIA) 39 g.L⁻¹.
- Meio YM (yeast and malt medium): glicose (10 g.L⁻¹), extrato de malte (3 g.L⁻¹), extrato de leveduras (3 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), acrescido de (ágar 20 g.L⁻¹).

2.2.2. Camu-camu

Após lavagem em água corrente, as frutas passaram por procedimento de sanitização em solução P.A de Formaldeído (36,5 a 38%), seguindo para lavagem em água estéril (3 recipientes diferentes em sequência), e submetidos à luz ultra-violeta em capela de fluxo laminar por 15 min. A metodologia de sanitização de superfície para obtenção de fungos endofíticos foi adaptada de um trabalho comparativo entre métodos de sanitização para estudo de endofíticos (SCHULZ, WANKE, DRAEGER, *et al.*, 1993).

A seguir, fragmentos de casca, polpa e sementes das frutas foram transferidos em condições estéreis para placas de Petri contendo um dos seguintes meios:

- Meio Sabouraud (HIMEDIA) 30 g.L⁻¹, conforme orientações do fabricante.
- Meio PDA acidificado, conforme (TANIWAKI e DA SILVA, 1996) e orientações do fabricante (HIMEDIA) 39 g.L⁻¹.
- Meio PCA: de acordo com (TANIWAKI e DA SILVA, 1996).
- Meio YM (yeast and malt medium): glicose (10 g.L⁻¹), extrato de malte (3 g.L⁻¹), extrato de leveduras (3 g.L⁻¹) e peptona (5 g.L⁻¹), e ágar (20 g.L⁻¹).

2.3. Seleção de fungos biotransformadores de terpenos

2.3.1. Cultivo de fungos endofíticos para biotransformação

O crescimento dos fungos endofíticos em placas de Petri contendo o meio YM (com acréscimo de 20 g.L⁻¹ de Agar) foi padronizado por 72 h em estufa de cultura modelo 002 CB (FANEM, São Paulo, S.P, Brasil) a 30°C.

Após 72 h, um pedaço de 1 cm² do ágar foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio YM. As culturas foram homogeneizadas em condições estéreis por um Ultra-Turrax ®T18 (Ika, Wilmington, NC, Estados Unidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio YM líquido, e posteriormente foram incubados nas condições de 150 rpm, 30 °C, por 72 h em *shaker* modelo TE- 421 Technal (Piracicaba, S.P., Brasil).

Na etapa seguinte, a biomassa foi concentrada em condições estéreis por filtração a vácuo utilizando funil de Buchner com papel filtro Whatman nº1 e transferida para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral (composição: MgSO₄ (0,5g.L⁻¹), NaNO₃ (3 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (1 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹), Fe₂SO₄ (0,01g.L⁻¹)). A seguir, foi adicionado o terpeno em teste (0,5% v/v). Após a retirada de amostra para o tempo 0 h, os Erlenmeyers foram incubados em *shaker* nas mesmas condições de temperatura e rotação descritas no item anterior. O perfil de biotransformação foi acompanhado a cada 24 h por cromatografia gasosa até 96 h de processo. Para cada teste, foi preparada uma amostra controle ou branco, apenas com o terpeno em questão e o meio mineral, para detectar possíveis interferentes. O limoneno foi testado como fonte única de carbono para os fungos isolados do caju, jenipapo e sapoti, enquanto os fungos isolados do camu-camu foram testados para o α-pineno, em observação aos perfis voláteis das frutas utilizadas para o isolamento. Como veremos a seguir, o α-pineno está presente em quantidades consideráveis na fruta camu- camu, e foi o terpeno priorizado como substrato para esta fruta.

2.3.2. Análise por cromatografia gasosa (CG-DIC)

As amostras do meio de fermentação foram extraídas (500 µL) com o mesmo volume de acetato de etila, adicionado de 1% de decano, utilizado como padrão interno. A mistura resultante foi homogeneizada em vortex por 30 s, centrifugada por 20 s a temperatura ambiente e rotação de 6200 rpm. A fração do acetato de etila foi transferida para microtubo tipo Eppendorf contendo sulfato de sódio, para retirada de resíduos de água, novamente homogeneizada em vortex por 20 s, e novamente centrifugada por 20 s, nas mesmas condições de rotação e temperatura. Após este procedimento, 1 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo a gás Hewlett Packard – HP 6890 Series GC System G1530A (Palo Alto, CA - Estados Unidos), equipado com detector de ionização em chamas (DIC), em modo split 20:1, com a coluna capilar de fase reversa HP-5 (30 m comprimento × 0.25 mm diâmetro interno × 0.25 µm espessura do filme). O método cromatográfico utilizado foi programado com temperatura do forno foi iniciada a 80 °C por 2 minutos, aumentando a 20 °C.minuto⁻¹ até atingir 220 °C, e finalmente, mantida por 6 min. A temperatura do injetor e detector permaneceu a 250 °C.

Os resultados foram confirmados por Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Agilent Technologies 7890A/5975C (Santa Clara, CA, Estados Unidos). O equipamento empregado para esse estudo foi um cromatógrafo a gás HP-7890 acoplado a um espectrômetro de massas HP-5975C (CG/EM - Agilent Technologies) equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹. O injetor permaneceu a 250 °C, o detector foi mantido a uma temperatura de 250 °C na linha de transferência, energia de impacto de +70 eV e faixa de massas de 35-450 m.z⁻¹. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros com a biblioteca NIST2008, com similaridade superior a 90%, pelo seu índice de retenção, como também pela confirmação com os padrões comerciais. A programação da temperatura do forno foi a mesma citada anteriormente.

Os produtos formados foram quantificados por uma curva de calibração construída com diferentes concentrações do respectivo padrão comercial em acetato de etila, utilizando *n*-decano como padrão interno (1%). A curva padrão de álcool perílico foi obtida a partir de concentrações entre 6 e 20 mg.L⁻¹, com R²=0,9903. Para a verbenona, a curva padrão foi construída a partir de concentrações entre 20 e 300 mg.L⁻¹ de padrão, resultando em oito pontos e coeficiente de correlação R²=0,9984.

2.3.3. Biotransformação de terpenos por fungos selecionados

Todos os fungos que apresentaram potencial para biotransformação de terpenos foram submetidos em triplicatas ao procedimento tradicional de biotransformação, ou seja, em meio mineral como descrito nos itens 2.3.1, sendo as massas obtidas nas filtrações padronizadas para o valor de 2,93 g, e finalmente, submetidos à análise cromatográfica descrita na seção 2.3.2. O valor de 2,93 g foi um valor aleatório de pesagem de biomassas, adotado para padronização das mesmas em todos os experimentos das subseqüentes repetições, antes da adição do terpeno a ser testado.

No caso específico do fungo endófito L.B.-M.D.-4, que foi o de maior rendimento, foram feitos três testes de biotransformação no total, também conduzidos em triplicatas, com o objetivo de verificar influências de meios de biotransformação no rendimento de verbenona. Os testes são apresentados a seguir:

T1) Teste tradicional em meio mineral e sem indução enzimática.

T2) Teste com meio mineral como meio de cultura, utilizando indução enzimática.

T3) Teste em água como meio de biotransformação, sem indução enzimática.

O teste 1 consiste nos itens 2.3.1 e 2.3.2 anteriormente descritos. A diferença entre os testes 1 e 2 é apenas a substituição do meio mineral por água após a filtração da biomassa em funil de Buchner e padronização da massa (2,93

g), apresentados no item 2.3.1. Análise cromatográfica idêntica à descrita no item 2.3.2.

A indução enzimática foi parte do teste 3. As biomassas, que em outros testes foram transferidas para meio mineral ou água, foram neste teste transferidas para novos frascos Erlenmeyers contendo meio YM líquido sem glicose, acrescidos de 0,1% de α -pineno, e incubados a 150 rpm e 30 °C por 48 h, para que houvesse contato com o terpeno em teste antes da etapa formal de biotransformação. Na sequência, as biomassas foram finalmente transferidas para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio mineral, conforme metodologia empregada no teste 1. Após este período de biotransformação, todas as amostras foram analisadas por cromatografia, de acordo com o item 2.3.2.

Para análises estatísticas no teste de comparação entre meios para produção de verbenona, foi utilizado o software R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R: Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Os p-valores foram corrigidos para comparações múltiplas usando o método descrito (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). O mesmo software foi utilizado para o teste estatístico do próximo tópico, que relaciona o comportamento de biomassa a concentrações crescentes de α -pineno.

2.3.4. Resistência da biomassa a diferentes concentrações de terpenos

Este teste foi feito apenas com a linhagem de maior rendimento, ou seja, a L.B.-M.D-4, em triplicatas. O objetivo foi avaliar o comportamento do fungo em questão em contato com o α -pineno, verificando a variação das biomassas em contato com diferentes concentrações deste terpeno, o que seria um indicativo de inibição do crescimento por estes compostos. Após crescimento em placas com meio YM a 30°C por 72 h em estufa, 1 cm² do ágar foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio YM. As culturas foram homogeneizadas em condições estéreis por um Ultra-Turrax ®T18 e incubadas em shaker a 30°C e 150 rpm, por 72 h. As biomassas obtidas para cada concentração foram filtradas em condições estéreis em filtração a vácuo utilizando funil de Buchner com papel

filtro Whatman nº1 e assim, padronizadas para o valor de 2,93 g, em condições estéreis, para diminuir a variação de crescimento de massa. Tal variação já é bastante comum nos procedimentos experimentais. Na sequência, foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de novos meios YM líquidos, com diferentes concentrações de α -pineno (0%, 0,5%, 0,75%, 1,0%, 1,25%, 1,50%). Estes, por sua vez, foram incubados novamente em shaker nas mesmas condições anteriores de temperatura e rotação, por 72 h.

2.3.5. Procedimento de microcultivo

Os fungos endofíticos selecionados foram inoculados em placas de Petri estéreis, utilizando meio YM para crescimento em estufa a 30 °C, e acompanhados diariamente ao longo de 72 h. As lâminas resultantes foram tratadas com o contra-corante lactofenol para observação no microscópio óptico Nikon Eclipse 50i.

3. Resultados e discussão

3.1. Isolamento e seleção de fungos endofíticos quanto ao potencial biotransformador de terpenos

A Tabela 01 detalha a fonte utilizada para seleção de micro-organismos e a relação total de fungos isolados no presente trabalho, bem como a identificação utilizada no trabalho prático. Observou-se que 21 micro-organismos foram isolados do sapoti, 2 do jenipapo, 7 do caju, e 21 do camu-camu, resultando em 51 fungos endofíticos. Os micro-organismos foram codificados de acordo com as iniciais do laboratório de bioaromas e dos nomes científicos das frutas de origem.

Todos os endofíticos isolados foram testados no processo de biotransformação de terpenos, seguindo as metodologias apresentadas nos itens 2.3.1 e 2.3.2, sendo os resultados apresentados a seguir.

Tabela 01. Lista da identificação de fungos endofíticos utilizados no trabalho.

Origem	Códigos	Total
Sapoti	L.B.-M.Z.-1, L.B.-M.Z.-2, L.B.-M.Z.-3, L.B.-M.Z.-4, L.B.-M.Z.-5, L.B.-M.Z.-6, L.B.-M.Z.-7, L.B.-M.Z.-8, L.B.-M.Z.-9, L.B.-M.Z.-10, L.B.-M.Z.-11, L.B.-M.Z.-12, L.B.-M.Z.-13, L.B.-M.Z.-14, L.B.-M.Z.-15, L.B.-M.Z.-16, L.B.-M.Z.-17, L.B.-M.Z.-18, L.B.-M.Z.-19, L.B.-M.Z.-20, L.B.-M.Z.-21	21
Jenipapo	LB-G.A.-1, LB-G.A.-2	2
Caju	LB-A.O.-1, LB-A.O.-2, LB-A.O.-3, LB-A.O.-4, LB-A.O.-5, LB-A.O.-6, LB-A.O.-7	7
Camu-camu	LB-M.D.-1, LB-M.D.-2, LB-M.D.-3, LB-M.D.-4, LB-M.D.-5, LB-M.D.-6, LB-M.D.-7, LB-M.D.-8, LB-M.D.-9, LB-M.D.-10, LB-M.D.-11, LB-M.D.-12, LB-M.D.-13, LB-M.D.-14, LB-M.D.-15, LB-M.D.-16, LB-M.D.-17, LB-M.D.-18, LB-M.D.-19, LB-M.D.-20, LB-M.D.-21	21

3.2. Análises cromatográficas e seleção do potencial para biotransformação

Os fungos isolados do sapoti e do camu-camu apresentaram resultados para biotransformação dos terpenos selecionados, o que não ocorreu para os fungos originados das outras frutas.

O fungo originado do sapoti, identificado como L.B.-M.Z.-3 apresentou perfil de produção de álcool perílico a partir do limoneno. A Figura 03 apresenta o cromatograma de biotransformação para o fungo descrito, com perfis crescentes do produto a cada 24 h, exceto para a amostra para tempo de zero hora e para a amostra controle (na ausência do fungo testado)

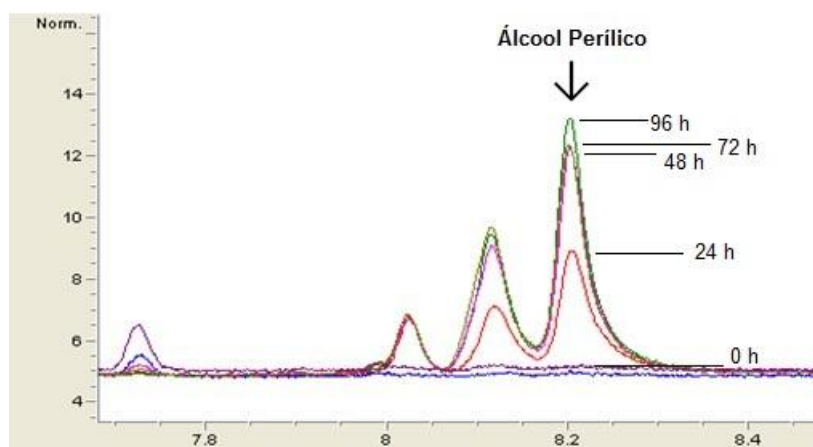


Figura 03. Produção de álcool perílico por fungo endófito L.B.-M.Z.-3.

Nos testes para α -pineno como fonte única de carbono, dois fungos, L.B.-M.D.-1 e L.B.-M.D.-4 realizaram a biotransformação para o terpenóide verbenona. As Figuras 04 e 05 apresentam a sobreposição dos cromatogramas dos fungos L.B.-M.D.-1 e L.B.-M.D.-4, respectivamente, a cada retirada diária de amostra, revelando perfis crescentes de produção da verbenona.

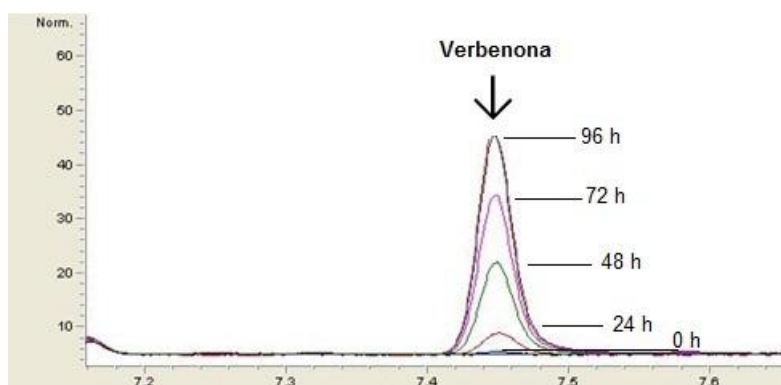


Figura 04. Produção de verbenona a partir de α -pineno pelo fungo L.B.-M.D.-1.

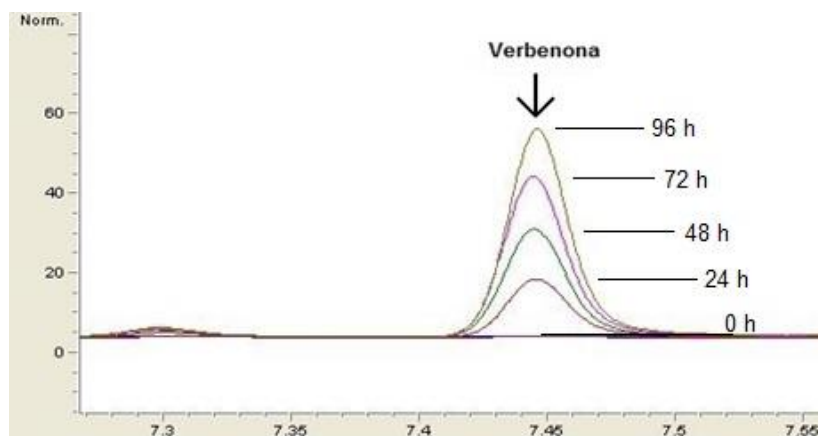


Figura 05. Produção de verbenona a partir de α -pineno pelo fungo L.B.-M.D.-4.

Os produtos obtidos neste trabalho são importantes em diversas aplicações. A Figura 06 detalha as respectivas estruturas químicas dos mesmos:

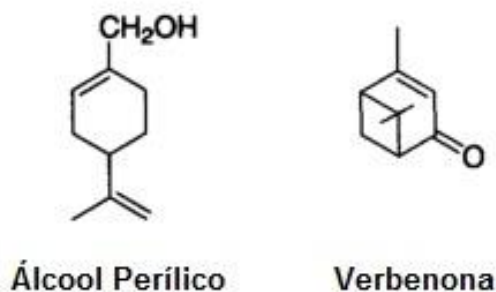


Figura 06. Estruturas químicas dos terpenóides obtidos nesse trabalho. Adaptação de (SCHRADER e BERGER, 2008).

A capacidade de proteção contra o câncer tem sido atribuída aos derivados de isopreno vinculados por dieta, como limoneno, carvona, mentol, e álcool perílico (CROWEL, 1999). Este é um monoterpênóide de destaque, notável não apenas por seu agradável aroma, por inibição de células cancerosas em proliferação (BICAS, NERI-NUMA, RUIZ, et al., 2011). Em comparação com o limoneno, a capacidade estudada deste álcool na regressão de tumores foi, no mínimo, cinco vezes superior (HAAG e GOULD, 1994).

Este álcool monocíclico que tem demonstrado atividade contra tumores de pâncreas, pele, fígado, estômago e pulmão (AZZOLI, MILLER, NG, *et al.*, 2003). No caso de tumores em células de pulmão, outros autores também relataram a inibição pelo álcool perílico (XU, FLOYD, GRETH, *et al.*, 2004; YERUVA, PIERRE, ELEGBEDE, *et al.*, 2007). Pesquisadores também indicaram este composto para intervenção em câncer de próstata (CHUNG, LEE, LEE, *et al.*, 2006). Estudos sugerem a ação deste mesmo álcool contra leucemia, paralisando crescimento e induzindo apoptose em células transformadas (CLARK, ZHONG, FILIAULT, *et al.*, 2003).

Novas estratégias em tratamento de gliomas malignos têm levado a testes de administração de álcool perílico por via nasal, pela redução de efeitos colaterais indesejáveis. Os autores relataram boa tolerância por pacientes, além de diminuição do tumor em alguns deles (DA FONSECA, SCHWARTSMANN, FISCHER, *et al.*, 2008).

A inibição do crescimento de células em câncer de mama também foi reportada *in vivo* e *in vitro* (YURI, DANBARA, TSUJITA-KYUTOKU, *et al.*, 2004). Este composto foi relacionado à redução de carcinomas mamários (81% em iniciais e 75% em avançados) provocados por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) em ratos Wistar-Furth (HAAG e GOULD, 1994).

A verbenona, por sua vez, é um componente do óleo de alecrim, presente em muito baixa concentração em óleos de origem sul-africana, podendo atingir quantidades maiores de composição em óleos de origem espanhola, de até 2,5% (SURBURG e PANTEM, 2006). Seu aroma é descrito por notas de cânfora e menta (AGRAWAL e JOSEPH, 2000). Apesar de em baixa concentração no alecrim, a verbenona é considerada um composto chave desta planta (SCHRADER, 2007).

A verbenona desempenha atividade biológica como feromônio de antiagregação sobre insetos e tem sido testada para o controle de pragas de

pinhos, como besouros (*Dendroctonus ponderosae* Hopkins) (GILLETTE, ERBILGIN, WEBSTER, *et al.*, 2009).

Este terpenóide destaca-se por sua aplicação na produção do taxol, um agente terapêutico (CÁNEPA, CHANQUÍA, EIMER, *et al.*, 2013). A verbenona é utilizada na síntese do anel A deste composto (WENDER e MUCCIARO, 1992; LAJUNEN e KOSKINEN, 1994). A atividade de taxanos como docetaxel e paclitaxel (Taxol®) sobre carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço, em quimioterapia de indução foi relatada (GALBIATTI, PADOVANI-JUNIOR, MANÍGLIA, *et al.*, 2013). O taxol tem sido útil no tratamento de vários tipos de câncer, como de pulmão, ovário, mamas, melanomas (FERREIRA, FRANKLIM, LOPES, *et al.*, 2012).

Pesquisadores afirmaram a produção de taxol pelo fungo endofítico identificado como *Taxomyces andreanae*, isolado do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) (STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993).

Todos os fungos detectados como biotransformadores de terpenos foram submetidos a novos experimentos em triplicatas, e os intervalos médios de áreas relativas obtidas foram observados para a obtenção de curvas-padrão. Entre todos os fungos de teste, o L.B.-M.D.-4 foi o que apresentou rendimento melhor.

O fungo L.B.-M.Z.-3 apresentou rendimento médio de álcool perílico de 17,4 mg.L⁻¹ após 96 h, como apresenta a Figura 07. O álcool perílico é muito interessante como produto de biotransformação. No entanto, este álcool apresenta grandes limitações de acúmulo e estabilidade por produção microbiana, como exemplifica a Figura 08, adaptada de SCHRADER (2007)

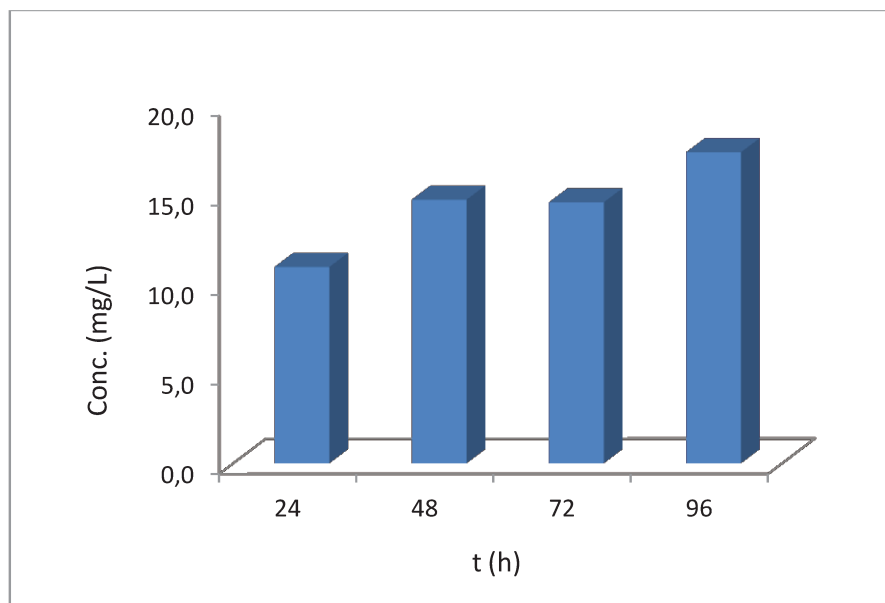


Figura 07. Produção média de álcool perílico ao longo de 96 h pelo fungo L.B.-M.Z-3.

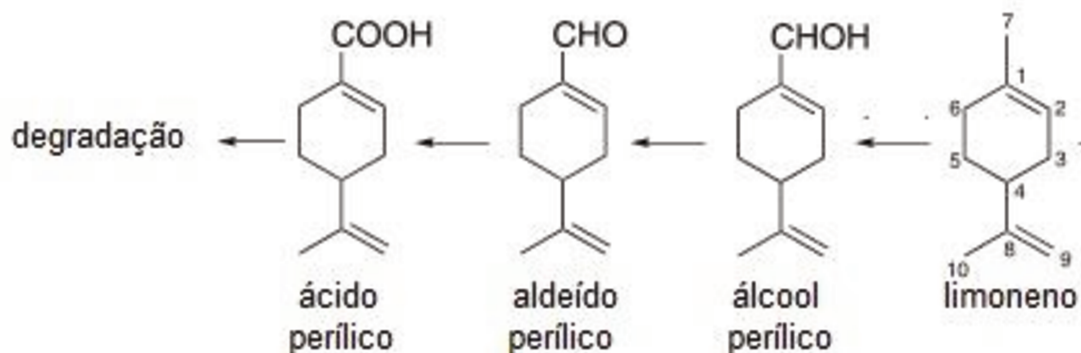


Figura 08. Degradação de derivados perílicos (SCHRADER, 2007).

O fungo *Penicillium* sp. 2360 mostrou capacidade de produzir álcool perílico a partir de limoneno, atingindo o rendimento máximo de $12,3 \text{ mg.L}^{-1}$ após 24 h de biotransformação (MARÓSTICA JR., MOTA, BAUDET, *et al.*, 2007).

Entre os trabalhos de produção biotecnológica de álcool perílico encontrados, notou-se um rendimento melhor do terpenóide por bactérias, mesmo que alguns casos estejam relacionados a modificações genéticas. Uma linhagem de *E. coli* geneticamente modificada apresentou rendimento em álcool perílico foi

de aproximadamente 100 mg.L^{-1} (ALONSO-GUTIERREZ, CHAN, BATTH, *et al.*, 2013).

A linhagem de *Bacillus stearothersophilus* BR388, isolada da casca de laranja, e de características termofílicas, foi capaz de biotransformar limoneno como fonte única de carbono, produzindo principalmente álcool perílico, mas também foram relatados outros terpenóides como aldeído perílico e α -terpineol. O rendimento do álcool neste trabalho foi de 200 mg.L^{-1} (CHANG e ORIEL, 1994). Pela continuação deste trabalho, os autores obtiveram uma patente de processo para produção de monoterpenos, a partir de uma bactéria de DNA recombinante. Um segmento de DNA de *Bacillus stearothersophilus* foi inserido em *E. coli*. Entre outros produtos, foi relatada a obtenção de $72,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $51,2 \text{ mg.L}^{-1}$ após 48 h, utilizando, respectivamente (R)-(+)- e (S)-(-)-limoneno como substratos (ORIEL, SAVITHIRY e CHANG, 1997).

Ainda melhor foi o resultado do trabalho em que cientistas expressaram genes de *Mycobacterium sp*, linhagem HXN-1500 em *Pseudomonas putida*, obtendo $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ de álcool perílico após 75 h de experimento em biorreator (VAN BEILEN, HOLTACKERS, LÜSCHER, *et al.*, 2005).

Nos experimentos de repetição para micro-organismos isolados do camu-camu, os rendimentos foram superiores o do fungo mencionado no parágrafo anterior. No caso do L.B.-M.D.-1, Figura 09, o experimento durou 144 h, tempo de melhor rendimento médio de verbenona ($101,1 \text{ mg.L}^{-1}$).

Mesmo em 144 h, o rendimento médio do fungo L.B.-M.D.-4 em verbenona ($133,6 \text{ mg.L}^{-1}$) já era superior ao do L.B.-M.D.-1 ($101,1 \text{ mg.L}^{-1}$). O experimento deste fungo foi então, prolongado para testar a possibilidade de maiores rendimentos. A maior concentração média de verbenona foi obtida em 288 h, alcançando $192,5 \text{ mg.L}^{-1}$, como detalha a Figura 10.

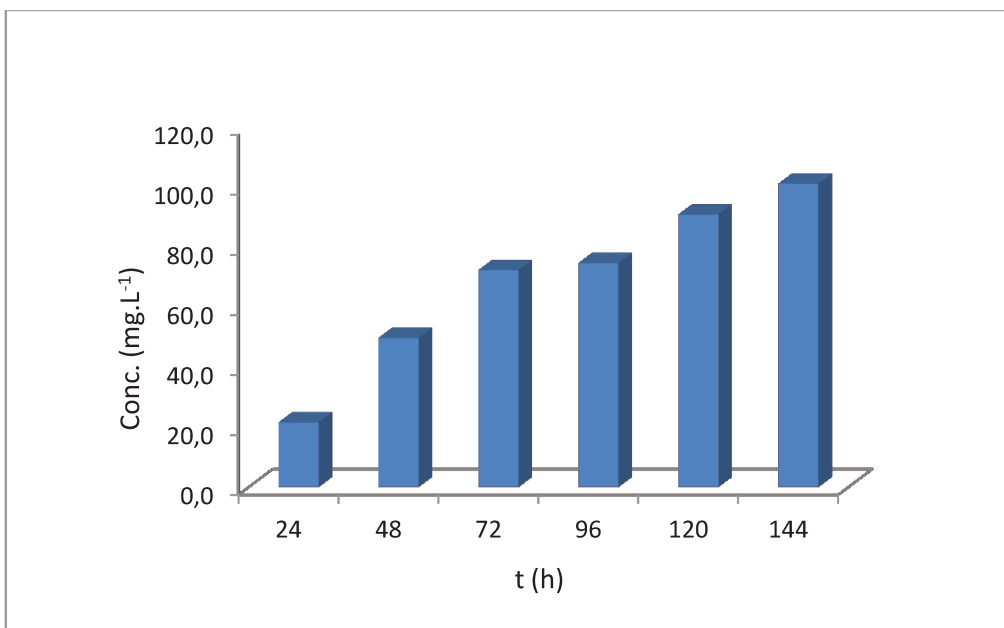


Figura 09. Produção média de verbenona pelo fungo L.B.-M.D.-1.

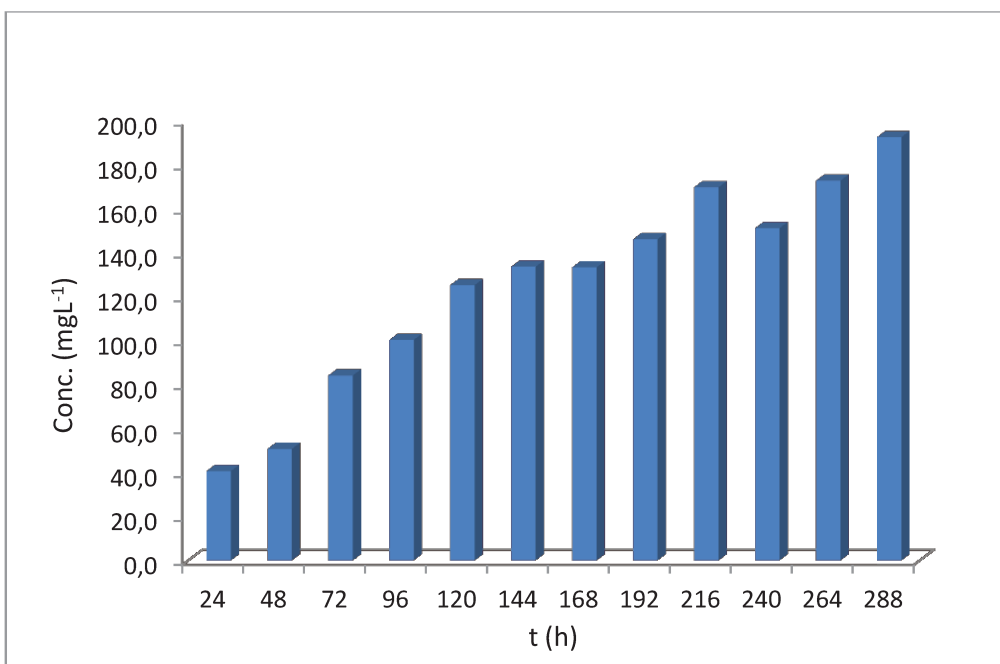


Figura 10. Rendimentos médios de verbenona para o fungo L.B.-M.D.-4.

A concentração máxima de verbenona obtida neste trabalho é superior aos rendimentos encontrados em trabalhos relacionados de produção

biotecnológica. Ainda assim, seria indicado um melhor estudo das variáveis do processo de biotransformação para uma futura otimização.

O fungo isolado do kiwi, identificado como *Penicillium solitum*, produziu 35 mg.L⁻¹ de verbenona, a partir de α -pineno, após 11 dias de experimento em frascos. A experiência foi também testada em fermentadores com reposição do substrato, que foi vinculado por sistema fechado de gás saturado com o terpeno, em concentrações não inibitórias, para verificar influências no rendimento. Não foram detectadas melhorias pela mudança do sistema. No entanto, o rendimento foi aumentado para 70 mg.L⁻¹ quando houve rompimento das células antes da recuperação do produto de interesse, revelando um efeito de retenção de verbenona pelas membranas celulares dos fungos (PESCHECK, MIRATA, BRAUER, *et al.*, 2009).

Uma concentração de 90 mg.L⁻¹ de verbenona foi obtida pelo fungo *Penicillium* sp 2360 após 3 dias de contato com pinenos do óleo de terebentina (MARÓSTICA JR., MOTA *et al.*, 2007). A recuperação de voláteis neste trabalho foi feita por a microextração em fase sólida (SPME).

Uma linhagem de *Aspergillus niger* foi capaz de biotransformar α -pineno a verbenona, chegando a 32,8 mg.L⁻¹. Para este trabalho, as características do meio de cultivo foram fundamentais, e o melhor rendimento foi alcançado em 6 h de fermentação, nas condições de 200 mg.L⁻¹ de α -pineno, 60 g.L⁻¹ de glicose e pH 7,0 (AGRAWAL e JOSEPH, 2000). Concentrações superiores do monoterpene foram consideradas inibitórias para este fungo.

Durante um trabalho mais recente, pesquisadores propuseram a síntese químico-enzimática de verbenona a partir do geranyl difosfato (GDP). O GDP foi convertido a α -pineno por método enzimático, e o próximo passo de oxidação a verbenona utilizou t-butil hidroperóxido (tBuOOH) na presença de catalisadores. O rendimento obtido foi de 150 mg.L⁻¹ (YOOSUF-ALY, FARALDOS, MILLER, *et al.*, 2012).

Se analisarmos os perfis voláteis das frutas de origem, os resultados positivos ou negativos dos fungos testados podem ser explicados no caso do camu-camu, caju e jenipapo.

O perfil volátil camu-camu (*Myrciaria dubia*) revelou predominância de terpenos, principalmente de α -pineno (66%), seguido do monoterpeneo R-(+)-limoneno (24%), e do sesquiterpeneo β -caryophyllene (4,6%) (FRANCO e SHIBAMOTO, 2000). É notável a presença do α -pineno no perfil volátil desta fruta em relação a outros terpenos, e uma hipótese é de que esta disponibilidade estaria relacionada aos resultados deste trabalho, uma vez que os dois fungos de maiores rendimentos foram isolados desta fruta, e foram capazes de utilizar este monoterpeneo como fonte única de carbono. Possivelmente, o sistema metabólico destes fungos esteja adaptado à presença constante de α -pineno do camu-camu.

A ausência de limoneno nas frutas jenipapo e caju explicam, em parte, os resultados negativos para os testes de biotransformação de fungos endofíticos destas frutas a este monoterpeneo. Durante um estudo de voláteis do jenipapo (*Genipa americana* L.) e afirmaram a predominância de ácidos orgânicos, como hexanóico, octanóico 2-metil-butírico, mas não foi detectado limoneno (BORGES e REZENDE, 2000). Entre os componentes voláteis do caju (*Anacardium occidentale* L.) o limoneno também não foi citado. A presença de terpenos foi relatada no óleo de folhas no caju vermelho, mas não nas frutas. Entre os voláteis das frutas de caju vermelho foram descritos ácido palmítico (19,6%) e oleico (19,6%) como predominantes (MAIA, ANDRADE e ZOGHBI, 2000).

O resultado deste trabalho sobre o fungo do sapoti L.B.-M.Z.-3, que utilizou o limoneno como fonte única de carbono, foi o mais surpreendente. O perfil volátil do sapoti (*Manilkara zapota* L.) foi estudado pela técnica de Micro-extração em Fase Sólida (SPME) e não revelou a presença de limoneno. (LAOHAKUNJIT, KERDCHOECHUEN, MATTA, *et al.*, 2007). Sendo assim, a hipótese de adaptação dos fungos endofíticos aos componentes voláteis de suas frutas de origem não se aplica ao deste fungo, em específico.

Algumas condições diferentes da tradicional foram estudadas para o rendimento do fungo L.B.-M.D.-4 em verbenona. Amostras em triplicatas foram submetidas a cada tratamento. A Tabela 02 apresenta a média das observações, considerando erros-padrão da média. Em todos os dias de análise, o rendimento de verbenona foi superior no tratamento tradicional, ou seja, no caso do experimento dos itens 2.3.1 e 2.3.2, sendo a indução enzimática nesse caso, ineficiente para o aumento do rendimento (Figura 11). A biotransformação em água foi possível, mas apresentou rendimentos predominantemente menores do que os outros tratamentos.

Os meios aquosos são normalmente preferidos em processos de biotransformação, uma vez que favorecem atuação de enzimas e células (DE CARVALHO e DA FONSECA, 2006). Bom rendimento na biotransformação em água seria ideal para uma futura otimização de verbenona, visto que um dos principais fatores de processo a ser considerado é o pH, que influencia diretamente na solubilidade de sais presentes no meio mineral.

Tabela 02. Médias de rendimento e erros-padrão para observações de triplicatas:

	T1	T2	T3
24 h	40,63 ± 8,35	29,00 ± 2,87	8,07 ± 4,39
48 h	50,76 ± 5,47	37,40 ± 4,13	31,50 ± 9,04
72 h	84,13 ± 3,43	46,67 ± 2,65	56,43 ± 9,91
96 h	100,33 ± 18,88	91,97 ± 8,61	55,60 ± 8,10

Dados coletados a partir do mesmo elemento de amostra, múltiplas vezes (em diferentes tratamentos e tempos) podem apresentar dependência. Para esses casos, os modelos usuais de regressão linear e ANOVA não são válidos, visto que assumem que os dados sejam independentes. Para incorporar a estrutura de dependência dos dados, utilizou-se o método de mínimos quadrados generalizados (MQG) para a comparação de rendimentos entre biotransformação em meio mineral sem indução enzimática (tratamento1), em meio mineral com

indução enzimática (tratamento 2), e biotransformação em água, sem indução enzimática (tratamento 3). As tabelas estatísticas estão disponíveis no ANEXO II.

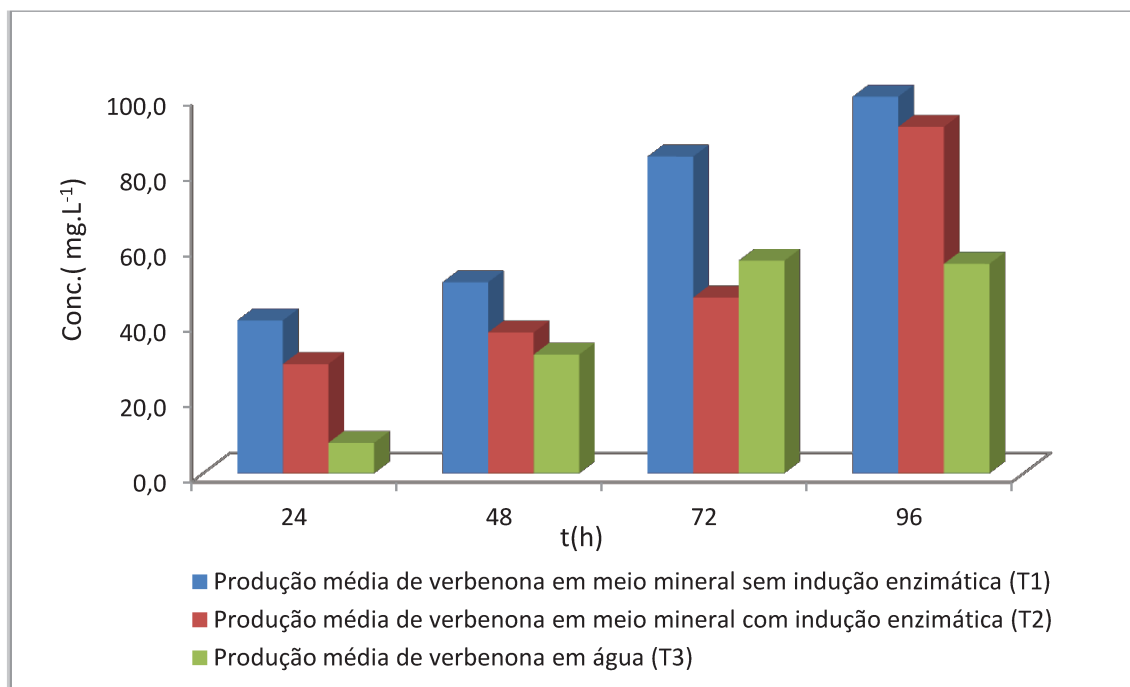


Figura 11. Produções médias de verbenona a partir do fungo L.B.-M.D.-4, para diferentes condições de biotransformação.

O modelo de regressão (utilizando MQG) com a variável resposta mg/L considerou nível de significância de 5% para os efeitos de tratamento, tempo (modelo quadrático) e a interação entre tempo e tratamento, e a interação entre tratamento e tempo foram estatisticamente significativos. Como a interação tratamento e tempo é estatisticamente significativa, não se pode comparar tratamento sem levar em conta o tempo. Deve-se então fixar o tempo para depois avaliar o efeito de tratamento e vice-versa.

Em comparação com o tratamento 2, o tratamento 3 mostrou diferenças significativas apenas nos tempos de 24 h e 96 h. No entanto, quando comparado ao tratamento 1, as médias foram estatisticamente significativas para todos os tempos estudados, para nível de significância 5% ($\alpha=0.05$). Em comparação com o tratamento 2, o tratamento 1 apresentou diferença significativa apenas nos

tempos de 48 h e 72 h. Em geral, o tratamento 1, ou seja, com biotransformação em meio mineral, sem indução enzimática foi o apresentou melhores resultados de rendimento de verbenona, com diferença estatisticamente significativa se comparado ao T3 em todos os tempos, e superior ao T2 nos tempos 48 h e 72 h. No entanto, a média final (96 h) entre os tratamentos 1 e 2 não foi considerada significativa para $\alpha=0,05$. As maiores diferenças de rendimento estimadas são entre os tratamentos T2 e T3 a 96 h de fermentação, de aproximadamente 33 mg.L^{-1} e ainda, entre T1 e T3 a 24 h de contato com o substrato, com diferença próxima a 31 mg.L^{-1} de verbenona. A Figura 12 representa um modelo estimado para produção de verbenona ao longo do tempo, pelo fungo L.B.-M.D-4.

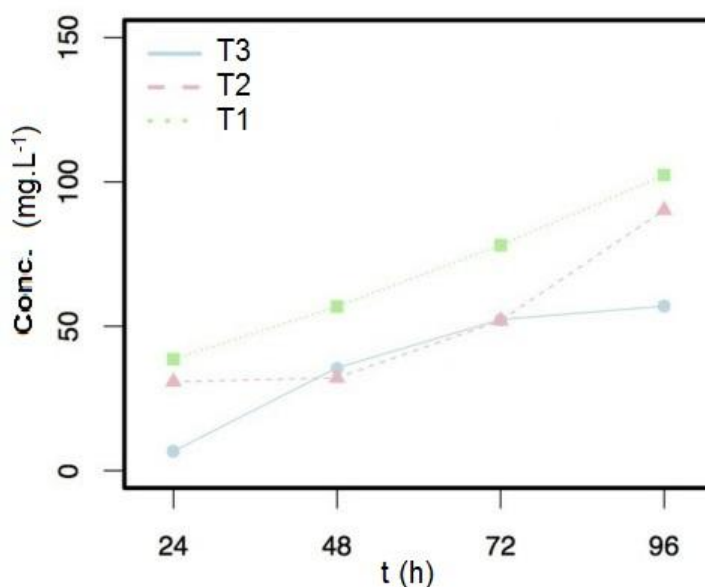


Figura 12. Modelos estimados de produção de verbenona ao longo do tempo, para cada tratamento, pelo fungo endofítico L.B.-M.D-4.

Uma das limitações da biotransformação de terpenos é a toxicidade destes substratos sobre micro-organismos (ONKEN e BERGER, 1999). Muitos compostos lipofílicos exercem efeitos prejudiciais sobre o crescimento de micro-organismos e são capazes de afetar outras reações biológicas de importância (SIKKEMA, POOLMANN, KONINGS, *et al.*, 1992). Espera-se que o

desenvolvimento de novas linhagens tolerantes a solventes orgânicos viabilizaria novos processos biotecnológicos (WEBER e DE BONT, 1996)

O logaritmo decimal do coeficiente de partição de compostos hidrofóbicos entre fases de n-octanol e água, conhecido como log P, tem sido considerado um parâmetro importante para relacionar a toxicidade de tais compostos sobre micro-organismos (VAN SONSBECK, BEEFTINK e TRAMPER, 1993; ONKEN e BERGER, 1999). Potentes toxicidades têm sido relacionadas a compostos de log P entre 1 e 5 (ONKEN e BERGER, 1999).

Sabe-se que a membrana celular é pouco permeável a compostos carregados ou polares (SIKKEMA, DE BONT e POOLMANN, 1995), o que nem sempre acontece com terpenos. Durante um estudo de toxicidade celular diferentes hidrocarbonetos cíclicos nas células, características como hidrofobicidade e coeficiente de partição (log P) foram relacionadas a diversos compostos, muitos dos quais terpenos. O de coeficiente de partição foi o mesmo para terpenos como limoneno, α -pineno, β -pineno e γ -Terpineno, de valor 4,46, inferior apenas ao de log P da decalina, entre os compostos estudados. Modificações estruturais e funcionais na membrana celular foram atribuídas ao acúmulo de tais compostos na mesma (SIKKEMA, DE BONTT e POOLMANN, 1994). A hidrofobicidade do composto influencia a profundidade ao longo da membrana celular em que ele é acumulado, e assim, seu efeito na integridade da mesma (WEBER e DE BONT, 1996).

Especificamente para o α -pineno, SIKKEMA, de BONTT *et al* (1994) relataram o efeito de aumento de fluidez na membrana pela técnica de polarização de fluorescência de DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno). O mesmo efeito na membrana foi também observado no limoneno (ONKEN e BERGER, 1999), o outro substrato utilizado no presente trabalho. Tais alterações poderiam causar perda de metabólitos essenciais, além da diminuição da força próton-motora, que por sua vez, resultaria em menor eficiência na energia de transdução (WEBER e DE BONT, 1996). O controle do pH intracelular é também um fator importante em micro-organismos, que pode ser afetado por danos à integridade da membrana celular causados por hidrocarbonetos cíclicos (SIKKEMA, DE

BONT *et al.*, 1995). Sendo assim, outro teste de interesse para uma futura otimização foi o que avaliou a variação da biomassa em função de diferentes concentrações de α -pineno. A concentração excessiva de substrato poderia inibir o micro-organismo, enquanto pouco substrato diminuiria o rendimento. A Tabela 03 resume as médias das observações, com erros padrão da média. A Figura 13 apresenta as médias finais, em relação às iniciais para para concentração de α -pineno.

Tabela 03. Médias finais de massa para concentrações crescentes de α -pineno, e respectivos erros-padrão.

% α-pineno	Média \pm EPM
0%	3,95 \pm 0,05
0,50%	3,37 \pm 0,06
0,75%	3,22 \pm 0,02
1%	2,86 \pm 0,06
1,25%	2,92 \pm 0,20
1,50%	2,26 \pm 0,03
1,75%	2,32 \pm 0,13

Para comparação entre os tratamentos, foi feita uma análise de variância, em que houve diferença significativa de diminuição de biomassa para diferentes concentrações de terpenos, para 95% de confiança. Como efeito de concentração foi significativo, usou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas das concentrações.

Na comparação entre os tratamentos dois a dois, a biomassa com 0,5% de α -pineno não teve diferença significativa se comparada aos tratamentos de 0,75% e 1,25%. As amostras com 0,75% também não diferiram significativamente ($P > 0.05$) dos tratamentos com 1,00% e 1,25%. A diminuição de biomassa não foi significativa entre os tratamentos de 1,00% e

1,25% α -pineno, o mesmo ocorreu para os tratamentos 1,50% e 1,75%, considerando 95% de confiança.

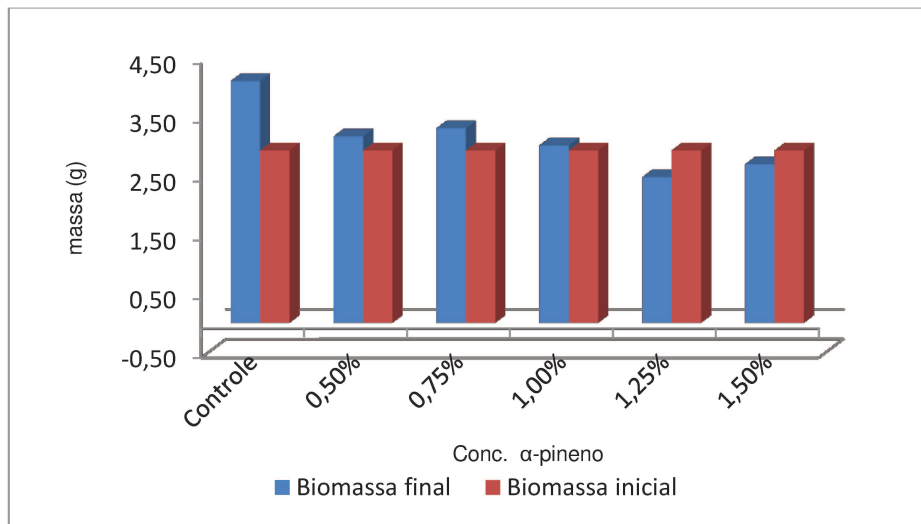


Figura 13. Variação da biomassa do fungo L.B.-M.D.-4 em função de diferentes concentrações de α -pineno, em comparação com a massa inicial.

Foi estudado um modelo de regressão (Figura 14), em que a variável resposta massa final (gramas) variou com o efeito da concentração.

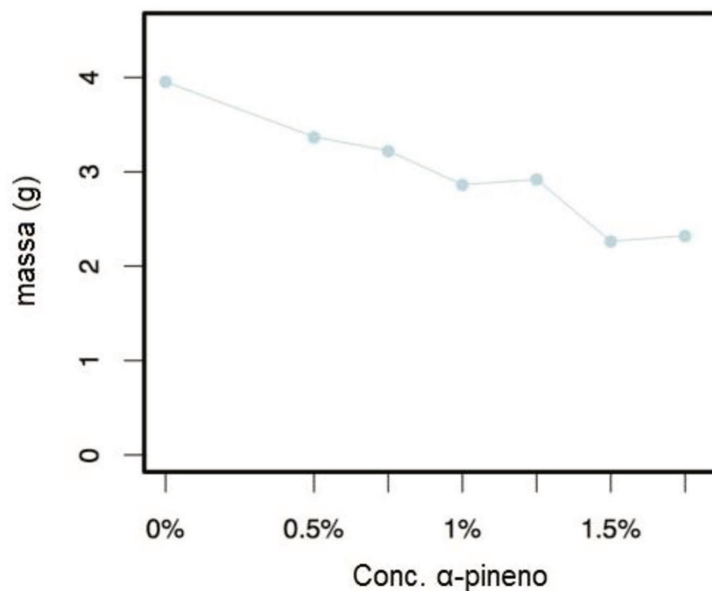


Figura 14. Modelo de regressão para variação da biomassa em função da concentração de alfa pineno.

Modelos considerados: tratando concentração como variável contínua (linear e quadrática) e como variável categórica. O modelo final escolhido, através da comparação do A.I.C. (Akaike Information Criterion) dos diversos modelos testados, considerou a concentração como variável categórica.

3.3. Microcultivo para fungos biotransformadores

As figuras seguintes apresentam os fungos biotransformadores de terpenos observados ao microscópio:

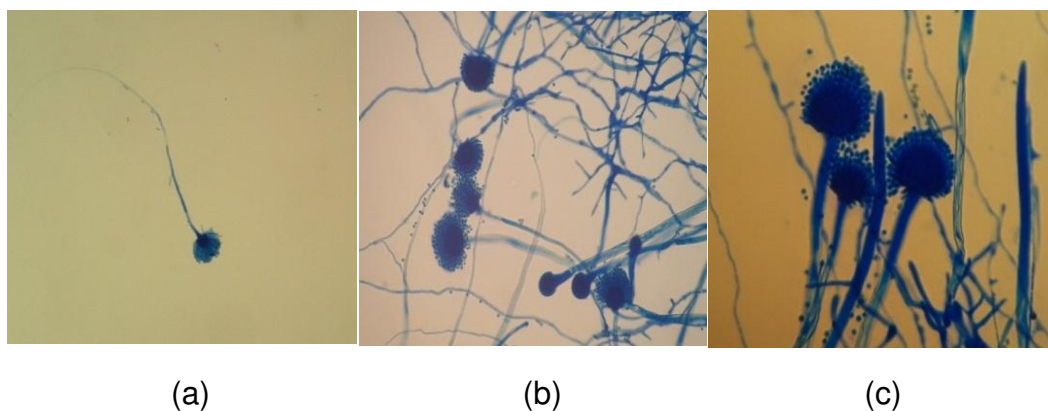


Figura 15. Imagens do fungo LB-M.Z.- 3 por microscopia óptica após 24 h de crescimento em meio YM.

O fungo L.B.-M.Z.-3 apresentou morfologia comparável ao gênero *Aspergillus*, enquanto o gênero dos outros dois fungos não foi identificado apenas por observação das morfologias.

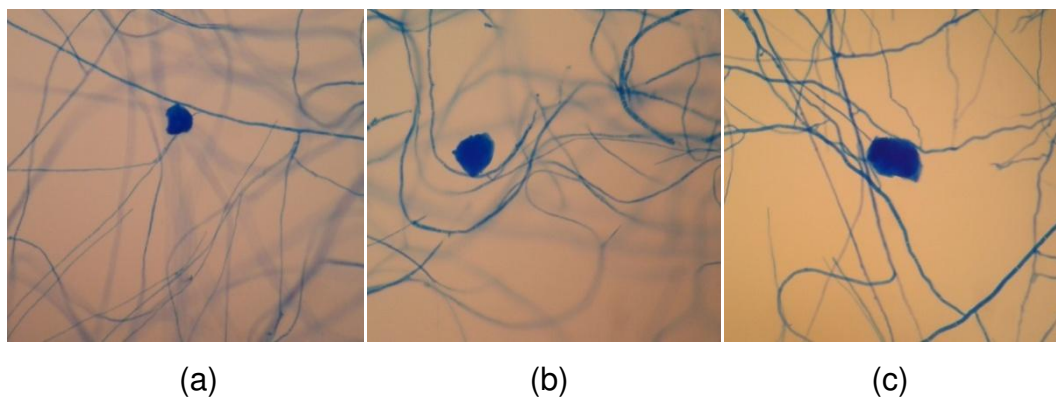


Figura 16. Imagens ampliadas do fungo L.B.-M.D.-4.(100, 200 e 400 vezes).

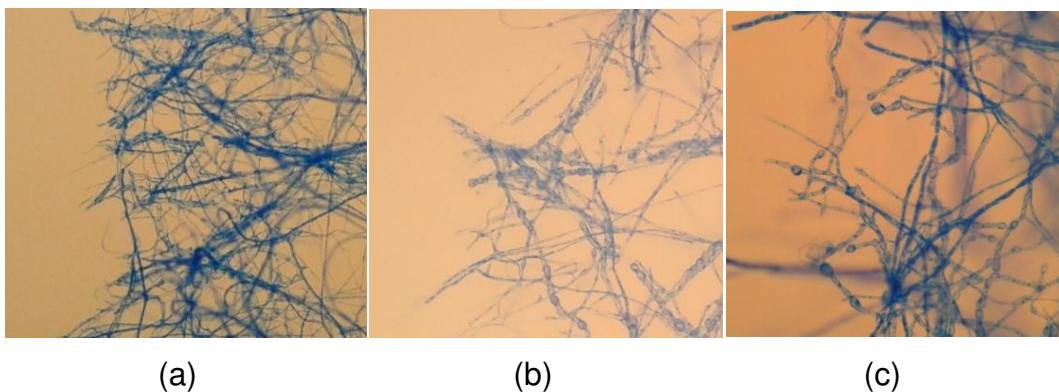


Figura 17. Imagens após 72 h de incubação, apresentando o fungo L.B.-M.D.-4., ampliado 100 (a), 200 (b) e 400 (c) vezes, respectivamente.

Todos os fungos biotransformadores estão em processo de identificação genética para identificação taxonômica dos respectivos gêneros e espécies.

4. Conclusão

Cinquenta e um fungos originados de quatro frutas tropicais foram isolados em diferentes meios de cultura para avaliação do potencial biotecnológico para produção de aromas. Os fungos obtidos por caju, jenipapo e sapoti foram desafiados a utilizar o limoneno como única fonte de carbono. Desses fungos, apenas um, originado do sapoti, apresentou resultado positivo, biotransformando o monoterpene em álcool perílico. O rendimento de álcool perílico foi muito baixo se comparado aos outros trabalhos de produção biotecnológica. Além disso, a obtenção deste álcool apresenta limitações, devido à sua baixa instabilidade. Entre vinte e um fungos obtidos da fruta camu-camu, dois apresentaram perfil de biotransformação para α -pineno. O rendimento máximo, de aproximadamente 200 mg.L^{-1} é considerado promissor comparado a outros trabalhos citados neste capítulo. O rendimento ainda não foi otimizado, e possui potencial para melhores rendimentos no futuro. Um estudo de comportamento da linhagem L.B.-M.D.-4 foi conduzido, revelando sensibilidade esperada deste fungo ao α -pineno, o que indica que a concentração de substrato

no caso de uma futura otimização precisa ser escolhido com prudência, para evitar inibições indesejáveis.

CONCLUSÃO GERAL

Durante este trabalho, foram isolados 51 fungos endofíticos de diferentes frutas tropicais, e três deles apresentaram potencial biotransformador para limoneno ou alfa pineno como fontes únicas de carbono. Um fungo foi capaz de produzir álcool perílico, terpenóide de grande aplicação em câncer. Outros dois fungos apresentaram verbenona pela biotransformação de α -pineno, sendo o maior rendimento próximo a 200 mg.L^{-1} em 288 h de experimento. A verbenona apresenta importância como aroma, feromônio de anti-agregação e na síntese do taxol, que por sua vez tem demonstrado efeito contra diversos tipos de câncer.

Na comparação de biotransformações para diferentes meios, o teste 1 mostrou-se mais produtivo em todos os tempos se comparado ao tratamento 3, e mais produtivo do que o tratamento 2 nos tempos de 48 h e 72 h. Sendo assim, a utilização do meio mineral, e sem indução enzimática, que refere-se ao tratamento tradicionalmente utilizado para biotransformação ainda é a mais indicada, pois nenhuma modificação nesta metodologia ou no meio de biotransformação resultou em maior rendimento de verbenona, no acompanhamento durante 96 h.

Sabe-se que a concentração de substrato é um fator importante em otimizações, e terpenos podem exercer efeitos de toxicidades sobre micro-organismos. Com o objetivo de avaliar o comportamento da linhagem L.B-M.D-4 ao α -pineno, foi observada a variação da biomassa deste fungo em função de concentrações crescentes deste monoterpene. Houve diferença estatisticamente significativa entre amostras controle, ou seja, sem terpenos, e as amostras de teste, indicando certa sensibilidade da linhagem à presença do terpeno.

A importância deste trabalho pode ser relacionada ao incentivo de técnicas ambientalmente sustentáveis, pela seleção e estudo de fungos endofíticos com potencial biotecnológico. Muitos estudos ainda são necessários para avaliar o real potencial que pode ser obtido da adaptação de micro-organismos endofíticos a seus ambientes de origem e a exploração de suas capacidades bioquímicas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os fungos endofíticos biotransformadores observados ao microscópio terão o DNA sequenciado, para a identificação taxonômica até espécie. O sequenciamento será feito no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA – Paulínia.

A otimização de verbenona seria a próxima etapa prevista para continuidade deste trabalho. Deseja-se avaliar a influência de variáveis de processo, tais como pH, temperatura, rotação, entre outras, com o objetivo de aumentar o rendimento do produto principal. A longo prazo, as condições otimizadas seriam validadas, e finalmente seriam realizados experimentos de aumento de escala, inclusive, para testes de utilização de terebintina como fonte de α -pineno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R. **Flavors and Aromas**. New York, Marcel Dekker, v.21 2004. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications.

AGRAWAL, R.; JOSEPH, R. Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n. 3, p.335-337 2000.

ALONSO-GUTIERREZ, J.; CHAN, R.; BATTI, T. S., *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. **Metabolic Engineering**, v.19, n. 0, p.33-41 2013.

ARCHER, B. D.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. **Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids - Food Biotechnology**. Berlin, Springer, v.111 2008. Advances in Biochemical and Engineering/Biotechnology.

AZZOLI, C.; MILLER, V.; NG, K., *et al.* A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.51, n. 6, 2003/06/01, p.493-498 2003.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v.57, n. 1, p.289-300 1995.

BERGER, R. G. **From fermentation to white biotechnology: how microbial catalysts generate flavours**. Boca Raton, CRC Press, 2007. Modifying flavour in food.

BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Biotechnological Flavour Generation. In: (Ed.). **Food Flavour Technology**: Wiley-Blackwell, 2010. Biotechnological Flavour Generation, p.89-126.

BICAS, J. L.; NERI-NUMA, I. A.; RUIZ, A. L. T. G., *et al.* Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n. 7, p.1610-1615 2011.

BOELENS, M. H. **Production, Chemistry and Sensory Properties of Natural Isolates**. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1997. Flavour and Fragrances.

BORGES, E. S.; REZENDE, C. M. Main Aroma Constituents of Genipap (*Genipa americana* L.) and Bacuri (*Platonia insignis* M.). **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n. 1, 2000/01/01, p.71-74 2000.

BUSMANN, D.; BERGER, R. G. **Bioconversion of terpenoid hydrocarbons by basidiomycetes**, Elsevier, v.35 1994. Developments in Food Science - Trends in Flavor Research.

CÁNEPA, A. L.; CHANQUÍA, C. M.; EIMER, G. A., *et al.* Oxidation of olefins employing mesoporous molecular sieves modified with copper. **Applied Catalysis A: General**, v.462-463, n. 0, p.8-14 2013.

CHANG, H. C.; ORIEL, P. Bioproduction of Perillyl Alcohol and Related Monoterpenes by Isolates of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, v.59, n. 3, p.660-662 1994.

CHUNG, B. H.; LEE, H.-Y.; LEE, J. S., *et al.* Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v.236, n. 2, p.222-228 2006.

CLARK, S. S.; ZHONG, L.; FILIAULT, D., *et al.* Anti-Leukemia Effect of Perillyl Alcohol in Bcr/Abl-Transformed Cells Indirectly Inhibits Signaling through Mek in a Ras- and Raf-Independent Fashion. **Clinical Cancer Research**, v.9, n. 4494 2003.

CROWEL, P. L. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. **The Journal of Nutrition**, v.129, n. 3, p.775S-778S 1999.

DA FONSECA, C. O.; SCHWARTSMANN, G.; FISCHER, J., *et al.* Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. **Surgical neurology**, v.70, n. 3, p.259-266 2008.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v.24, n. 2, p.134-142 2006.

DUETZ, W. A.; BOUWMEESTER, H.; BEILEN, J. B., *et al.* Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n. 4, 2003/05/01, p.269-277 2003.

FERON, G.; WACHÉ, Y. **Microbial Biotechnology of Food Flavor Production**. Boca Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D., *et al.* Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v.4, n. 3, p.208-224 2012.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile Composition of Some Brazilian Fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araça-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 4, 2000/04/01, p.1263-1265 2000.

GALBIATTI, A. L. S.; PADOVANI-JUNIOR, J. A.; MANÍGLIA, J. V., *et al.* Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.79, p.239-247 2013.

GILLETTE, N. E.; ERBILGIN, N.; WEBSTER, J. N., *et al.* Aerially applied verbenone-releasing laminated flakes protect *Pinus contorta* stands from attack by *Dendroctonus ponderosae* in California and Idaho. **Forest Ecology and Management**, v.257, n. -, p.1405-1412 2009.

GRUNERT, K. G. **How consumers perceive food quality**. Boca Raton, CRC Press, 2007. Understanding consumers of food products.

HAAG, J.; GOULD, M. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.34, n. 6, 1994/11/01, p.477-483 1994.

HUMPHREY, A.; BEALE, M. H. **Terpenes**, Blackwell Publishing Ltd, 2006. Plant Secondary Metabolites.

LAJUNEN, M.; KOSKINEN, A. M. P. Co(II)-catalysed allylic oxidation of α -pinene by molecular oxygen; synthesis of verbenone. **Tetrahedron Letters**, v.35, n. 25, p.4461-4464 1994.

LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O.; MATTA, F. B., *et al.* Postharvest Survey of Volatile Compounds in Five Tropical Fruits Using Headspace-solid Phase Microextraction (HS-SPME). **Hort Science**, v.42, n. 2, p.309-314 2007.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. G. B. Volatile Constituents of the Leaves, Fruits and Flowers of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, n. 3, p.227-232 2000.

MARÓSTICA JR., M. R.; MOTA, N. O.; BAUDET, N., *et al.* Fungal biotransformation of monoterpenes found in agro-industrial residues from orange and pulp industries into aroma compounds: Screening using solid phase microextraction. **Food Science and Biotechnology**, v.16, n. 1, p.37-42 2007.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v.30, p.382-387 2007.

MOLINA, G.; PINHEIRO, D.; PIMENTEL, M., *et al.* Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits. **Food Science and Biotechnology**, v.22, n. 4, 2013/08/01, p.999-1006 2013.

MOTHERWELL, H. **Bicyclic Monoterpenoids** Cambridge, Royal Society of Chemistry 2003. A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry .

ONKEN, J.; BERGER, R. G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. **Journal of Biotechnology**, v.69, n. 2–3, p.163-168 1999.

ORIEL, P. J.; SAVITHIRY, S.; CHANG, H. C. Process for the preparation of monoterpenes using bacterium containing recombinant DNA. 1997.

PESCHECK, M.; MIRATA, M.; BRAUER, B., *et al.* Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium sp.* by use of a closed gas loop bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, n. 6, p.827-836 2009.

SCHAFT, P. V. D.; GEEL, I. V.; JONG, D. G., *et al.* **Microbial production of natural furfurylthiol**, Elsevier Science B.V., v.35 1994. Trends in Flavour Research.

SCHRADER, J. **Microbial flavour production**, Springer, 2007. Flavours and Fragrances—Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.

SCHRADER, J.; BERGER, R. G. **Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds**, Wiley - VCH, v.10 2008. Biotechnology: Special processes.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S., *et al.* Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v.97, n. 12, p.1447-1450 1993.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMANN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, n. 2, p.201-222 1995.

SIKKEMA, J.; DE BONTT, J. A. M.; POOLMANN, B. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n. 11, p.8022-8028 1994.

SIKKEMA, J.; POOLMANN, B.; KONINGS, W. N., *et al.* Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. **Journal of Bacteriology**, v.174, n. 9, p.2986–2992. 1992.

SILVA, R. L. D. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B. D., *et al.* Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, p.649-655 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v.260, n. - 1993.

SURBURG, H.; PANTEM, J. **Individual Fragrance and Flavor Materials** Weinheim, Wiley-VCH, 2006. Common Fragrance and Flavor Materials.

SURESH, B.; RITU, T.; RAVISHANKAR, G. A. **Biostranformations as Applicable to Food Industries**. Boc Raton, CRC Press, 2006. Food Microbiology.

TANIWAKI, M. T.; DA SILVA, N. **Laboratório de Microbiologia**, ITAL, 1996. Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção.

VAN BEILEN, J. B.; HOLTACKERS, R.; LÜSCHER, D., *et al.* Biocatalytic Production of Perillyl Alcohol from Limonene by Using a Novel *Mycobacterium* sp. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase Expressed in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 4, April 1, 2005, p.1737-1744 2005.

VAN SONSBECK, H. M.; BEEFTINK, H. H.; TRAMPER, J. Two-liquid-phase bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 9, p.722-729 1993.

WEBER, F. J.; DE BONT, J. A. M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v.1286, n. 3, p.225-245 1996.

WENDER, P. A.; MUCCIARO, T. P. A new and practical approach to the synthesis of taxol and taxol analogs: the pinene path. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, n. 14, 1992/07/01, p.5878-5879 1992.

XU, M.; FLOYD, H. S.; GRETH, S. M., *et al.* Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n. 2, p.232-246 2004.

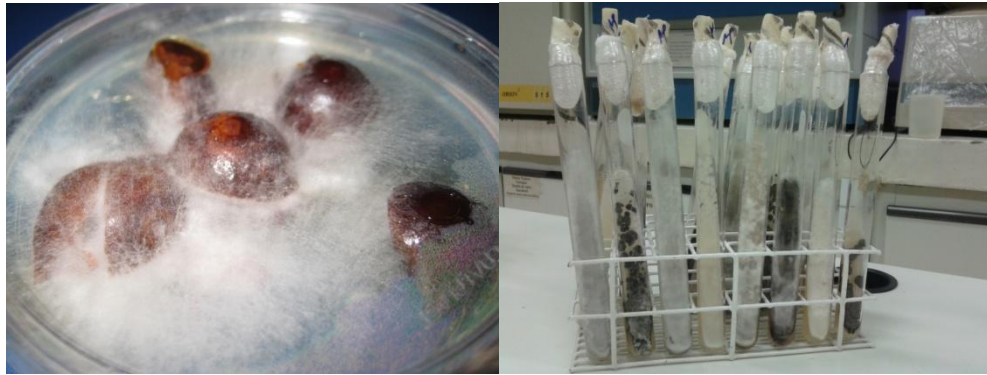
YERUVA, L.; PIERRE, K. J.; ELEGBEDE, A., *et al.* Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v.257, n. 2, p.216-226 2007.

YOOSUF-ALY, Z.; FARALDOS, J. A.; MILLER, D. J., *et al.* Chemoenzymatic synthesis of the alarm pheromone (+)-verbenone from geranyl diphosphate. **Chemical Communications**, v.48, n. 56, p.7040-7042 2012.

YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M., *et al.* Perillyl Alcohol Inhibits Human Breast Cancer Cell Growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.84, n. 3, 2004/04/01, p.251-260 2004.

ANEXO I

A Figura 01 detalha o registro de algumas etapas do isolamento dos fungos de frutas do cammu-camu:



(a)

(b)

Figura 01. (a) Isolamento de fungos endofíticos do camu-camu em placa (b) Tubos contendo micro-organismos isolados em meio YM.

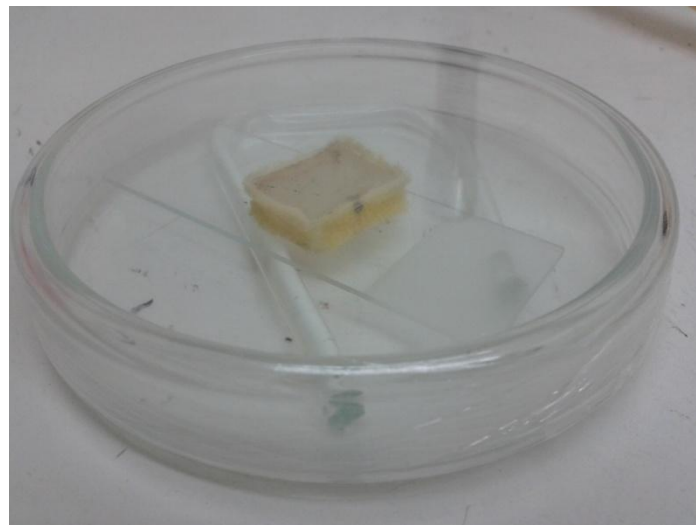


Figura 02. Placa para microcultivo com L.B-M.Z.-3.

ANEXO II

Tabela 01. Teste de Wald para comparação rendimento de verbenona entre diferentes tratamentos:

Fator	Estatística do teste de Wald	Graus de liberdade	p-valor
Tratamento	10	2	0,0068
Tempo	34,3	2	<0,0001
Tratamento*tempo	11,5	4	0,0021

Tabela 02. Diferenças estimadas entre tratamentos e diferenças significativas

Comparação	Tempo (hrs)	Dif. estimada	Erro padrão	p-valor	p-valor ajust.
T3xT2	24	-24,06	9,94	0,0155	0,0232
T3xT2	48	3,47	7,91	0,6614	0,7215
T3xT2	72	0,40	7,91	0,9595	0,9595
T3xT2	96	-33,25	9,94	0,0008	0,0032
T3xT1	24	-31,91	9,94	0,0013	0,0032
T3xT1	48	-21,24	7,91	0,0073	0,0124
T3xT1	72	-25,73	7,91	0,0011	0,0032
T3xT1	96	-45,39	9,94	<0,0001	0,0001
T2xT1	24	-7,86	9,94	0,4293	0,5152
T2xT1	48	-24,70	7,91	0,0018	0,0036
T2xT1	72	-26,13	7,91	0,0010	0,0032
T2xT1	96	-12,15	9,94	0,2217	0,2956

Tabela 03. Análise de variância para variação de biomassa do fungo L.B.-M.D.-4 em função de concentrações crescentes de α -pineno

Fator	Estatística F	p-valor
Tratamento	34,25	<0,0001

Tabela 04. Diferenças estimadas de decréscimo de biomassa para diferentes tratamentos, em comparação com a amostra controle.

Tratamento	Diferença estimada de biomassa	Erro padrão	p-valor
0,50%	-0,58	0,14	< 0,001
0,75%	-0,73	0,14	< 0,0001
1,00%	-1,09	0,14	< 0,0001
1,25%	-1,03	0,14	< 0,0001
1,50%	-1,69	0,14	< 0,0001
1,75%	-1,63	0,14	< 0,0001

Tabela 05. Comparação entre tratamentos, dois a dois, na variação de biomassa.

Tratamento	Diferença estimada	Limite inferior (IC 95%)	Limite superior (IC 95%)	p-valor ajustado
0,50%-0%	-0,58	-1,07	-0,09	0,015
0,75%-0%	-0,73	-1,22	-0,23	0,002
1,00%-0%	-1,09	-1,58	-0,59	<0,0001
1,25%-0%	-1,03	-1,52	-0,54	<0,0001
1,50%-0%	-1,69	-2,18	-1,19	<0,0001
1,75% - 0%	-1,63	-2,12	-1,13	<0,0001
0,75%-0,50%	-0,14	-0,63	0,34	0,94
1,00%-0,50%	-0,50	-0,99	-0,01	0,04
1,25%-0,50%	-0,45	-0,94	0,04	0,08
1,50%-0,50%	-1,10	-1,59	-0,61	<0,0001
1,75%-0,50%	-1,04	-1,53	-0,55	<0,0001
1,00%-0,75%	-0,36	-0,85	0,13	0,228
1,25%-0,75%	-0,30	-0,79	0,18	0,396
1,50%-0,75%	-0,96	-1,45	-0,46	<0,001
1,75%-0,75%	-0,90	-1,39	-0,40	<0,001
1,25%-1,00%	0,05	-0,43	0,54	0,999
1,50%-1,00%	-0,60	-1,09	-0,11	0,012
1,75%-1,00%	-0,54	-1,03	-0,04	0,026
1,50%-1,25%	-0,65	-1,14	-0,16	0,006
1,75%-1,25%	-0,59	-1,08	-0,11	0,013
1,75%-1,50%	0,06	-0,43	0,55	0,999