



BRUNO NICOLAU PAULINO

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA A PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS DE AROMA A PARTIR DE SUBSTRATOS MONOTERPÊNICOS**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNO NICOLAU PAULINO

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA A PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS DE AROMA A PARTIR DE SUBSTRATOS MONOTERPÊNICOS**

**OPTIMIZATION OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR THE
PRODUCTION OF AROMA COMPOUNDS FROM MONOTERPENIC
SUBSTRATES**

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre 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: Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO BRUNO NICOLAU PAULINO

PROF^a DR^a GLÁUCIA MARIA PASTORE

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Helena Joana Flipsen - CRB 8/5283

P284o Paulino, Bruno Nicolau, 1989-
Otimização de processos biotecnológicos para
a produção de compostos de aroma a partir de substratos monoterpênicos / Bruno
Nicolau Paulino. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Aroma. 2. Biotransformação. 3. Monoterpenos. 4. Otimização. I. Pastore,
Gláucia Maria, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Optimization of biotechnological processes for the production of
aroma compounds from monoterpene substrates

Palavras-chave em inglês:

Aroma

Biotransformation

Monoterpenes

Optimization

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Bruno Ricardo Vilachã Ferreira

Daniele Souza de Carvalho

Data de defesa: 21-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**PROFA. DRA. GLAÚCIA MARIA PASTORE (DCA/FEA/UNICAMP) –
ORIENTADORA/ MEMBRO**

**PROFA. DRA. DANIELE SOUZA DE CARVALHO (IFSP-CAMPUS AVARÉ)
MEMBRO**

**DR. BRUNO RICARDO VILACHÃ FERREIRA (IQ/UNICAMP)
MEMBRO**

**PROF. DR. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JUNIOR (DEPAN/FEA/UNICAMP)
SUPLENTE**

**PROF. DR. YONG KUN PARK (DCA/FEA/UNICAMP)
SUPLENTE**

Dedico esse trabalho à minha maravilhosa e linda mãe,
Maria. Meu exemplo e referencial. Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e proteção nos caminhos que tomei e os que virão, fundamental foi e é a fé para cumprir mais essa etapa;

À Professora Gláucia Pastore, pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante o desenvolvimento desse trabalho;

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de Mestrado.

À minha família, em especial aos meus pais e meus irmãos mais velhos: Rosi e seu marido Vando, e ao Sânio e sua esposa Simoni, pela ajuda, apoio, conselhos e por serem meus segundos pais em muitos momentos, desde sempre agradeço.

Aos membros da banca, titulares e suplentes, pelas sugestões e disponibilidade;

Aos amigos do Laboratório de Bioaromas que fizeram o diferencial nesses dois anos. Sempre presentes nos diversos momentos. Em especial, agradeço ao grande amigo Gustavo Molina, que desde o primeiro dia foi solícito e paciente, mesmo longe ainda se preocupou e foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Agradeço as “delicadas” e especiais meninas do Bioaromas pela paciência, ajuda e boas risadas: Meissa, Marina e Ana Paula.

Aos demais amigos de laboratório: Gustavo Araújo, Leonardo, Ana Simiqueli, Verônica, Ana Stela, Renata e todos os outros.

À Angélica, pela amizade, conversas produtivas, conselhos, broncas e risadas.

Ao grande Nadir, pelo exemplo de simplicidade e amizade. Os dias não seriam os mesmos sem as comédias dessa grande figura.

Aos amigos do Instituto de Química. Do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos e agregados: Primeiramente ao Prof. Coelho pela primeira oportunidade de vir à Unicamp e claro aos seus alunos, que muito me ajudaram e compartilharam bons momentos, especialmente a Marília, Manoel, Rosi, Juliana, Zé, Tiago, Lucimara, Lucas, Rodrigo, e tantos outros pela receptividade desde 2009. Aos amigos do Laboratório

Thomson, ao Professor Marcos Eberlin, que sempre de portas abertas foram responsáveis por bons momentos durante a pós: Giovana, Dávila, Núbia, Bruno, Adriana, Pedro, Marquinhos, Deleon, Vinicius, Gustavo, Dena e tantos outros pela receptividade e risadas.

Aos funcionários da FEA-Unicamp pela compreensão, disponibilidade e auxílio em diversos momentos: Dora, Débora, Cosme, Marcão, Maquinhos, Nadeje, Jardete, Márcia e Bianca da Biblioteca, Rosi do Café da Fea.

Aos amigos da Casa F-7: A velha geração, Evandro, Koala, Black e principalmente ao amigo Theta, que foi sempre receptivo e paciente, deixo meu muito obrigado. A nova e transitória geração: Reginaldo (Japonês), Gustavo (Eistein), Gustavo (Mineiro), João. Esses sim são guerreiros, pois conviver comigo não é das tarefas mais fáceis.

Aos amigos da FEA e de Campinas: Léo, Paula Menezes, Camila Possari, Krébis, Alane, Renato, Fernando, Paulo, Marília, Junior, Curumin e tantos outros.

Aos meus amigos de Minas e do Espírito Santo: Clara, Gizelle, Michel, Vitor, Chico, Ana Sara, Cássio, Michele, Bernardo, Yuri, Lucas, Luiz, Rebecca, Topera, Tia Cida e vários outros que foram e são importantes pessoas que conheci antes de chegar até aqui.

Por fim, quero agradecer a todos que participaram direta ou indiretamente nessa jornada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xv
RESUMO GERAL	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Aroma	1
2. Processos Biotecnológicos para a obtenção de aromas	2
3. Compostos terpênicos.....	4
4. Referências	6
CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA	11
MONOTERPENOS: PROMISSORES SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS DE AROMA	11
1. Monoterpenos	13
2. Biossíntese de Monoterpenos.....	19
3. Monoterpenos como precursores de compostos de aroma	23
3.1 Biotransformação de limoneno em α -terpineol.....	25
3.2 Biotransformação de α -pineno em verbenona	27
.....	29
4. Conclusão	30
5. Referências	31
CAPÍTULO 2	49
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VERBENONA BIOTECNOLÓGICA UTILIZANDO LINHAGEM FÚNGICA <i>LBGM F6</i> ISOLADA DO ROMÃO (<i>Punica granatum</i>).....	49
PARTE 1.....	51
SCREENING DE LINHAGENS FÚNGICAS PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DE <i>R</i> -(+)-LIMONENO E <i>S</i> -(-)- α -PINENO.....	51
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Reagentes	52

2.2	Linhagens fúngicas utilizadas no Screening	53
2.3	Pré-inóculo	55
2.4	Inóculo	55
2.5	Processo de biotransformação	56
2.6	Estudo da influência da idade no inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do α -pineno	56
2.7	Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de produtos de oxidação do alfa-pineno pela linhagem fúngica LB GM F6	57
2.8	Identificação e quantificação dos produtos de Biotransformação	57
2.9	Planejamento Experimental e Estudo de Otimização do Processo Biotecnológico	58
2.10	Análise de Resultados	59
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1	Seleção de linhagens fungicas para a biotransformação de α -Pineno	60
3.2	Seleção de linhagens fungicas para biotransformação de R-(+)-limoneno .	60
3.3	Identificação e quantificação dos produtos de Biotransformação de α -pineno	60
3.4	Estudo da influência da idade no inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do α -pineno pela linhagem fúngica LB GM F6	63
3.5	Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do alfa-pineno pela linhagem LBGM F6	65
PARTE 2.		67
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE VERBENONA UTILIZANDO LINHAGEM DE FUNGO ENDOFÍTICO LBGM F6 ISOLADO DA ROMÃ (<i>Punica granatum</i>)		67
1.	Estudo de otimização	67
2.	Conclusão	75
3.	Referências	76
CAPÍTULO 3		81
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -TERPINEOL A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE R-(+)-LIMONENO POR LINHAGEM DE <i>BACILLUS TEQUILENSIS</i>		81
RESUMO		81

1. Introdução	83
2. Materiais e Métodos	84
2.1 Reagentes	84
2.2 Manutenção e crescimento da linhagem bacteriana.....	84
2.3 Identificação da linhagem por sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S	84
2.4 Preparo do biocatalisador bacteriano.....	85
2.5 Otimização da Produção de α-terpineol	86
2.6 Quantificação e identificação de α-terpineol	88
3. Resultados e Discussão	89
3.1 Identificação do micro-organismo.....	89
3.2 Otimização do processo de biotransformação.....	89
4. Conclusão	96
5. Referências	97
CONCLUSÃO GERAL	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de alguns Monoterpenos Acíclicos.	14
Figura 2. Estruturas químicas de alguns Monoterpenos Monocíclicos.	17
Figura 3. Estruturas químicas de alguns Monoterpenos Bicíclicos.	19
Figura 4. Biossíntese de Monoterpenos: Formação de isopentenil difosfato (IPP) e dimetialil Difosfato (DMAPP) via ácido mavelônico.	20
Figura 5. Biossíntese de Monoterpenos: Formação de geranyl difosfato (GPP) e formação de monoterpenos.	21
Figura 6. Transformações Químicas em Monoterpenos: Produtos de região-hidroxilação do limoneno	23
Figura 7. Transformações Químicas em Monoterpenos: Produtos de região-Oxidação de α -pineno	23
Figura 8. Oxidação regioseletiva de α -pineno em verbenol e verbenona.	29
Figura 9. Outros produtos de oxidação do α -pineno encontrados na literatura.	29
Figura 10. Cromatograma dos compostos produzidos a partir da biotransformação de α -pineno: I) Cis-verbenol; II) Mirtenol; III) Verbenona.	61
Figura 11. Espectro de Massas dos produtos de Oxidação do Alfa-Pineno: verbenol; mirtenol e verbenona (continua na próxima página).	62
Figura 12. Produção de verbenol, verbenona e mirtenol pela linhagem fúngica LBGMF6.	65
Figura 13. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).	72
Figura 14. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência do gene RNA ribossomal 16S da linhagem LB285JLB e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.	89
Figura 15. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens fúngicas utilizadas no screening de biotransformação de terpenos.	53
Tabela 2. Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional	58
Tabela 3. Matriz DCCR 24 e seus respectivos níveis codificados.	59
Tabela 4. Efeito da idade do inóculo na formação de produtos de oxidação de α -pineno.	64
Tabela 5. Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de produtos de oxidação de α -pineno.	66
Tabela 6. Resultados do DCCR para a resposta concentração de verbenona (g.L^{-1}).	68
Tabela 7. Mínimos quadrados e significância dos coeficientes de regressão dos parâmetros do modelo (96 horas de biotransformação).	69
Tabela 8. ANOVA do modelo quadrático	70
Tabela 9. Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional para Otimização da produção de α -terpineol.....	86
Tabela 10. Resultados do DCCR para a resposta Concentração de α -Terpineol em 72 horas de processo.....	87
Tabela 11. Mínimos quadrados e significância dos coeficientes de regressão dos parâmetros do modelo (72 horas de biotransformação).	90
Tabela 12. ANOVA do modelo quadrático.	91

RESUMO GERAL

A crescente demanda por processos que tenham impacto ambiental reduzido, rendimentos consideráveis e ainda custos minimizados recorrem à biotecnologia como uma ciência que pode tornar essa necessidade uma realidade. Processos biotecnológicos para a produção de compostos de interesse industrial como biocorantes, açúcares funcionais, biosurfactantes e biodiesel são uma tendência no meio científico e ganham destaque pela inovação, resultados e aplicações obtidos.

O apelo comercial dos produtos biotecnológicos é outro fator que influencia as pesquisas haja vista que esses produtos são considerados naturais e tem-se comprovado que muitos deles apresentam atividades biológicas relevantes. O aroma é um importante atributo dos alimentos e pode ser produzido via biotecnológica a partir de substratos de baixo custo. A utilização de resíduos agro-industriais com alto teor nesses substratos como, por exemplo, resíduos ricos em monoterpenos são de grande interesse na biotecnologia de produção de aromas. Além disso, a utilização de micro-organismos isolados de diferentes fontes como biocatalisadores na produção desses compostos é outra perspectiva, muito explorada e ainda desafiadora.

A biotransformação de monoterpenos para a produção de compostos de aroma é vantajosa quando comparada com a síntese química clássica. Contudo, alguns problemas ainda devem ser minimizados, como sensibilidade dos biocatalisadores à toxicidade dos substratos ou condições operacionais e baixos rendimentos. Assim, a seleção de novos biocatalisadores, como micro-organismos endofíticos, o uso de ferramentas de engenharia genética e a utilização de métodos estatísticos de otimização de processos são promissores e caracterizam-se como a nova vertente na área de bioaromas, contornando as desvantagens até então limitantes dos processos de biotransformação. Eles permitem em alguns casos, o aumento de escala e dessa forma a real aplicação da bioconversão microbiana na indústria.

Assim, trabalhos que visem selecionar novos biocatalisadores ainda é uma necessidade e quando aliados a otimização de processos podem fornecer caminhos para que os rendimentos da bioconversão de monoterpenos sejam aumentados. Nesse contexto, o presente trabalho visou selecionar micro-organismos com potencial para a bioconversão de

monoterpenos de baixo custo e presentes em grandes quantidades em resíduos agro-industriais, como α -pineno e *R*-(+)-limoneno, para a produção de compostos de aroma valorizados comercialmente, *S*-(-)-verbenona e α -terpineol.

O capítulo 1 reporta uma revisão sobre os compostos monoterpênicos, abordando suas características químico-estruturais, biossíntese e recentes aplicações terapêuticas, além do seu uso como substratos na biotecnologia de produção de compostos de aroma.

O capítulo 2 é dividido em duas partes: a parte I mostra os resultados de um *screening* realizado com 81 linhagens de fungos isolados de diferentes fontes, entre eles, fungos endofíticos, utilizados no estudo do potencial de biotransformação de *R*-(+)-limoneno e α -pineno. A parte II descreve a otimização do processo de produção de *S*-(-)-verbenona biotecnológica a partir de α -pineno por uma linhagem de fungo endofítico, ainda não identificado, isolado da romã (*Punica granatum*). O uso de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 4 variáveis proporcionou o estabelecimento de condições mais favoráveis ao processo, elevando a concentração de verbenona que era de 66 mg.L⁻¹ para aproximadamente 108 mg.L⁻¹ em um dos ensaios do DCCR e em torno de 98 mg.L⁻¹ no ensaio de validação.

O capítulo 3 aborda a otimização do processo biotecnológico de produção de α -terpineol a partir de *R*-(+)-limoneno pela linhagem *Bacillus tequilensis* isolada de resíduos de processamento de frutas cítricas. Após a otimização e validação do processo nas condições consideradas ótimas através da análise de superfícies de resposta, a concentração de α -terpineol passou de 25 mg.L⁻¹ para 85 mg.L⁻¹.

Portanto, os resultados obtidos no trabalho mostraram um ganho de rendimento nos processos de bioconversão de substratos monoterpênicos e que a otimização de processos é uma importante ferramenta para a melhoria das condições experimentais possibilitando trabalhos futuros que envolvam aumento de escala.

ABSTRACT

The growing demand for processes that reduce environmental impacts, have high yields and costs minimized uses biotechnology as a science that can make this need into a reality. Biotechnological processes for the production of industrial interesting compounds, such as biocolorant, functional sugars, biosurfactants and biodiesel, are a trend in the scientific field and are highlighted by innovation, application and results obtained. The commercial appeal of biotechnological products is another factor that stimulates researches since these products are considered natural and has been proven that many of them presents significant biological activities.

The flavor is an important attribute of food and can be produced through biotechnological processes from low-cost-substrates. The use of agro-industrial wastes with high content of these substrates, such as residues rich in monoterpenes, is of great interest in biotechnology. Furthermore, the use of micro-organisms isolated from several sources as biocatalysts in the production of flavor compounds is another well-explored and challenging perspective.

The biotransformation of terpenes for aroma compounds production is advantageous when compared with chemical synthesis. However, there are still some problems that must be minimized like biocatalysts sensitivity, toxicity of substrates and low yields. Thus, the selection of new biocatalysts, such as endophytic micro-organisms, use of genetic engineering and statistical methods for optimization of processes are promising and characterize a new perspective in bioaromas field. Thereby, works that search for new biocatalysts are necessary and associated with optimization processes can improve the monoterpenes bioconversion.

In this context, the objective of this work was the screening and selection of micro-organisms that are able to realize the biotransformation of low cost monoterpenes, α -pinene and limonene, into high-value aroma compounds, such as verbenone and α -terpineol.

The chapter 1 presents a current review on monoterpenes, showing their chemical characteristics, biosynthesis and recent therapeutic applications, besides their potential use as substrates for bioflavor production.

The chapter 2 is divided in two parts: the first one shows the results of the screening of 81 strains of fungi isolated from several sources, including endophytic strains, for biotransformation of limonene and α -pinene. The second part describes the optimization process for biotechnological verbenone production from α -pinene by a non-identified fungal strain, isolated from pomegranate (*Punica granatum*). The use of a central composite rotatable design (CCRD) of 4 variables provided the optimal conditions for this process, increasing the verbenone concentration from 66 mg.L⁻¹ to 108 mg.L⁻¹ in one of the CCRD assays and 98 mg.L⁻¹ after validation.

The chapter 3 also shows an optimization study, in this case using limonene as substrate and the product obtained was α -terpineol. The biocatalyst used was a bacterial strain, identified as *Bacillus tequilensis*, isolated from citrus fruit processing waste. After the optimization and validation in the best conditions obtained through the surface response analysis, the concentration of α -terpineol reached was 85 mg.L⁻¹.

Therefore, the results obtained in this work show an improve of the yields in the biotransformation of both monoterpenic substrates and that optimization of processes is an important tool for the progress of future works involving scale-up studies.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Aroma

O aroma é um relevante atributo dos produtos alimentícios, correlacionando-se diretamente com o sabor e tem grande influência na seleção, aceitação e ingestão dos produtos pelo consumidor (HORNSTEIN, 1966; FISHER & SCOTT, 1997).

Ampla variedade de compostos orgânicos está associada ao aroma, compreendendo compostos voláteis (individuais ou em misturas complexas em diferentes proporções) de inúmeras classes químicas, como aldeídos, álcoois, ésteres, ácidos carboxílicos de cadeia curta, compostos fenólicos e de enxofre, cetonas e lactonas, presentes em concentrações em níveis traço (ppm ou ppb) (LONGO & SANRÓMAN, 2006; D'ACAMPORA ZELLNER *et al.*, 2008).

A sensação de um aroma pode ser desencadeada por uma mistura complexa de moléculas ou em alguns casos pode resultar basicamente da ação de uma única substância, denominada composto de impacto, que ocorre em pequenas concentrações, detectadas pelas células receptoras específicas do epitélio olfatório, localizadas na cavidade nasal (BICAS, 2009; BERGER, 1995).

Os compostos de aroma são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos e no ano de 2012 a indústria de aromas e fragrâncias rendeu um montante estimado em aproximadamente 23 bilhões de dólares (LEFFINWELL & ASSOCIATES, 2013).

A obtenção em escala industrial de compostos de aroma é realizada principalmente pela síntese química e menos de 5% é resultante da extração de fontes naturais (XU; HUA; MA, 2007). Mesmo fornecendo rendimentos satisfatórios a síntese química de compostos de aroma apresenta desvantagens relativas às baixas região e enantiosseletividade das reações e da estereoquímica do produto, já que muitas vezes há a formação de racematos (BICAS *et al.*, 2009). Os produtos provenientes da síntese química são considerados

“artificiais” ou “idênticos aos naturais” o que atualmente tem influenciado negativamente o consumo de alimentos vinculados a esses ingredientes por se acreditar que os mesmos contenham resíduos de processamento ou possam ocasionar riscos à saúde.

A influência estereoquímica na síntese de compostos de aroma é evidente uma vez que enantiômeros ou regioisômeros podem apresentar diferentes propriedades sensoriais, como a *R*-(-)-carvona e seu isômero *S*-(+)-carvona, o *R*-(+)-limoneno e *S*-(-)-limoneno. Dessa forma, a síntese estereoespecífica, torna-se uma importante ferramenta do ponto de vista industrial permitindo reações direcionadas a um único produto (BRENNAN *et al.*, 2003).

Já a obtenção de aromas de fontes naturais apresenta a dependência da sazonalidade e fatores climáticos que influenciam de forma determinante na produção dos compostos do metabolismo secundário das plantas, incluindo os compostos de aroma (BICAS *et al.*, 2009). A grande quantidade de matéria-prima requerida na extração para que concentrações razoáveis sejam obtidas se destaca como outra desvantagem, gerando dessa forma problemas ecológicos como o aumento do extrativismo. Outra desvantagem está relacionada aos custos do processo de extração e o uso, na sua maioria, de solventes orgânicos aumentando dessa maneira a carga residual gerada no processamento (WELSH, 1994; BICAS, 2009; MARÓSTICA JR. & PASTORE, 2006).

Nesse contexto, tem se buscado formas alternativas e novos métodos que possuam menor impacto sobre o meio ambiente, que forneçam maior seletividade na formação de produtos, maior valor mercadológico além de maior aceitabilidade por parte dos consumidores.

2. Processos Biotecnológicos para a obtenção de aromas

A produção biotecnológica de aromas tem ganhado destaque e tornou-se promissora por viabilizar a formação de compostos considerados “naturais” (GIRI *et al.*, 2001). Trata-se de um processo ambientalmente viável quando comparado com a síntese química ou extração de fontes naturais, uma vez que tem impacto ambiental reduzido e possui baixo nível de resíduos, reduzido número de etapas, elevada régio- e enantiosseletividade e

condições reacionais brandas caracterizando-se como um processo altamente sustentável e de acordo com os princípios da “Química Verde”(JANSSENS *et al.*, 1992; KRINGS & BERGER, 1998; LEUENBERGER, 1990; SERRA *et al.*, 2005; ANASTAS & WARNER, 1998).

Os métodos biotecnológicos para a produção de aromas incluem a síntese *de novo* e a biotransformação, ambos podendo estar acompanhados de ferramentas de engenharia genética para que vias metabólicas envolvidas na biossíntese de produtos ou de enzimas determinantes na biocatálise sejam elucidadas e ainda que modificações genéticas possam ser feitas no intuito de melhorar o processo global: a produção do composto de interesse.

Bharti *et al.* (2011) define biotransformações como reações orgânicas que utilizam catalisadores biológicos, que podem ser células integras ou enzimas, em variadas condições. Diversas enzimas utilizadas no processo de biotransformação podem ser provenientes tanto de cultura de células vegetais quanto de micro-organismos, podendo mediar diversos tipos de reações como hidrólise, hidroxilação, metilação, acetilação, oxidação, glicosilação, hidrogenação, isomerização e esterificação de diversos substratos exógenos (SUGA; HIRATA, 1990; GIRI *et al.*, 2001; ISHIHARA *et al.*, 2003). Trata-se, portanto de uma importante estratégia de modificação de compostos orgânicos, entre eles os produtos naturais, de significativa seletividade (RIVA, 2001).

Acompanhando a tendência de valorização mercadológica de aromas “naturais” as agências reguladoras em todo o mundo tem buscado definir por meio de legislações específicas quais os critérios para que um composto de aroma tenha essa denominação, dessa forma, em termos gerais, define-se como “aroma natural” aquele composto que é obtido por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes e o composto obtido deve ser idêntico ao já existente na natureza (BRASIL, 1999; DEMYTTENAERE, 2001; SERRA *et al.*, 2005).

Outro fator que corrobora para a ascensão e interesse nos processos biotecnológicos para a produção de aromas, consiste na possibilidade de utilização de resíduos industriais como fonte de nutrientes ou com altas concentrações de substratos para a biotransformação, como por exemplo, resíduos ricos em compostos terpênicos e carotenóides produzidos nas

cadeias de processamento de frutas e vegetais (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001; MATTEWS; BRADDOCK, 1987; YOO *et al.*, 2001; LEE; SCHIMIDT-DANNET, 2002; KIM *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2000; MAROSTICA JR.; PASTORE, 2007; BICAS; DIONISIO; PASTORE, 2009).

Desta forma, o aproveitamento de resíduos do processamento de alimentos representa uma alternativa à obtenção de insumos para a indústria química, farmacêutica e cosmética, permitindo a obtenção de interessantes produtos da carga residual da agroindústria além de contribuir positivamente para a redução de problemas ambientais uma vez que estaria associada ao reaproveitamento de resíduos que até então seriam apenas descartados no meio ambiente (MAROSTICA JR.; PASTORE, 2007).

Processos utilizando micro-organismos torna economicamente viável a utilização desses resíduos como substratos para a conversão ou para o crescimento de biomassa, fortalecendo conceitos de minimização, recuperação e aproveitamento de subprodutos que são interessantes e necessários nas cadeias agroindustriais.

Os micro-organismos utilizados para a produção de aromas podem ser fungos, bactérias e leveduras oriundos de diversas fontes como, por exemplo, solo, resíduos agroindustriais, frutos exóticos, sementes e atualmente tem-se dado especial importância aos micro-organismos endófitos, pois são potenciais fontes de produtos naturais de interesse na medicina, agricultura e indústria (BICAS, 2009; PIMENTEL, 2012; MOLINA *et al.*, 2013; STROBEL *et al.*, 2004; ABRAHÃO *et al.*, 2013).

Assim a produção de aromas por via biotecnológica encontra-se em desenvolvimento, requerendo mais estudos que possam aperfeiçoar o processo visando maiores rendimentos e contornando desvantagens como insolubilidade dos materiais de partida, elevada volatilidade e inibição microbiana pelo substrato.

3. Compostos terpênicos

Os terpenos, hidrocarbonetos insaturados derivados de unidades de isopreno, são metabólitos secundários das plantas, exercem a função de defesa contra insetos e micro-organismos. Além disso, estão associados às características odoríferas e de atração de

agentes polinizadores e são extensivamente usados na indústria de fragrâncias e aromas (LANGENHEIM, 1994; BOUWMEESTER *et al.*, 1998; BICAS *et al.*, 2008).

Os compostos terpênicos podem ser classificados quanto ao número de carbonos presentes, como monoterpenóides (dez carbonos), sesquiterpenóides (quinze carbonos), diterpenóides (vinte carbonos), triterpenóides (trinta carbonos) e tetraterpenóides ou carotenóides (quarenta carbonos) (RUZICKA, 1953). Estes compostos são encontrados em grande quantidade em óleos essenciais, cujo aroma é atribuído principalmente aos mono e sesquiterpenos (os terpenos mais voláteis) presentes em sua composição (TEISSEIRE, 1994). Na maioria dos casos, o odor característico e agradável de frutas, ervas e especiarias são resultantes dos terpenos voláteis (KRINGS *et al.*, 2006).

A modificação estrutural dos terpenos, como a hidrogenação seletiva, resulta em moléculas que servem como material de partida para a produção de compostos químicos usados em produtos farmacêuticos, agrotóxicos e indústrias de perfume (MEYLEMANS; QUINTANA; HARVEY, 2012). No entanto, a transformação seletiva torna-se difícil, havendo a necessidade da utilização de catalisadores químicos de alto custo, como platina e paládio associado a condições reacionais específicas (BOGEL-LUKASIK; BOGEL-LUKASIK; DA PONTE, 2009). Assim, processos que tenham condições reacionais mais brandas e de menor custo são interessantes do ponto de vista industrial para a modificação de compostos terpênicos.

Portanto, o objetivo geral desse trabalho é o *screening* do potencial de biotransformação de compostos terpênicos em compostos de aroma por micro-organismos e otimização dos processos biotecnológicos das linhagens promissoras.

Os objetivos específicos são o *Screening* de 81 linhagens de fungos e uma linhagem de bactéria pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas capazes de biotransformar *R*-(+)- limoneno e *S*-(-)- α -pineno.

Realização de um estudo de otimização com as linhagens de micro-organismos que demonstrem maior potencial na produção de α -terpineol e verbenona dentre as testadas no *screening*.

4. Referências

- ABRAHÃO, M.R.E.; MOLINA, G.; PASTORE, G.M. Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Research International*, v.52, p.367-372, 2013.
- ANASTAS, P.T.; WARNER, J. "Green Chemistry: Theory and Practice" v.1, p.156, Oxford Univ. Press, UK, 1998.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.
- BERGER, R. G. *Aroma Biotechnology*. Springer .Berlin, 1995.
- BHARTI, A. A. L. N.; GUPTA, R. K. Biotransformation of curcumin to vanillin. *Indian Journal of Chemistry*, 50B, 1119–1122, 2011.
- BICAS, J.L.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; GODOY, H.T.; PASTORE, G.M. Optimization of R-(+)-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1061-1070, 2008.
- BICAS, J.L.; DIONISIO, A.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. *Chemical Reviews*, v. 109, p. 4518-4531, 2009.
- BICAS, J.L. Estudos de obtenção de compostos de aroma pela biotransformação de compostos terpênicos. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- BOGEL-LUKASIK, E.; BOGEL-LUKASIK, R.; DA PONTE, M.N. Pt- and Pd- catalysed limonene hydrogenation in high-density carbon dioxide. *Monatsh Chem*. v.140, pp.1361-1369, 2009.
- BOUWMEESTER, H.J.; GERSHENZON, J.; KONINGS, M.C.J.M.; CROTEAU, R. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit caraway- I.

Demonstration of enzyme activities and their changes with development. *Plant Physiology*. v.117, p.901-912, 1998.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº104, de 14 de maio de 1999. 1999

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S.; BAUDELAIRE, C.; FLEURS, L. Enantioselective perception of chiral odorants. , v. 14, n. 54, p. 1-42, 2003.

D'ACAMPORA ZELLNER, B.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *Journal of chromatography. A*, v. 1186, n. 1-2, p. 123-43, 2008.

DEMYTTENAERE, J.C.R. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. In: RAHMAN, A(Ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. London: Elsevier, 2001.

FISHER,C.; SCOTT, T.R. *Food Flavours- Biology and Chemistry*.Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1997.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*. v.19, p.175-199, 2001.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, v.19, p.175-199, 2001.

HORNSTEIN, I. *Flavor Chemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, 1966.

ISHIHARA, K.; HAMADA, H.; HIRATA, T.; NAKAJIMA, N. Biotransformations using plant cultured cells. Review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 23, p. 145-170, 2003.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E.J. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*. v.27, p.195-215, 1992.

KIM, Y.; GIRAUD, D.W.; DRISKELL, J.A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. v.20, p.458-465, 2007.

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

KRINGS, U.; HARDEBUSCH, B.; ALBERT, D.; BERGER, R.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Odor-active Alcohols From the Fungal Transformation of α -Farnesene. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p. 9079-9084, 2006.

LANGENHEIM, J.H. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, p.1223-1280,1994.

LEE, P.C; SCHIMIDT-DANNERT,C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.80,p. 1-11, 2002.

LEFFINWELL & ASSOCIATES. 2008-2012 Flavor & Fragrance Industry Leader (Estimated Sales Volume in Millions). 2013. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com/top_10.htm>> .Acessado em 08 de out de 2013.

LEUENBERGER, H.G.W. Biotransformation- A useful tool in organic chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. v.62, p.753-768, 1990.

LONGO, M.; SANROMÁN, M.A. Production of Food Aroma Compounds. *Food Technology and Biotechnology*.v.44, p.335-353, 2006.

MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformation of Citronellol in Rose-Oxide Using Cassava Wastewater as a Medium. *Ciência e tecnologia de alimentos*, n. 3, p. 690-696, 2006.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from Orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Science*. v.101, p.345-350, 2007.

MATTHEWS, R.F.; BRADDOCK R.J. – Recovery and Application of Essential Oils from Oranges. Food Technology, v. 41, n. 1, p. 57-61, 1987.

MEYLEMANS, H.A.; QUINTANA, R.L.; HARVEY, B.G. Efficient conversion of pure and mixed terpene feedstocks to high density fuels. Fuel. v.97, pp.560-568, 2012.

MOLINA, G.; PINHEIRO, D.M.; PIMENTEL, M.R.; SANTOS, R.; PASTORE, G.M. Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits. Food Sci. Biotechnol..v.22, p.999-1006, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I. Sugarcane bagasse. Bioresource Technology. v.74, p.69-80, 2000.

PIMENTEL, M.R. Produção de compostos de aroma a partir da biotransformação de monoterpenos por Pseudomonas. Dissertação(Mestrado em Ciência de Alimentos)-Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RIVA, S. Biocatalytic modification of natural products. Current Opinion in Chemical Biology, v.5, p.106-111, 2001.

RUZICKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia, v. 50, p. 395-405, 1953.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNAN, E. Biocatalytic Preparation of Natural Flavours and Fragrances. Trends in Biotechnology, v. 23, p. 193-198, 2005.

STROBEL, G.A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUGA, T.; HIRATA, T. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. Phytochemistry, v.29, p. 2393-2406, 1990.

TEISSEIRE, P. J. Chemistry of Fragrant Substances. Translated by Peter A. Cadby. New York: VCH Publishers, 1994.

WELSH, F. W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: GABELMAN, A. (Ed.) Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients. New York: John Wiley & Sons, 1994.

XU, P.; HUA, D.; MA, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. Trends in biotechnology, v. 25, n. 12, p. 571-6, 2007.

YOO, S. K.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of α - and β -Pinene by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. Process Biochemistry, v. 36, p. 925-932, 2001.

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

MONOTERPENOS: PROMISSORES SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS DE AROMA

Bruno Nicolau Paulino¹, Gláucia Maria Pastore¹

¹ Laboratório de Bioaromas, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato nº 80, CEP 13083-862, Campinas, São Paulo.

RESUMO

Os monoterpenos são compostos orgânicos constituídos de duas unidades de isopreno, amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da composição do óleo essencial de diversas plantas. Desempenham funções de proteção e de atração de agentes polinizadores além de apresentar relevantes atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, como atividades antitumoral, antimicrobiana, anti-noceptiva e antioxidante. Alguns monoterpenóides (monoterpenos oxidados) são compostos de aroma de grande valor comercial e que tem encontrado na biotecnologia a possibilidade para a sua produção de forma “natural”. A biotransformação permite a utilização de resíduos agro-industriais ricos em monoterpnos como substratos para a produção de compostos de aroma como α -terpineol e verbenona. Contudo, é necessária a utilização de estratégias para a melhoria de rendimentos e que possibilitem contornar algumas desvantagens desse processo, como a seleção de novos micro-organismos aptos à bioconversão, otimização de processos e engenharia genética. Portanto, o potencial dos monoterpenos como substratos para biotransformação é promissor, pois abre novas possibilidades para a aquisição de compostos bioativos por meio do aproveitamento de resíduos, aliando conceitos de produção de compostos “naturais”, minimização de custos e impacto ambiental reduzido.

1. Monoterpenos

Os monoterpenos compreendem a classe de hidrocarbonetos naturais de cadeia ramificada que apresentam dez carbonos em sua estrutura, formados a partir de duas unidades isopreno. Além disso, juntamente com seus derivados oxigenados, conhecidos como monoterpenóides, são responsáveis por agradáveis aromas de plantas e frutos. (VAN DER WERF *et al.*, 1997). Eles são largamente distribuídos na natureza e mais de 400 monoterpenos naturais diferentes foram identificados (DEVON & SCOTT, 1972). São produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e possuem funções quimioatratórias para agentes polinizadores ou quimiorrepelentes contra micro-organismos e insetos (McGARVEY & CROTEAU, 1995; GERSHENZON & DUDAREVA, 2007). A maioria das plantas produtoras de monoterpenóides pertence às famílias *Coniferae* e *Myrtaceae* e ao gênero *Citrus* (GUENTHER *et al.*, 1996).

Os monoterpenos podem ser classificados como acíclicos (Figura 1), monocíclicos (Figura 2) e bicíclicos (Figura 3) de acordo com o tipo de estrutura química que apresentam (EVANS, 1996; BICAS; DIONISIO; PASTORE, 2009).

Entre os monoterpenos acíclicos, um dos mais conhecidos e estudados é o citrionelol (**2**), composto de grande interesse industrial responsável por notas de aroma floral e presente em inúmeros óleos essenciais de plantas aromáticas (SHRADER, 2007; RAO *et al.*, 2004). É encontrado sob duas formas isoméricas: o *R*-(+)-citrionelol é um constituinte comum em óleos essenciais de plantas como *Rutaceae* e o *S*-(-)-citrionelol, é tipicamente encontrado no óleo de citrionela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (DE SOUSA *et al.*, 2006). Algumas atividades biológicas, entre elas, atividade antibacteriana, antifúngica, larvicida, repelente e anticonvulsivante tem sido atribuídas ao citrionelol (KUBO; MUROI; KUBO, 1993; VIOLLOL & CHAUMONT, 1994; HIERRO *et al.*, 2004; PAWAR *et al.*, 1991; DE SOUSA *et al.*, 2006).

O citrionelol é um interessante substrato monoterpênico para a biotransformação microbiana sendo possível sua conversão em óxido de rosa (**14**), composto de aroma de grande valor comercial (DEMYTTENAERE, VANOVERSCHelde; DE KIMPE, 2004; MARÓSTICA JR. & PASTORE, 2006).

Outros monoterpenos acíclicos como geraniol (4) e linalol (9) também apresentam atividades biológicas como anticâncer, antimicrobiana, pesticida, antioxidante, anti-inflamatória e anti-noceptiva (CARNESECCHI *et al.*, 2004; TOGASHI *et al.*, 2008; BARNARD & XUE, 2004; CHEN & VILJOEN, 2010; PEANA *et al.*, 2002; PEANA *et al.*, 2003).

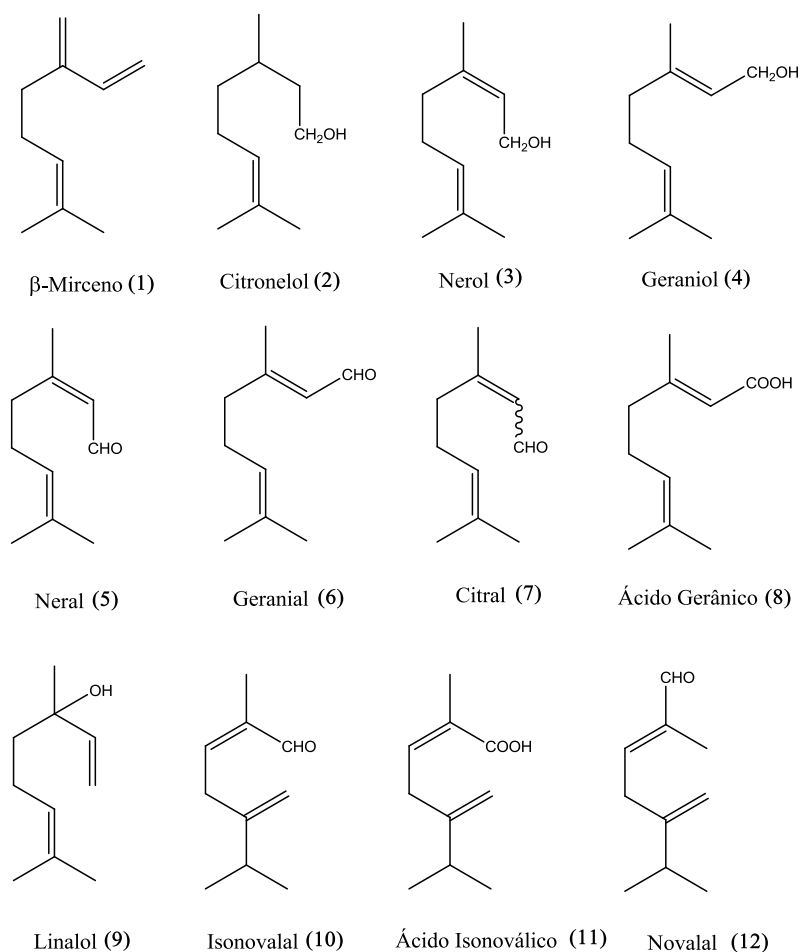


Figura 1. Estruturas químicas de alguns monoterpenos acíclicos.

Recentemente, foi descrita a atividade antiproliferativa *in vitro* do geraniol (4) em combinação com o fármaco sinvastatina em linhagens de células de hepatocarcinoma humano HepG2 (POLO *et al.*, 2011). Nesse estudo, verificou-se além do efeito sinérgico da combinação desses dois compostos para inibição da linhagem celular HepG2, como para a inibição da biossíntese de colesterol, demonstrando uma possível abordagem para a aplicação frente a doenças como o câncer e doenças cardiovasculares. Nessa perspectiva,

outro estudo descreveu potente ação anti-inflamatória, anti-angiogênica, antiproliferativa e propriedades indutoras de apoptose frente a carcinogênese bucal experimental induzida por DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno) em hamsters (VINOTHKUMA et al., 2012).

Galle *et al.* (2014) comprovaram a ação inibitória do geraniol (**4**) na via do mevalonato, que está relacionada a eficácia desse monoterpene contra a proliferação e aumento da apoptose da linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão em modelo *in vivo*, além da não toxicidade nos animais do estudo, corroborando portanto para a confirmação da efetiva atividade antitumoral e caracterização do geraniol como potencial candidato para a quimioterapia do câncer (GALLE *et al.*, 2014).

O linalol (**9**) é um monoterpene acíclico encontrado em óleos essenciais de canela, hortelã e frutas cítricas, que tem sido usado como fragrância na indústria de cosméticos (LINCK *et al.*, 2010; HUO *et al.*, 2013). Quanto as atividades biológicas, esse composto apresenta grande ação anti-inflamatória, antiolesterogênica e anti-tumoral, além de recentes pesquisas que comprovaram propriedades sedativas, efeitos sobre a ansiedade e agressividade em modelos animais submetidos a inalação (aromaterapia) de linalol (HUO *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014c; KLADNIEW *et al.*, 2014; MIYASHITA & SADZUKA, 2013; LINCK *et al.*, 2010).

Entre os terpenos monocíclicos, o timol (2-isopropil-5-metilfenol) (**13**), composto presente em *Thymus vulgaris* e *Monarda punctata*, tem sido amplamente utilizado na medicina devido as suas propriedades antimicrobianas, ação antisséptica e muitos estudos descrevem também ação antioxidante, antiespasmódica, anti-agregante plaquetário e efeitos anti-inflamatórios (AESCHBACH *et al.*, 1994; SHAPIRO & GUGGENHEIM, 1995; WEI *et al.*, 2014; GAVLIAKOVA *et al.*, 2013; OKAZAKI; KAWAZOE; TAKAISHI, 2002; FACHINI-QUEIROS *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014).

O α -felandreno (5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno) (**20**), composto presente nos óleos essenciais de *Curcuma zedoaria* Christm., *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus dives* Schauer, *Zingiber officinale* Roscoe, apresenta atividade analgésica, anti-noceptiva e anti-inflamatória, estimulante da resposta imune e recentemente foi comprovada a atividade anti-hiperalgésica e antidepressiva do α -felandreno em estudos *in vivo* (SINGH; SINGH;

MAURYA, 2002; NAPOLI; CURCURUTO; RUBERTO, 2010; GILLES *et al.*, 2010; VENDRUSCOLO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013; PICCINELLI *et al.*, 2014).

De todos os monoterpenos monocíclicos, os derivados perílicos do limoneno (**17**) merecem destaque pelas suas notáveis atividades antitumorais. O álcool perílico (p-metha 1,8-diene-7-ol) (**25**), encontrado em óleos essenciais de limão, lavanda, capim-limão, hortelã, sálvia, sementes de aipo, gengibre e cerejas é o que mais tem despertado interesse em pesquisas em todo mundo, uma vez que sua atividade antitumoral é descrita como a mais potente entre os monoterpenóides, sendo considerado um forte candidato para o tratamento de diversos tipos de câncer (McGARVEY & CROTEAU, 1995; IMAMURA *et al.*, 2014). Apresenta grande potencial na atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (YURI *et al.*, 2004; DA FONSECA *et al.*, 2006a, 2006b e 2007; MATOS *et al.*, 2008). É considerado relativamente seguro em termos de toxicidade e apresenta também efeito radiosensibilizador e significativa inibição angiogênica (EZENNIA *et al.*, 1997; IMAMURA *et al.*, 2014; RAJESH *et al.*, 2003; LOUTARI *et al.*, 2004). A inibição de enzimas como a farnesil-transferase e geranilgeranil-transferase, enzimas-chave que induzem alterações conformacionais e funcionais em pequenas proteínas G para realizar a produção de sinal para a proliferação celular parece ser o mecanismo mais provável para a ação antitumoral do álcool perílico (SHI & GOULD, 2002; BASSI *et al.*, 2005; DA FONSECA *et al.*, 2008).

Estudos de fase I para tratamento de tumores sólidos refratários foram relatados utilizando o álcool perílico (**25**) como agente terapêutico (RIPLLE *et al.*, 1998; HUDES *et al.*, 2000). Além disso, ensaios de fase II foram realizados no câncer de ovário, câncer de próstata e de cólon metastático (LIU *et al.*, 2003; BAILEY *et al.*, 2002; MEADOWS *et al.*, 2002). Recentemente, um estudo conduzido por Da Fosenca *et al.* (2011) também mostrou que a administração intranasal de álcool perílico (440 mg/ dia) aumentou a sobrevida de pacientes com glioblastoma.

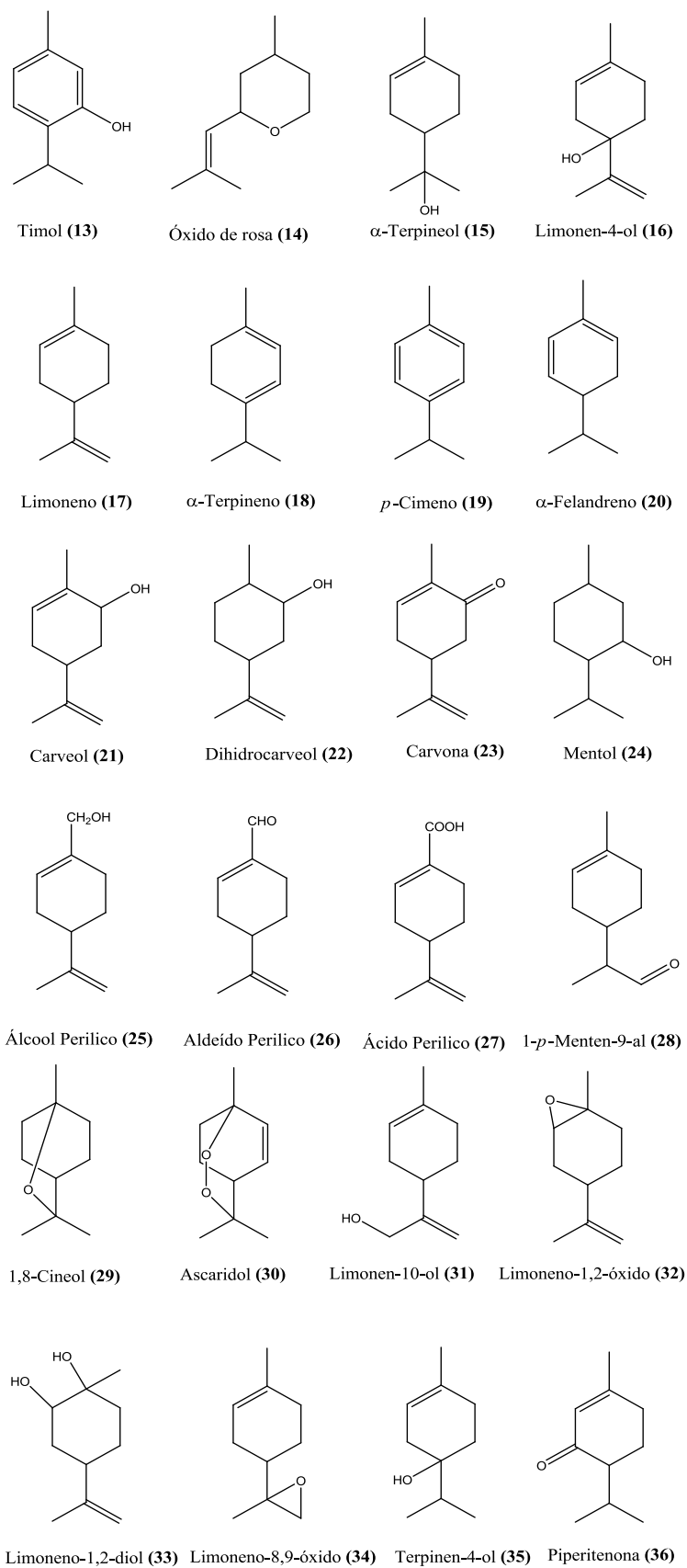


Figura 2. Estruturas químicas de alguns monoterpenos monocíclicos.

Os monoterpenos bicíclicos também são alvo de diversos estudos visando a avaliação das suas potenciais atividades biológicas, entre eles, o borneol (**48**), composto volátil encontrado nos óleos essenciais de várias espécies de *Artemisia*, *Dipterocarpaceae*, *Matricaria chamomilla*, *Valeriana officinalis* e *Lavandula officinalis* demonstrou atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, propriedades sedativas relacionadas à possível ação sobre a receptores GABA_A e efeitos protetores contra lesão isquêmica cerebral (JUHAS *et al.*, 2008; KORDALI *et al.*, 2005; SLAMENOVÁ *et al.*, 2009; GRANGER *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011).

Estudos recentes têm comprovado a capacidade do borneol em melhorar aspectos farmacocinéticos de alguns fármacos, como absorção na pele, córnea, mucosas nasal e do trato gastrointestinal e de distribuição no sistema nervoso central, associado a efeitos positivos quanto a aumento da passagem dessas drogas pela barreira hemato-encefálica e aumento da distribuição no tecido cerebral (QI *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2011; CAI *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2013).

Wu *et al.* (2014a) demonstraram em estudos *in vivo* a capacidade do borneol natural em inibir o metabolismo e eliminação de nimodipina, um bloqueador do canal de cálcio utilizado na terapêutica de doenças isquêmicas. Além disso, houve um aumento da distribuição desse fármaco no tecido cerebral dos animais utilizados no estudo (WU *et al.*, 2014a). Em outro estudo, foi observado o efeito sinérgico do borneol com o agente neuroprotetor edaravona em modelo de acidente vascular cerebral isquêmico em ratos (WU *et al.*, 2014b).

O mirtenol (**51**), um álcool monoterpênico bicíclico, é encontrado como um dos principais componentes no óleo essencial de *Myrtus communis* L., *Artemisia annua* e *Anthemis melampodina* e possui atividades antifúngica, antibacteriana, anticâncer, antioxidante, efeitos hipotensivos e ansiolíticos (BHAKUNI *et al.*, 2001; GRACE, 2002; LEPOITTEVIN *et al.*, 2011; EVSTATIEVA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2014).

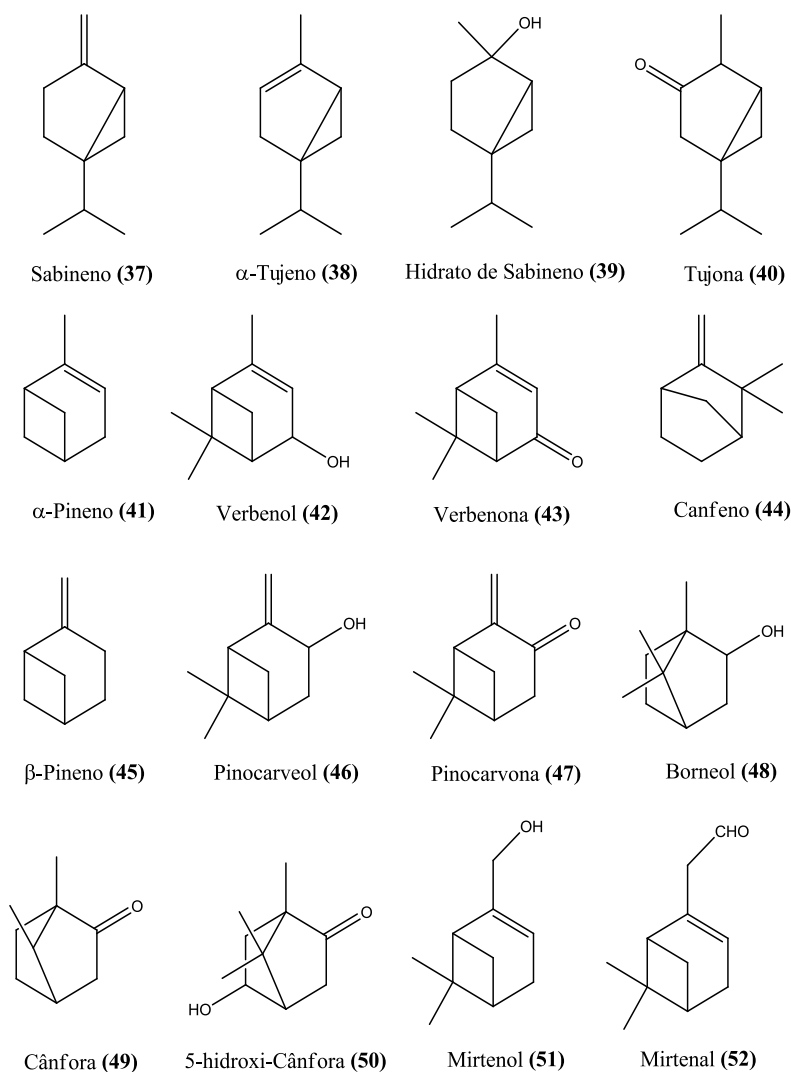


Figura 3. Estruturas químicas de alguns Monoterpenos Bicíclicos.

2. Biossíntese de Monoterpenos

Todos os compostos terpenóides são biossintetizados a partir do isopentenil difosfato (59) (IPP) que pode ser obtido tanto pela via do ácido mevalônico (56) quanto da via piruvato/gliceraldeído-3-fosfato. É proposto que há a ocorrência tanto da molécula de IPP como do seu isômero dimetilalil difosfato (60) (DMAPP) através da isomerização reversível do IPP pela IPP isomerase. A condensação de uma molécula de IPP com uma molécula de DMAPP gera um intermediário de dez carbonos denominado geranil difosfato

(61) (GPP), que é considerado o precursor dos monoterpenos (HORNSTEIN, 1966) (Figuras 4 e 5).

A biossíntese de monoterpenos envolve diversas reações catalisadas por enzimas que são denominadas coletivamente de monoterpeno-sintases que estão envolvidas na transformação do GPP em intermediários de diferentes tipos de esqueletos de monoterpênicos, podendo esses ser acíclicos, cíclicos e bicíclicos (HORNSTEIN,1966). Outras reações podem ocorrer sequencialmente para a formação de derivados monoterpenóides, como, por exemplo, reações de oxidação, que dependendo da regiosseletividade das enzimas envolvidas podem gerar diferentes compostos com propriedades biológicas diferentes.

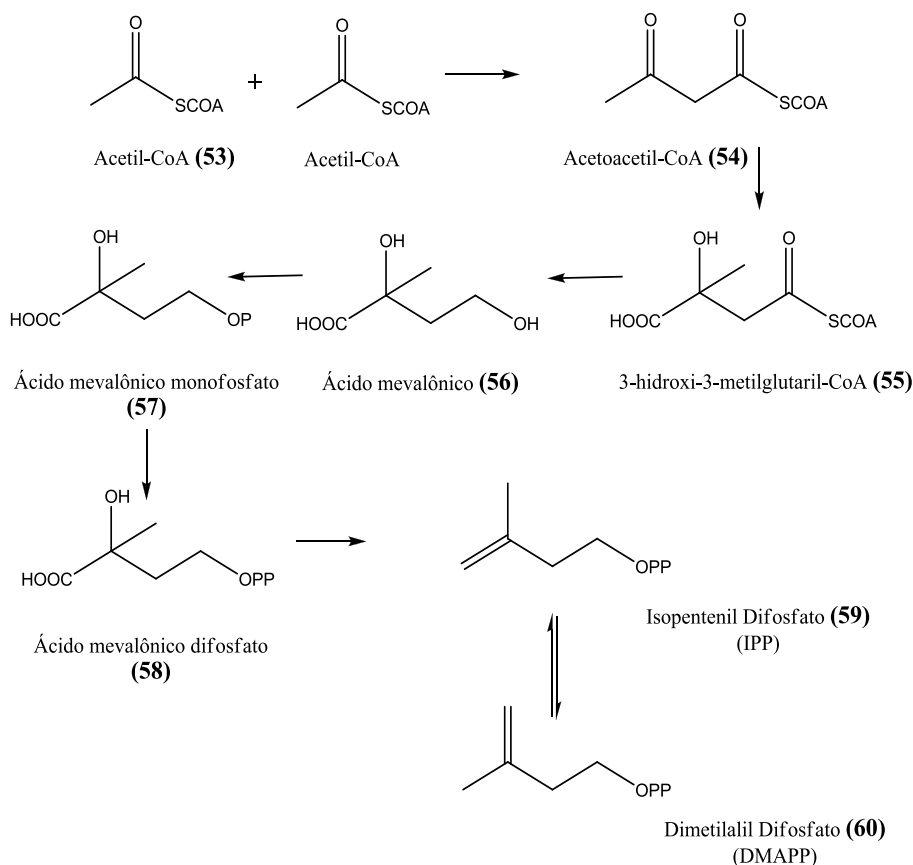


Figura 4. Biossíntese de monoterpenos: Formação de isopentenil difosfato (IPP) e dimetialil difosfato (DMAPP) via ácido mavelônico.

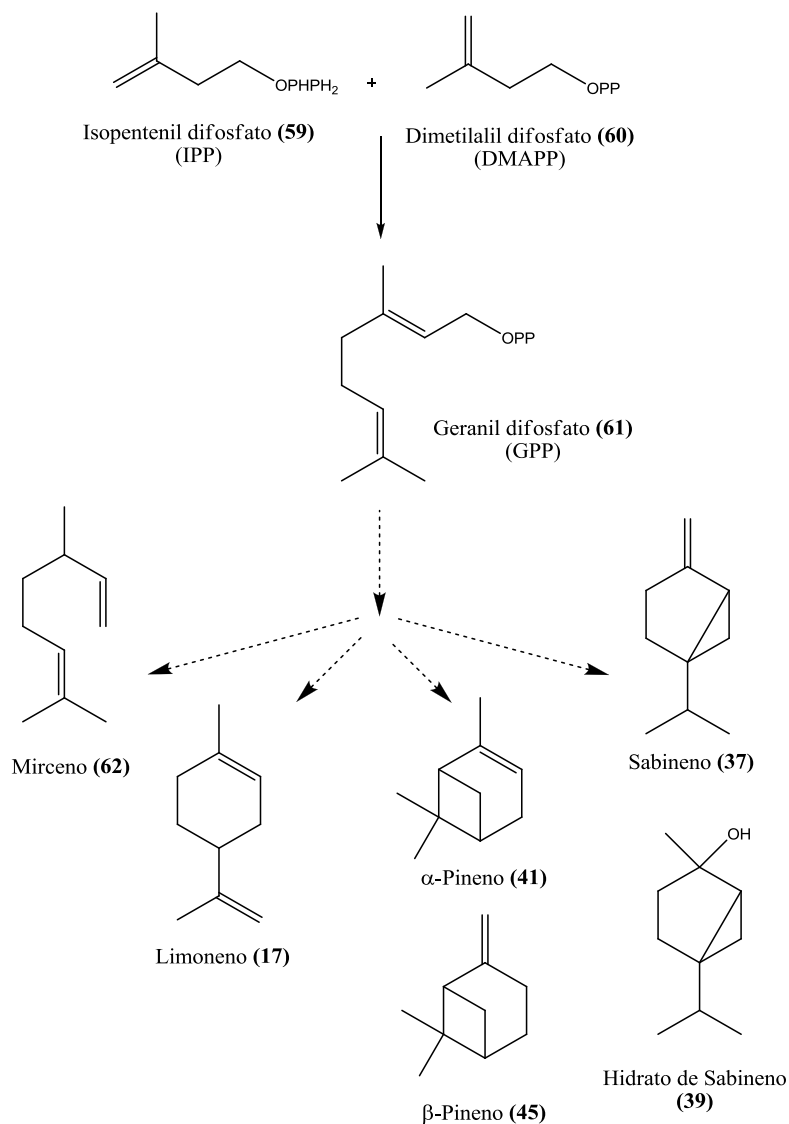


Figura 5. Biossíntese de Monoterpenos: Formação de geranil difosfato (GPP) e formação de monoterpenos.

A oxidação do limoneno pode levar a formação de inúmeros derivados, que podem apresentar atividades biológicas interessantes e propriedades sensoriais atraentes, despertando o interesse da comunidade científica na utilização do limoneno como substrato para a produção desses compostos (Figura 6). A formação de isopiperitenol, composto de aroma presente na *Mentha aquatic* L., ocorre quando a posição 3 do anel de seis membros sofre reação de hidroxilação, em contrapartida a formação de α -terpineol, a reação de hidroxilação se dá na posição 8 (Figura 6) (LUPIEN *et al.*, 1999; MARÓSTICA JR., 2006).

A oxidação de α -pineno também pode gerar diferentes intermediários dependendo da posição da cadeia carbônica que sofrerá a reação. A formação de verbenol e posteriormente verbenona ocorrerá quando a posição 4 do biciclo sofrer oxidação. Se essa reação ocorrer na metila do carbono 10 haverá a formação de mirtenol, outro composto monoterpênico utilizado na indústria de cosméticos e fragrâncias (Figura 7) (BHATIA *et al.*, 2008).

Os monoterpenos são encontrados como componentes do óleo essencial de muitas plantas aromáticas (XIE *et al.*, 2014). Alguns desses monoterpenos podem estar associados com a atração de agentes polinizadores, na defesa da planta contra diversos tipos de parasitas como insetos ou suas larvas, fungos e bactérias (HORNSTEIN, 1966; SANTOS *et al.*, 2011; MAREI *et al.*, 2012; CANTORE *et al.*, 2009). Dessa maneira, os monoterpenos podem ser utilizados como agentes alternativos para o controle de pragas ou para o desenvolvimento de novos inseticidas devido as varias vantagens que apresentam, como a segurança, efetividade e o fato de serem totalmente biodegradáveis (XIE *et al.*, 2014).

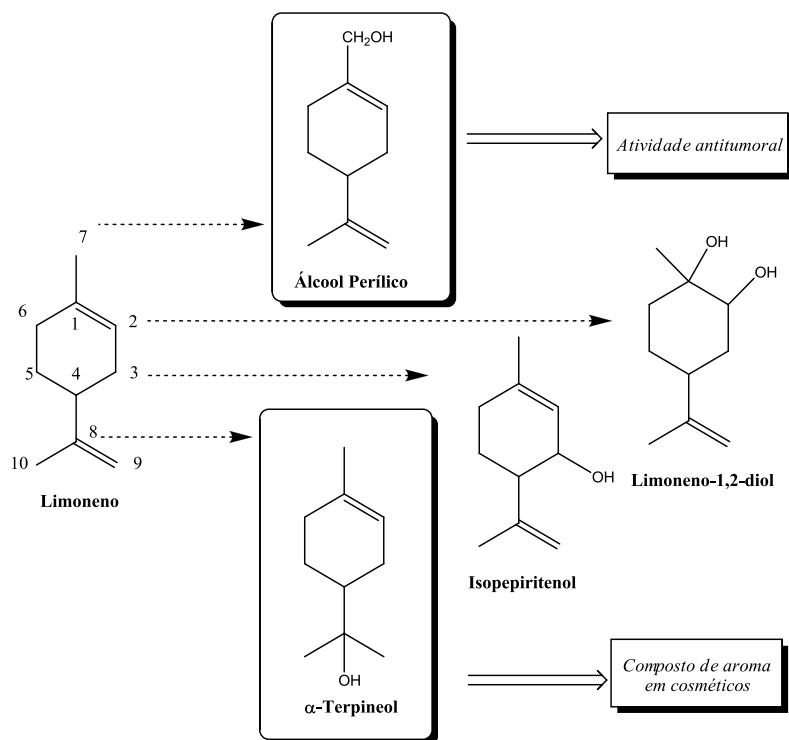


Figura 6. Transformações químicas em monoterpenos: Produtos de régio-hidroxiilação do limoneno.

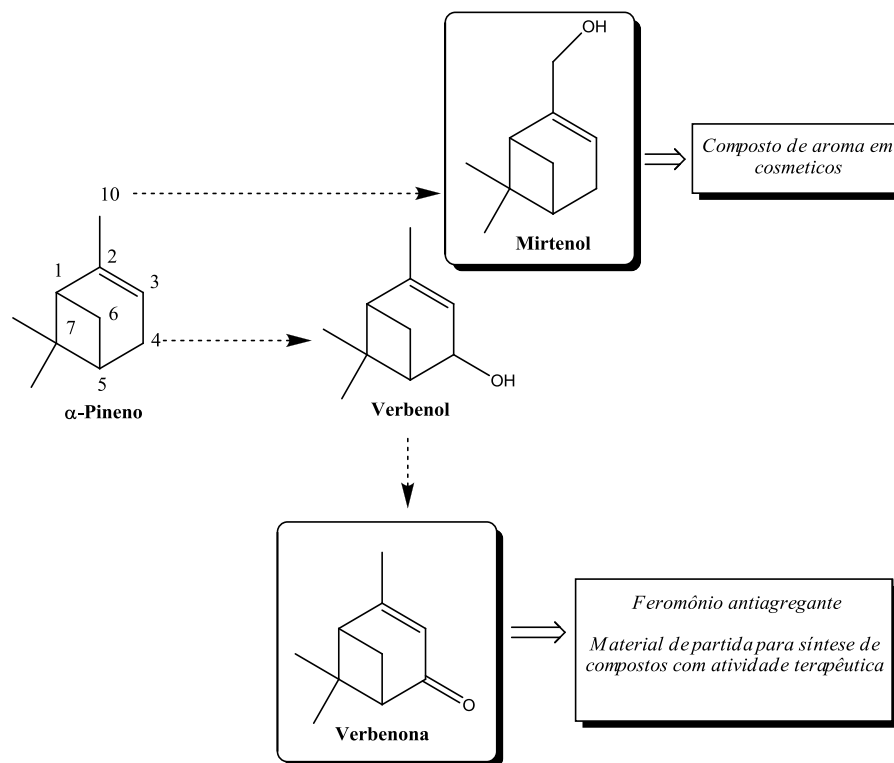


Figura 7. Transformações químicas em monoterpenos: Produtos de régio-Oxidação de α -pineno.

3. Monoterpenos como precursores de compostos de aroma

Os compostos terpênicos ocorrem amplamente na natureza e são obtidos em larga escala em resíduos industriais (ROTTAVA, 2010). O (*R*)-(+)-limoneno, monoterpeno mais abundante na natureza, é o constituinte majoritário de óleos essenciais de laranja e limão, sendo encontrado nos resíduos industriais do processamento de frutas cítricas e tem sido utilizado como precursor para a produção biotecnológica de aromas monoterpenóides, bioativos e de maior valor agregado, como α -terpineol, carvona e álcool perfílico (TAN; DAY, 1998; SAVITHIRY; CHEONG; ORIEL, 1997; DUETZ *et al.*, 2001; BEILEN *et al.*, 2005).

Outros monoterpenos como α - e β -pinenos, compostos majoritários do óleo essencial de coníferas, são encontrados em grandes concentrações na terebentina, resíduo da indústria de papel, representando um substrato ideal para processos biotecnológicos devido a seu preço acessível (YOO; DAY, 2002; BICAS; DIONISIO; PASTORE, 2009). Estes monoterpenos bicíclicos são precursores de importantes compostos de aroma, como terpineóis, cânfora, geraniol, mentol, verbenol, verbenona e mirtenol (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001).

A transformação microbiana de terpenos em compostos de alto valor agregado tem potencial econômico na indústria de perfumaria, alimentos e farmacêutica (FAROOQ *et al.*, 2004; DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006a).

Diversos derivados oxigenados de monoterpenos, como mentol, carvona, carveol, álcool perílico, α -terpineol, mentol, verbenol e verbenona são reconhecidos por suas fragrâncias agradáveis e também por serem compostos bioativos, alguns com atividade antimicrobiana e anti-tumoral (RAVINDRANATH, 1983; RAO; RAO; AGRAWAL, 2003; CROWELL, 1999; JUN; JEONG; HO, 2006; DA FONSECA *et al.*, 2006b). Processos biotecnológicos para a produção de derivados oxigenados de monoterpenos são, portanto, uma interessante perspectiva, levando-se em consideração as vantagens quanto ao menor impacto ambiental, apelo comercial dos produtos formados e quanto à possibilidade de utilização de substratos de baixo custo, o que tornaria o processo global muito viável e de grande interesse.

Diversos estudos foram desenvolvidos no intuito de utilizar monoterpenos como substratos para a produção biotecnológica de aromas naturais de maior valor comercial como a biotransformação de *R*-(+)-limoneno em álcool perílico e α -terpineol por variados tipos de micro-organismos (MENÉNDEZ *et al.*, 2002; TRYTEK; FIEDUREK, 2005; ROTTAVA *et al.*, 2010). A biotransformação de α -e β -pineno também é relatada para a produção de verbenol e verbenona (DIVYASHREE; GEORGE; AGRAWAL, 2006). Outro monoterpeno utilizado como substrato é o citrionelol que em alguns casos foi biotransformado em óxido de rosa (MARÓSTICA JR.; PASTORE, 2006).

Os trabalhos de biotransformação de terpenos utilizam enzimas purificadas, células vegetais, leveduras, fungos e bactérias como biocatalisadores, sendo que os dois últimos representariam juntos por aproximadamente 75% do total (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006). A biotransformação fúngica é relativamente superior quando comparada com a bacteriana, pois o metabolismo bacteriano é rápido e frequentemente resulta na degradação de compostos químicos, enquanto as transformações fúngicas são relativamente lentas e produz os produtos desejados com as alterações estruturais mínimas e em rendimentos consideráveis (FAROOQ; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 2004). Assim a utilização de linhagens fúngicas para a biotransformação de monoterpenos para a produção de bioaromas emerge como uma importante abordagem na área de biotecnologia.

3.1 Biotransformação de limoneno em α -terpineol

O α -terpineol, 1-metil-4-isopropil-1-cicloexen-8-ol, monoterpenóide cíclico hidroxilado, incolor e de aroma ligeiramente adocicado é um interessante produto de bioconversão do limoneno valorizado comercialmente (BAUER, GARBE, SURBURG, 2001; MAROSTICA JR. *et al.*, 2009). Está presente em teores de 3 a 4% em óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Salvia officinalis* e *Carthamus tinctorius* (BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX, 1949; KANAT; ALMA, 2004; HARRATHI *et al.*, 2012).

Diversos estudos evidenciaram atividades biológicas importantes do α -terpineol, como atividade antiproliferativa *in vitro* frente a linhagens celulares de adenocarcinoma da mama (MCF-7) e leucemia mielóide crônica (K-562), comprovando nesse caso maior especificidade que o limoneno (BICAS *et al.*, 2011). Atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas, periodontogênicas e *Campylobacter jejuni* (PARK *et al.*, 2012; KUREKCI *et al.*, 2013) além de atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Geotrichum citri-aurantii* (PARK *et al.*, 2009; ZHOU;TAO; JIA, 2014). Atividade antioxidante e antimutagênica também são relatadas para o α -terpineol (DI SOTTO *et al.*, 2013; MARÓSTICA JR. *et al.*, 2009). Além de suas atividades biológicas, comprovou-se a viabilidade do α -terpineol como solvente visando à melhoria das propriedades coloidais de formulações de nanotubos de carbono, contudo, a maior utilização desse monoterpenóide é

na indústria de cosméticos e higiene pessoal (KIM *et al.*, 2006; ; BHATIA;LETIZIA; API, 2008).

O primeiro relato da biotransformação de limoneno em α -terpineol foi em 1969, por uma linhagem de *Cladosporium* sp (KRAIDMAN, MUKHERJEE, HILL, 1969). Desde então inúmeros estudos demonstraram essa capacidade de biotransformação para várias espécies de fungos como as do gênero *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (NOMA, YAMASAKI, ASAKAWA, 1992; TAN, DAY, CADWALLADER, 1998; DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2001; ADAMS, DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2003; TRYTEK, FIEDUREK, 2005; BICAS, 2009; MOLINA *et al.*, 2013).

A utilização de bactérias para a produção biotecnológica de α -terpineol também é conhecida, estudos com linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus stearothermophilus* BR388 e *Escherichia coli* recombinante, demonstraram a capacidade de biocatálise bacteriana do limoneno à α -terpineol e outros derivados oxigenados (CADWALLADER *et al.*, 1989; CADWALLADER; BRADDOCK; PARISH, 1992; ACOSTA *et al.*, 1996; BICAS *et al.*, 2008; CHANG; GAGE; ORIEL, 1994; SAVITHIRY; CHEONG; ORIEL, 1997).

Recentemente, alguns dos processos de bioconversão de limoneno em α -terpineol descritos na literatura tiveram suas condições otimizadas utilizando técnicas de planejamento experimental e seus rendimentos foram aumentados significativamente (BICAS *et al.*, 2008; ROTTAVA *et al.*, 2011).

Assim, a produção biotecnológica de α -terpineol é sem duvida uma importante abordagem na produção biotecnológica de compostos de aroma utilizando substratos terpênicos de baixo custo e apresenta a vantagem de se obter um composto valorizado comercialmente, considerado natural e com importantes atividades biológicas justificando, portanto, estudos de screening de novos biocatalisadores fúngicos e bacterianos aptos à produção desse composto.

3.2 Biotransformação de α -pineno em verbenona

A verbenona, um ceto-monoterpenóide bicíclico, é um composto de aroma encontrado naturalmente sob as formas isoméricas (1*R*)-(+)-verbenona e (1*S*)-(-)-verbenona. Trata-se do componente majoritário de óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Verbena triphylla* e *Eucalyptus globulus* e está associado à fragrância de cânfora, compondo o aroma de diversas ervas e frutas (RAVID *et al.*, 1997). Esse composto também é encontrado na natureza como um feromônio natural de alguns insetos como *Dendroctonus frontalis*, podendo ser um marcador volátil específico de machos dessa espécie (RENWICK *et al.*, 1973; BRAND *et al.*, 1976; BLOMQUIST *et al.*, 2010).

Uma interessante aplicação da verbenona é a sua utilização como material de partida para a síntese de variados compostos orgânicos, dentre eles análogos ciclobutílicos de GABA e intermediários ciclobutanos enantiomericamente puros e substituídos, que podem ser utilizados como agentes terapêuticos e ligantes quirais em catálises assimétricas, respectivamente (MOGLIONI *et al.*, 2002; LEE-RUFF; MLADENOVA, 2003). Outros compostos orgânicos de interesse que são sintetizados utilizando essa mesma perspectiva são tiadiazolidinas, lactonas bicíclicas e até mesmo o quimioterápico Taxol[®] ou seus derivados (SARMIENTO *et al.*, 2011; WENDER *et al.*, 1995).

Considerando tais aplicações, a verbenona é um importante composto de aroma que tem despertado o interesse pelo seu valor mercadológico e que tem na biotecnologia uma interessante via de produção de forma a aumentar seu valor comercial já que o composto produzido seria considerado “natural”.

A utilização de α -pineno como substrato em processos biotecnológicos para a obtenção de verbenona foi descrita utilizando diferentes biocatalisadores. Dentre os micro-organismos utilizados estão fungos e leveduras, como *Aspergillus niger* (BHATTACHARYYA; PREMA, 1962; DIVYASHREE; GEORGE; AGRAWAL, 2006), *Penicillium k.* (AGRAWAL; JOSEPH, 2000), *Hormonema* sp. (VAN DYK; VAN RENSBURG; MOLELEKI, 1998) e *Botrytis cinerea* (FAROOQ *et al.*, 2002); bactérias: *Serratia marcescens* (WRIGHT *et al.*, 1986), *Pseudomonas* spp. (DIVYASHREE; GEORGE; AGRAWAL, 2006) e *Nocardia* sp. (PEREZ *et al.*, 1999). Culturas de células

vegetais também foram utilizadas, como as de *Nicotiana tabacum*, *Cannabis sativa* e *Picea abies* (HIRATA *et al.*, 1994; LINDMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2003; VANEK *et al.*, 2005).

No trabalho desenvolvido por Van Dyk *et al.* (1998), utilizando uma linhagem de levedura *Hormonema* sp., a produção de verbenona atingiu 0.3 g.L⁻¹ e a de *trans*-verbenol chegou a 0.4 g.L⁻¹ após 96 horas de fermentação. Em outro estudo desenvolvido por Maróstica Jr. (2006) com o uso de terebentina como fonte de alfa-pineno para o processo de biotransformação as concentrações de verbenol ficaram entre 6 a 51 mg.L⁻¹ para linhagens de *Mucor* sp. e *Penicillium* sp. após 72 horas de fermentação (MARÓSTICA JR., 2006).

A via metabólica de bioconversão de alfa-pineno em verbenona utilizada pelos micro-organismos nem sempre é a preferencial, podendo haver outras vias envolvidas na biotransformação, como por exemplo, a metabolização via derivados de *p*-menteno como o relatado em um processo de bioconversão de α - e β -pineno usando *Pseudomonas* sp. em que os produtos majoritários foram o limoneno e *p*-cimeno, sendo também observados outros produtos minoritários, entre eles borneol e cânfora (Figura 9) (YOO; DAY; CADWALLADER, 2001).

Essa tendência de formação de outros produtos de oxidação do α -pineno foi observado no estudo de Wright *et al.* (1986) usando uma linhagem de *Serratia marcescens*, em que houve a bioconversão de α -pineno em *trans*-verbenol como produto majoritário e em verbenona e *trans*-sobrerol como produtos minoritários.

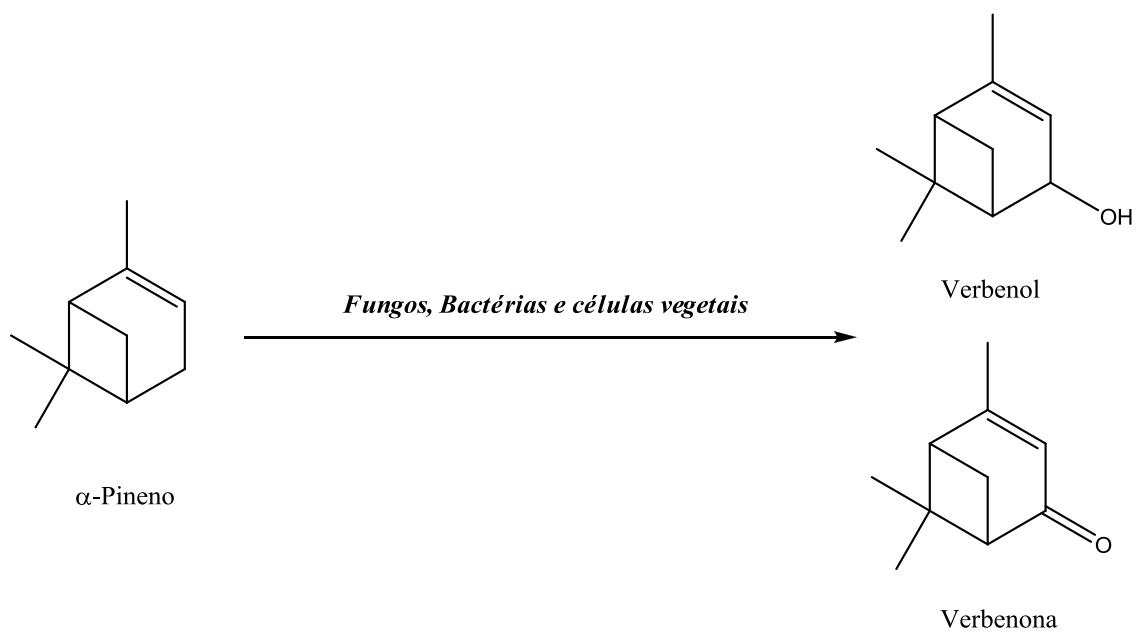


Figura 8. Oxidação regiosseletiva de alfa-pineno em verbenol e verbenona.

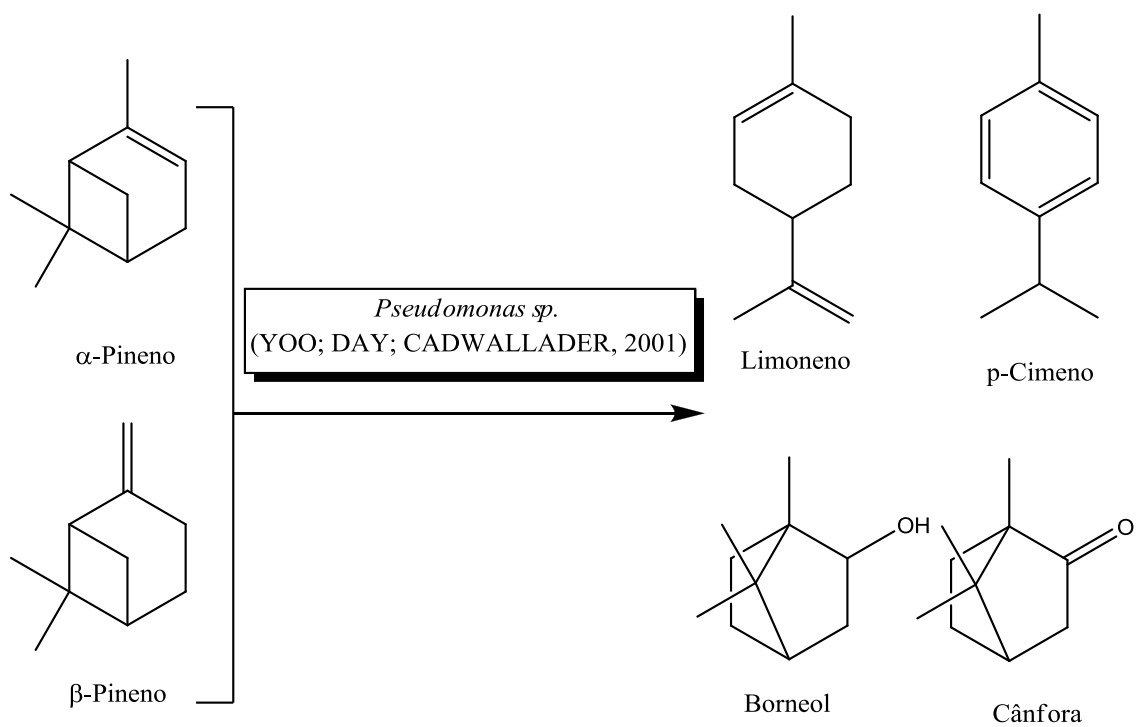


Figura 9. Outros produtos de oxidação do α -pineno encontrados na literatura.

Portanto, processos de produção biotecnológica de verbenona que utilizem substratos de baixo custo como o α -pineno ou até mesmo resíduos industriais ricos nesse monoterpene são importantes sob o ponto de vista econômico e estudos que proponham a otimização das condições do processo, visando aumento no rendimento total, são altamente promissores. Além disso, a seleção de novos micro-organismos que apresentem elevada regioseletividade para a oxidação de alfa-pineno torna-se necessária e caracteriza-se como um ponto desafiador nos estudos de biotransformação de monoterpenos.

4. Conclusão

Os monoterpenos são compostos orgânicos provindos do metabolismo secundário das plantas e desempenham diversos papéis na natureza, desde a atração de agentes polinizadores até a proteção contra parasitas. Podem estar presentes em grandes concentrações em resíduos de processamento de vários setores industriais, incluindo a indústria de alimentos.

Dessa forma, podem ser adquiridos a baixo custo e o apelo ambiental envolvido no aproveitamento desses resíduos é uma tendência no campo científico. Os processos biotecnológicos de transformação de monoterpenos por micro-organismos por sua vez, surgem como uma promissora alternativa já que possibilita a geração de compostos de maior valor comercial, como monoterpenóides com características sensoriais particulares. Além disso, esses monoterpenóides podem apresentar atividades biológicas importantes, como atividade antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória, podendo ser utilizados como novos candidatos a fármacos.

Portanto, estudos que procurem avaliar o potencial dos monoterpenos como substratos para biotransformação é de grande importância, pois fomentaria novas possibilidades para a aquisição de compostos bioativos e de aproveitamento de resíduos aliados a conceitos de minimização de custos e impacto ambiental reduzido.

5. Referências

- ACOSTA, M.; MAZAS, N.; MEJÍAS, E.; PINO, J. Obtencion de aromatizantes mediante biotransformacion del limoneno. *Allimentaria*. v.272, pp.73-75, 1996.
- ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to a-terpineol by *Penicillium digitatum*- investigation of the culture conditions. *Food Chemistry*. v. 80, pp. 525-534, 2003.
- AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; SCOTT, B.C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol . *Food and Chemical Toxicology*. v.32, pp.31-36, 1994.
- AGRAWAL, R.; JOSEPH, R. – Optimization of Conditions for the Biotransformation of Alpha Pinene to Verbenone by a *Penicillium* sp. *Journal of Food Science and Technology*. V. 37, n. 4, p. 430-432, 2000
- BAILEY,H.H.; LEVY, D.; HARRIS,L.S.; SCHINK, J.C.; FOSS, F.; BEATTY,P.; WADLER, S. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: eastern cooperative oncology group study E2E96.*Gynecologic Oncology*.v.85, pp. 464–468, 2002.
- BARNARD, D.R; XUE, R.D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*,*Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae).*Journal of Medical Entomology*. v.41, pp. 726–730, 2004.
- BASSI,A.M.;ROMANO,P.; MANGINI,S.; COLOMBO,M.; CANEPA,C.;NANNI,G.; CASU, A. Protein and m-RNA expression of farnesyl-transferases, RhoA and RhoB in rat liver hepatocytes: action of perillyl alcohol and vitamin A in vivo. *Journal of Biomedical Science*. v.12, pp. 457–466, 2005.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.
- BEILEN, J. B. VAN; LU, D.; BAUER, U.; WITHOLT, B.; DUETZ, W. A. 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, p. 1737-1744, 2005.

BHAKUNI, R.S.; JAIN, D.C.; SHARMA, R.P.; KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*. v.80, pp.35-48, 2001.

BHATIA, S.P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on alpha-terpineol. *Food and Chemical Toxicology*. v.46, pp.S280-S285, 2008a.

BHATIA, S.P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on myrtenol. *Food and Chemical Toxicology*. v.46, pp.S237-S240, 2008b.

BICAS, J.L.; DIONISIO, A.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. *Chemical Reviews*, v. 109, p. 4518-4531, 2009.

BICAS, J.L.; FONTANILLE, P.; PASTORE, G.M.; LARROCHE, C. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*. v.105, pp.1991-2001, 2008.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology*. v.49, 1610-1615, 2011.

BLOMQUIST, G. J.; FIGUEROA-TERAN, R.; AW, M.; SONG, M.; GORZALSKI, A.; ABBOTT, N.L.; CHANG, E.; TITTIGER, C. Pheromone production in bark beetles. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 40, p. 699-712, 2010

BRAND, J.M., BRACKE, J.W., BRITTON, L.N., MARKOVETZ, A.J., BARRAS, S.J.. Bark beetle pheromones: production of verbenone by a mycelial fungus of *Dendroctonus frontalis*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 2, p.195-199, 1976

BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX. *Oleum Melaleucae* (O. Melal.). Oil of *Melaleuca*. London, pp. 597–598, 1949.

CADWALLADER, K.R.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E. Isolation of alpha-terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*. *Journal of Food Science*. v.57, pp.241-244, 1992.

CADWALLADER, K.R.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E.; HIGGINS, D.P. Bioconversion of (+)-Limonene by *Pseudomonas gladioli*. *Journal of Food Science*. v.54, pp. 1241-1245, 1989.

CAI, Z.; LEI, X.; LIN, Z.; ZHAO, J.; WU, F.; YANG, Z.; PU, J.; LIU, Z. Preparation and evaluation of sustained-release solid dispersions co-loading gastrodin with borneol as an oral brain-targeting enhancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. v.4, pp.86-93, 2014.

CANTORE, P.L.; SHANMUGAIAH, V.; LACOBELLIS, N.S. Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. v. 57, pp.9454-9461, 2009.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONCALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSE, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Letters*. v.215, pp. 53–59, 2004.

CHEN, W.; VILJOEN, A. Geraniol—A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*. v.76, pp. 643–651, 2010.

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

DA FONSECA, C.O.; FISCHER, J.S.G.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R.; QUIRICO-SANTOS, T. Oligodendrogliomas: a genética molecular e o desenvolvimento de estratégia terapêutica adjuvante. *Arq. Bras. Neurocir.* v. 26, pp. 8-15, 2007.

DA FONSECA, C.O.; LANDEIRO, J.A.; CLARK, S.S.; QUIRICO-SANTOS, T.; CARVALHO, M.G.C. AND GATTASS, C.R. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. *Surgical Neurology*. v.65, pp.2–9, 2006a.

DA FONSECA, C.O.; LINDEN, R.; FUTURO, D.; GATTASS, C.R.; QUIRICO-SANTOS, T. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* v.56, pp.267-276, 2008.

DA FONSECA, C.O.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R. AND QUIRICO-SANTOS, T. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. *Surgical Neurology*. v.66, pp. 611-615, 2006b.

DA FONSECA, C.O.; SIMÃO, M.; LINS, I.R.; CAETANO, R.O.; FUTURO, D.; QUIRICO-SANTOS, T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. *J. Cancer Research Clinical Oncology*. v.137, pp. 287–293, 2011.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology advances*, v. 24, n. 2, p. 134-42, 2006.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; DE ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neuroscience Letters*. v.401, pp.231-235, 2006.

DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi- Study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.11, pp. 265-270, 2001.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. And *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A*. v.1027, pp.137-146, 2004.

DEVON, T.K.; SCOTT, A.I. Handbook of naturally occurring compounds. p.3, v. II. Academic Press, New York, 1972.

DI SOTTO, A.; DURAZZI, F.; SARPIETRO, M.G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and antioxidante activities of some bioflavours from wine. *Food and Chemical Toxicology*. v.60, pp.141-146, 2013.

DIVYASHREE, M.S.; GEORGE, J. and AGRAWAL, R. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *Journal of Food Science and Technology*, v. 43, p. 73-76, 2006.

DIVYASHREE, M.S.; GEORGE, J.; AGRAWAL, R. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *Journal of Food Science and Technology*, v. 43, p. 73-76, 2006.

DUETZ, W.A.; FJALLMAN, A.H.M.; REN, S.Y.; JOURDAT, C.; WITHOLT, B. Biotransformation of d-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p. 2829–2832, 2001.

EVANS, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy. W.B. Saunders Company Ltd, London. pp. 255–293, 1996.

EVSTATIEVA, L.; TODOROVA, M.; ANTONOVA, D.; STANEVA, D. Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins. *Pharmacognosy Magazine*. v.24, pp.256-258, 2010.

EZENNA, E.I.; PHILLIPS, L.R.; WOLFE, L.T.; TABIBI, S.E. Analysis of perillic acid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*. v.688, pp. 354–358, 1997.

FACHINI-QUEIROZ, F.C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C.F.; CARVALHO, M.D.B.; CUNHA, J.M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, G.A.; CUMAN, R.K.N. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v.2012, pp-1-10, 2012.

FAROOQ, A., CHOUDHARY, M. I., TAHARA, S., RAHMAN, A., BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. – The Microbial Oxidation of (–)- β -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*. V. 57, n. 7-8, p. 686-690, 2002.

FAROOQ, A.; ATTA-UR-RAHMAN, B. S. P.; CHOUDHARY, M. Fungal Transformation of Monoterpenes. *Current Organic Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 353-366, 2004

GALLE, M.; CRESPO, R.; RODENAK KADNIEW, B.; MONTERO VILLEGAS, S.; POLO, M.; DE BRAVO, M.G. Supression by geraniol of the growth of A549 human lung adenocarninoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and in vivo: Potential use in cancer chemotherapy. *Nutrition and Cancer*. v.66, pp.888-895, 2014.

GAVLIAKOVA, S.; BIRIGEROVA, Z.; BUDAY, T.; BROZMANOVA, M.; CALKOVSKY, V.; POLIACEK, I.; PLEVKOVA, J. Antitussive effects of nasal thymol challenges in healthy volunteers. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. v.187, pp.104-107, 2013.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpenes natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. v.3, pp.408-414, 2007.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*. v.119, pp.731-737, 2010.

GRACE, M.H. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytotherapy Research*. v.16, pp.183-185, 2002.

GRANGER, R.E.; CAMPBELL, E.L.; JOHNSTON, G.A.R. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. *Biochemical Pharmacology*. v.69, pp.1101-1111, 2005.

GUENTHER, A.; ZIMMERMAN, P.; KLINGER, L.; GREENBERG, J.; ENNIS, C.; DAVIS, K.; POLLOCK, W.; WESTBERG, H.; ALLWINE, G.; GERON, C. Estimates of regional natural volatile organic compound fluxes from enclosure and ambient measurements. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*. v.101, pp. 1345–1359, 1996.

HARRATHI, J.; HOSNI, K.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATTIA, H.; MARZOUK, B.; MAGNÉ, C.; LACHAËL, M. Effect of salt stress on growth, fatty acids and essential oils in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 34, pp. 129–137, 2012.

HIERRO, I.; VALERO, A.; PEREZ,P.; GONZALEZ, P.; CABO, M.M.; MONTILLA, M.P.; NAVARRO, M.C. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.1. L3 larvae. *Phytomedicine*. 11, pp. 77–82, 2004.

HIRATA, T.; IKEDA, Y.; IZUMI, S.; SHIMODA, K.; HAMADA, H.; KAWAMURA, T. Introduction of oxygenated functional groups into 3-carene and 2-pinene by cultured cells, *Phytochemistry*. v.37, pp.401-403, 1994.

HORNSTEIN, I. *Flavor Chemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, 1966.

HUDES, G.R.; SZARKA, C.E.; ADAMS, A.; RANGANATHAN, S.; MCCAULEY, R.A.; WEINER, L.M.; LANGER, C.J.; LITWIN, S.; YESLOW, G.; HALBERR, T.; QIAN, M.; GALLO, J.M. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clinical Cancer Research*.v.6, pp. 3071–3080, 2000.

HUO, M.; CUI, X.; XUE, J.; CHI, G.; GAO, R.; DENG, X.; GUAN, S.; WEI, J.; SOROMOU, L.W.; FENG, H.; WANG, D. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*. V.180, ppe47-e54, 2013.

IMAMURA, M.; SASAKI, O.; OKUNISHI, K.; NAKAGOME, K.; HARADA, H.; KAWAHATA, K.; TANAKA, R.; YAMAMOTO, K.; DOHI, M. Perillyl alcohol suppresses antigen-induced immune responses in the lung. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v.443, pp.266-271, 2014.

JUHAS, S.; CIKOS, S.; CZIKKOVA, S.; VESELA, J.; LIKOVA, G.; HAJEK, T.; DOMORACKA, K.; DOMORACKY, M.; BUJNAKOVA, D.; REHAK, P.; KOPPEL, J. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biologica (Praha)*. v.54, pp.1-7, 2008.

JUN, M.; JEONG, W.-S.; HO, C.-T. – Health Promoting Properties of Natural Flavor Substances. *Food Science and Biotechnology*. V. 15, n. 3, p. 329-335, 2006.

DA FONSECA, C.O.; LANDEIRO, J. A.; CLARK, S.S.; QUIRICO-SANTOS, T.; CARVALHO, M.G.C.; GATTASS, C.R. – Recent Advances in the Molecular Genetics of

Malignant Gliomas Disclose Targets for Antitumor Agent Perillyl Alcohol. *Surgical Neurology*. v. 65, p. S2-S9, 2006

KANAT, M.; ALMA, M.H. Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Pest Management Science*. v.60, pp. 173–177, 2004.

KIM, B.; LEE, Y-H.; RYU, J-H.; SUH, K-D. Enhanced colloidal properties of single-wall carbon nanotubes in α -terpineol and Texanol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.273, pp. 161-164, 2006.

KLADNIEW, B.R.; POLO, M.; VILLEGAS, S.M.; GALLE, M.; CRESPO, R.; DE BRAVO, M.G. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines. *Chemico-Biological Interactions*. v.214, pp.57-68, 2014.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; CAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Chemistry*. v.53, pp.9452-9458, 2005.

KRAIDMAN, G.; MUKHERJEE, B.B.; HILL, I.D. Conversion of D-limonene into an optically active isomer of α -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriological Proceedings*. v.69, pp. 63-67, 1969.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Antibacterial activity of long-chain alcohols against *Streptococcus mutans*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. v.41, pp. 2447–2450, 1993.

KUREKCI, C.; PADMANABHA, J.; BISHOP-HURLEY, S.L.; HASSAN, E.; AL JASSIM, R.A.M.; McSWEENEY, C.S. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. *International Journal of Food Microbiology*. v.166, pp.450-457, 2013.

LAI, X.J.; ZHANG, L.; LI, J.S.; LIU, H.Q.; LIU, X.H.; DI, L.Q.; CAI, B.C.; CHEN, L.H. Comparative pharmacokinetic and bioavailability studies of three salvianolic acids after the administration of *Salviae miltiorrhizae* alone or with synthetic borneol in rats. *Fitoterapia*. v.82, pp.883-888, 2011.

LEE-RUFF, E.; MLADENOVA, G. Enantiomerically pure cyclobutane derivatives and their use in organic synthesis. *Chemical reviews*, v. 103, p. 1449-83, 2003.

LEPOITTEVIN, B.; WANG, X.; BALTAZE, J.P.; LIU, H.; HERRY, J.M.; BELLON-FONTAINE, M.N.; ROGER, P. Radical polymerization and preliminary microbiological investigation of new polymer derived from (-)-myrtenol. *European Polymer Journal*. v.47, pp.1842-1851, 2011.

LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.; MIÚRA, L.M.; LEITE, J.R.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v.64, pp.283-292, 2012

LIN, J.J.; LIN, J.H.; HSU, S.C.; WENG, S.W.; HUANG, Y.P.; TANG, N.Y.; CHUNG, J.G. α -phellandrene promotes immune responses in normal mice through enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activities. *In Vivo*. v. 27, pp.809-814, 2013.

LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRO, M.; CARAMÃO, E.B.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*. v.17, pp.679-683, 2010.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. Biotransformations of turpentine constituents: Oxygenation and esterification. Doctoral Thesis. Mid Sweden University, Stockholm, Sweden. p-67, 2003.

LIU, R.; ZHANG, L.; LAN, X.; LI, L.; ZHANG, T.T.; SUN, J.H.; DU, G.H. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/ reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor κ B signaling pathway. *Neuroscience*. v.176, pp.408-419, 2011.

LIU,G.; OETTEL,K.; BAILEY, H.; UMMERSEN,L.V.; TUTSCH,K.; STAAB, M.J.; HORVATH,D.; ALBERTI,D.; ARZOOMANIAN, R.; REZAZADEH, H.; MCGOVERN, J.; ROBINSON, E.; DEMETS,D.; WILDING, G.Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer.Invest. New Drugs. v.21, pp. 367–372, 2003.

LOUTRARI, H.; HATZIAPOSTOLOU, M.; SKOURIDOU, V.; PAPADIMITRIOU, E.;ROUSSOS, C.; KOLISIS, F.N. AND PAPAPETROPOULOS, A. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. v.311,pp. 568-75, 2004

LUPIEN, S.; KARP, F.; WILDUNG, M.; CROTEAU, R. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: Cdna isolation, characterization, and functional expression of (–)-4S-limonene-3-hydroxylase and (–)-4S-limonene-6-hydroxylase. Archives of Biochemistry and Biophysics. v.368,pp. 181–192, 1999.

MAREI, G.I.K.; RASOUL, M.A.A.; ABDELGALEIL, S.A.M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. Pest. Biochem. Physiol. v. 103, pp. 56-61, 2012.

MARÓSTICA JR, M.R. Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma funcionais. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. – Biotransformation of Citronellol in Rose-Oxide using Cassava Wastewater as a Medium. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 26, p. 690-696, 2006.

MARÓSTICA JR., M.R.; SILVA, T.A.A.R.; FRANCHI, G.C.; NOWILL, A.; PASTORE, G.M.; HYSLOP, S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of Orange essential oil. Food Chemistry. v.116, pp.8-12, 2009.

MATOS, J.M.; SCHMIDT, C.M.; THOMAS, H.J.; CUMMINGS, O.W.; WEIBKE, E.A.; MADURA, J.A.; PATRICK, L.J.; CROWELL, P.L. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*. v.147, pp.194-199, 2008.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. *Planta Cell*. v.7, pp. 1015-1026, 1995.

MEADOWS, S.M.; MULKERIN, D.; BERLIN, J.; BAILEY, H.; KOLESAR, J.; WARREN, D.; THOMAS, J.P. Phase II trial of perillyl alcohol in patients with metastatic colorectal cancer. *International. Journal of Gastrointestiology. Cancer*. v.32, pp. 125–128, 2002.

MENÉNDEZ, P.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, P.; MOYNA, P.; HEINZEN, H. Enzymatic Systems Involved in D-limonene Biooxidation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 45, p. 111-114, 2002.

MIYASHITA, M.; SADZUKA, Y. Effect of linalool as a componente of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology*. v.53, pp.174-179, 2013.

MOGLIONI, A. G.; BROUSSE, B. N.; ANGEL, A.; ORTUN, R. M. Stereoselective synthesis of cyclobutyl GABA analogues and related compounds from (–) - (S) - verbenone. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 13, p. 451-454, 2002.

MOLINA, G.; PINHEIRO, D.M.; PIMENTEL, M.R.; SANTOS, R.; PASTORE, G.M. Monoterpene Bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian Fruits. *Food Science and Biotechnonology*. v.22, pp.999-1006, 2013.

MOREIRA, M.R.C.; SALVADORI, M.G.S.S.; DE ALMEIDA, A.A.C.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R, M.; DE ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol, a monoterpene alcohol. *Neuroscience Letters*. Accepted Manuscript. 2014.

NAPOLI, E.M.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochemical Systematics and Ecology*. v.38, pp. 816-822, 2010.

NOMA, Y.; YAMASAKI, S.; ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*. v.31, pp.2725-2727, 1992.

OKAZAKI, K.; KAWAZOE, K.; TAKAISHI, Y. Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytotherapy Research*. v.16, pp.398-399, 2002.

PARK, M.J.; GWARK, K.S.; YANG, I.; KIM, K.W.; JEUNG, E.B.; CHANG, J.W.; CHOI, I.G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*. v. 80, pp.290-296, 2009

PARK, S-N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J-K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. v.18, pp.369-372, 2012.

PAWAR, P.V.; SHARMA, R.N.; PHADNIS, A.P.; NANDA, B.; PATWARDHAN, S.A. Action of some insect growth regulators on mosquito vectors: Part I – Citronellol based diethers. *The Journal of communicable diseases*. v.23, pp.118-122, 1991.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; CHESSA, M.L.; MORETTI, M.D.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental model of pain. *European Journal of Pharmacology*. v.460, pp.37-41, 2003.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M.D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. v.9, pp. 721-726, 2002.

PEREZ, H. I.; LUNA, H.; MANJARREZ, N.; SOLIS, AIDA A.; NUNES, M.A. Preparation of (1S)-verbenone, aromatic and alicyclic carboxylic acids by oxidation of aldehydes, primary and secondary alcohols with *Nocardia corallina*. *Biotechnology Letters*. v. 21, pp. 855-858, 1999.

PICCINELLI, A.C.; SANTOS, J.A.; KONKIEWITZ, E.C.; OESTERREICH, S.A.; FORMAGIO, A.S.; CRODA, J.; ZIFF, E.B.; KASSUYA, C.A. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience*. 2014.

POLO, M.P.; CRESPO, R.; BRAVO, M.G. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell Biochemistry and Function*. v.29, pp.452-458, 2011.

PREMA, B. R.; BHATTACHARYYA, P. K. – Microbiological Transformation of Terpenes. II. Transformations of α -Pinene. *Applied Microbiology*. V. 10, p. 524-528, 1962

QI, H.P.; GAO, X.C.; ZHANG, L.Q.; WEI, S.Q.; BI, S.; YANG, Z.C.; CUI, H. In vitro evaluation of enhancing effect of borneol on transcorneal permeation of compounds with different hydrophilicities and molecular sizes. *European Journal of Pharmacology*. v.705,pp.20-25, 2013.

RAJESH, D.; STENZEL, R.A. AND STEVEN, P.H. Perillyl alcohol as a radio/chemosensitizer in malignant glioma. *Journal of Biological Chemistry*. v.278, pp. 35968-78, 2003.

RAO, B.R.R.; BHATTACHARYA, A.K.; MALLAVARAPU, G.R.; RAMESH, S. Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). *Flavour Fragrances Journal*. v.19, pp. 344–350, 2004.

RAO, S. C. V.; RAO, R.; AGRAWAL, R. – Enhanced Production of Verbenol, a Highly Valued Food Flavourant, by an Intergeneric Fusant Strain of *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. v. 37, n. 2, p. 145-147, 2003.

RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; KATZIR, I.; LEWINSOHN, E.; DUDAI, N. Identification of (1R)-(+)-Verbenone in Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 12, p. 1995-1998, 1997.

RAVINDRANATH, B. – Some Useful Products from Limonene: A Byproduct of the Citrus Industry. *Journal of Scientific and Industrial Research*. V. 42, p. 82-86, 1983.

RENWICK, J.A.A.; HUGHES, P.R.; TANLETIN DEJ.TY. Oxidation products of pinene in the bark beetle, *Dendroctonus frontalis*. *Journal Insect Physiology*, v.19, pp.1735-1740, 1973.

RIPPLE,G.H.; GOULD, M.N.; STEWART, J.A.; TUTSCH, K.D.; ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.; FEIERABEND, C.; POMPLUN, M.; WILDING, G.; BAILEY, H.H. Phase I clinical trial of perillyl alcohol administered daily. *Clinical Cancer Research*. v. 4, pp. 1159–1164, 1998.

ROTTAVA, I.; CORTINA, P.F.; GRANDO, C.E.; COLLA, A.R.S.; MARTELLO, E.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; ANTUNES, O.A.C.; OESTREICHER, E.G.; DE OLIVEIRA, D. Isolations and screening of microorganisms for R-(+)-Limonene and (-)- β -Pinene Biotransformation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.162, pp.719-732, 2010.

ROTTAVA, I.; CORTINA, P.F.; MARTELLO, E.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; ANTUNES, O.A.C.; OESTREICHER, E.G.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. Optimization of α -terpineol production by biotransformation of R-(+)-Limonene and (-)- β -Pinene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 164, pp.514-523, 2011.

SANTOS, M.R.V.; MOREIRA, F.V.; FRAGA, B.P.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.21, pp.764-771, 2011.

SANTOS, S.R.L.; MELO, M.A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*. v. 84, pp.150-153, 2011.

SARMIENTO, G. P.; ROUGE, P. D.; FABIAN, L. ; VEGA, D.; ORTUNO, R.M.; MOLTRASIO, G.Y.; MOGLIONI, A.G. Efficient synthesis of chiral Δ^2 -1,3,4-thiadiazolines from α -pinene and verbenone. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 22, n. 20-22, p. 1924-1929, 2011.

SAVITHIRY, N.; CHEONG, T.K.; ORIEL, P. Production of Alpha-terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable Limonene hydratase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.63, pp.337-341, 1997.

SCHRADER, J. – Microbial Flavour Production. In: BERGER, R.G. (Ed.) *Flavour and Fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin: Springer-Verlag, pp.507-574, 2007.

SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*. v.10, pp. 241–246, 1995.

SHI, W.; GOULD, M.N. Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Carcinogenesis*. v.23, pp.131-142, 2002.

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigation on essential oil of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. v. 45, pp. 75–81, 2002.

SLAMENOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, E.; WSOLOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.; NAVAROVÁ, J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research*. v.677, pp.46-52, 2009.

TAN, Q.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* NRRL 1202. *Process Biochemistry*. v.33, pp.29-37, 1998.

TOGASHI, N.; INOUE, Y.; HAMASHIMA, H.; TAKANO, A. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, v.13, pp. 3069–3076, 2008.

TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. – A Novel Psychrotrophic Fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene Biotransformation. *Biotechnology Letters*. V. 27, n. 3, p. 149-153, Feb. 2005.

TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnology Letters*. v.27, pp.149-153, 2005.

VAN DER WERF, M.J.; DE BONT, J.A.M.; LEAK, D.J. Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v.55, pp. 147-177, 1997.

VAN DYK, M.S.; VAN RENSBURG, E.; MOLELEKI, N. Hydroxylation of (+)-limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters*. v.20, pp.431-436, 1998.

VANEK, T.; VALTEROVA, I.; VANKOVA, R.; VAISAR, T. Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. *Biotechnology Letters*. v.19, pp.625-628, 2005.

VENDRUSCOLO, A.; TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L.E.; DANTAS, J.A.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Antiinflammatory and antinoceptive activities of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil in experimental animal models. *Indian Journal of Pharmacology*. v.38, pp.58-59, 2006.

VINOTHKUMAR, V.; MANOHARAN, S.; SINDHU, G.; NIRMAL, M.R.; VETRICHIELVI, V. Geraniol modulates cell proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v.369, pp.17-25, 2012.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*.v.128, pp. 151–153, 1994.

WEI, Z.; ZHOU, E.; GUO, C.; FU, Y.; YU, Y.; LI, Y.; YAO, M.; ZHANG, N.; YANG, Z. Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF- κ B activation. *Microbial Pathogenesis*. v.71-72, pp.15-19, 2014.

WENDER, P. A.; FLOREANCIG, P. E.; GLASST, T. E.; NATCHUS, M.G.; SHUKER, A.J.; SUTTON, J.C. Toward the Synthesis of Taxol and its Analogs: Incorporation of Non-Aromatic C-Rings in the Pinene Pathway. *Tetrahedron Letters*, v. 36, n. 28, p. 4939-4942, 1995.

WRIGTH, S.J.; CAUNT, P.; CARTER, D.; BAKER, P.B. Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.23,224-227, 1986.

WU, C.; LIAO, Q.; YAO, M.; XU, X.; ZHOU, Y.; HOU, X.; XIE, Z. Effect of natural borneol on the pharmacokinetics and distribution of nimodipine in mice. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. v.39, pp.17-24, 2014a.

WU, H.Y.; TANG, Y.; GAO, L.Y.; SUN, W.X.; HUA, Y.; YANG, S.B.; ZHANG, Z.P.; LIAO, G.Y.; ZHOU, Q.G.; LUO, C.X.; ZHU, D.Y. The synergetic effect of edaravone and borneol in the rat model of ischemic stroke. *European Journal of Pharmacology*. v.27, In press, Corrected Proof, 2014b.

WU, Q.; YU, L.; QIU, J.; SHEN, B.; WANG, D.; SOROMOU, L.W.; FENG. Linalool attenuates lung inflammation induced by *Pasteurella multocida* via activating Nrf-2 signaling pathway. *International Immunopharmacology*. v.21, pp.456-463, 2014c.

XIAO Y, ZHANG L, TANG H, CAO Z, FU Z, LU C, WANG X, WANG K, MA G. Study on the role of borneol in improving permeability of arsenic through the blood brain barrier. *Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research*.:244 –246, 2007.

XIE, Y.; WANG, K.; HUANG, Q.; LEI, C. Evaluations toxicity of monoterpenes to subterranean termite *Reticulitermes chinensis* Snyder. *Industrial Crops and Products*. v. 53, pp. 163-166, 2014.

YOO, S. K.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of α - and β -Pinene by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 925-932, 2001.

YOO, S.K.; DAY, D.F. Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry* . v.37, p.739-745, 2002.

YU, B.; RUAN, M.; CUI, X.; GUO, J.M.; XU, L.; DONG, X.P. Effects of borneol on the pharmacokinetics of ginkgolide in cortex, hippocampus, hypothalamus and striatum of

conscious rat by simultaneous brains microdialysis coupled with UPLC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*. v.77, pp.128-132, 2013.

YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; KIYOZUKA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; KANZAKI, H.; TSUBURA, A. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*. v.84, 251-260, 2004.

ZHOU, E.; FU, Y.; WEI, Z.; YU, Y.; ZHANG, X.; YANG, Z. Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia*. v.96, pp.131-137, 2014.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*. v.37, pp. 277-283, 2014.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VERBENONA BIOTECNOLÓGICA UTILIZANDO LINHAGEM FÚNGICA *LBGM F6* ISOLADA DO ROMÃ (*Punica granatum*)

**Bruno Nicolau Paulino¹, Gustavo Molina², Marina Gabriel Pessoa¹, Meissa Rocha
Essenfelder Abrahão¹, Gláucia Maria Pastore¹**

¹ Laboratório de Bioaromas, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n° 80, CEP 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

² Instituto de Ciência e Tecnologia, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Rodovia MGT 367-Km 583 n°5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

A produção biotecnológica de compostos de aroma por linhagens fúngicas se mostra vantajosa comparada com a biocatálise bacteriana em termos de robustez e rendimentos. Dessa forma, muitos estudos visam à seleção de fungos com potencial aplicação em estudos de biotransformação de monoterpenos. Esse capítulo se divide em duas partes: a Parte I trata do screening de 81 linhagens de fungos isolados de diversas fontes capazes de utilizar α -pineno e/ou *R*-(+)-limoneno como substrato para a produção de derivados oxigenados com características sensoriais valorizadas comercialmente, nesse caso, verbenona e α -terpineol respectivamente. Das linhagens testadas apenas 5 linhagens demonstraram esse potencial, contudo, apenas uma linhagem foi a que propiciou rendimento acima de 50 mg.L⁻¹ e foi foco de estudo de efeito de indução enzimática e estudo de influência de idade do inóculo no processo de produção de aroma. A Parte II foca no estudo de otimização do processo de biotransformação, utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 4 variáveis, totalizando 28 experimentos. A variável dependente foi a concentração de verbenona em 96 horas de processo. A otimização proporcionou o estabelecimento de condições mais favoráveis ao processo, elevando a produção de 66

mg.L⁻¹ para aproximadamente 108 mg.L⁻¹ em um dos ensaios do DCCR e em torno de 98 mg.L⁻¹ no ensaio de validação. Dessa forma, a otimização de processos é uma importante ferramenta que permite o estabelecimento de condições em que há um aumento do rendimento nos estudo de biotransformação de compostos monoterpênicos em compostos de aroma.

PARTE 1

SCREENING DE LINHAGENS FÚNGICAS PARA A BIOTRANSFORMAÇÃO DE *R*-(+)-LIMONENO E *S*-(-)- α -PINENO

1. INTRODUÇÃO

A relevância econômica dos fungos reside na utilização desses micro-organismos e suas enzimas em diversos processos industriais. Na indústria de alimentos e bebidas, por exemplo, a utilização vai desde a produção de pães até a produção de fermentados, laticínios e derivados, contribuindo tanto para a melhoria do processo global de fabricação quanto para conferir sabores adicionais (SAXENA *et al.*, 2001; GHORAI *et al.*, 2009). Outra aplicação é o uso dos metabólitos secundários, que despertaram e ainda despertam interesse e investimentos da indústria farmacêutica, principalmente na produção de antibióticos e esteroides, medicamentos de grande demanda e importância farmacológica (HUNTER *et al.*, 2009; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009; KRISTAN; RIŽNER, 2012).

Grande aporte de enzimas provenientes de fungos tem relevantes aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos, tais como tanases, proteases, amilases e lipases, podendo advir de várias espécies, como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Paecilomyces* sp., *Phoma* sp., entre outros (PARANTHAMAN *et al.*, 2009; RAMÍREZ-CORONEL *et al.*, 2003; NAKADAI *et al.*, 1973; KUMAR, 2011; GÉNIE *et al.*, 2006; FALONY *et al.*, 2006; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

Dentre as aplicações biotecnológicas dos fungos, tem sido feito o uso extensivo desses micro-organismos em estudos de biotransformação de terpenos em compostos de aroma, biotransformação de esteróides, compostos fenólicos, alcalóides e outras moléculas bioativas se valendo de inúmeros tipos de reações que podem ser quimio-, régio- e estereosseletivas (AGRAWAL *et al.*, 1999; KRINGS *et al.*, 2006; PUPO *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2009; BÉRDY, 2005; SHIBUYA *et al.*, 2003). Essas reações podem ter seu estudo facilitado devido à utilização de condições rigorosamente controladas, geralmente mais brandas que as utilizadas em sistemas de

síntese química e o uso de matrizes simples que permitem e facilitam a análise dos produtos formados (BORGES *et al.*, 2009).

A biotransformação de monoterpenos para a obtenção de seus derivados oxigenados utilizando fungos já é bem estabelecida e demonstra resultados satisfatórios, como na biotransformação de limoneno em α -terpineol, álcool perfílico, carvona, limoneno-diol por várias espécies do gênero *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* (NOMA, YAMASAKI, ASAKAWA, 1992; TAN, DAY, CADWALLADER, 1998; DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2001; ADAMS, DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2003; TRYTEK, FIEDUREK, 2005; BICAS, 2009). Estudos de otimização de processos biotecnológicos demonstram a viabilidade do uso de ferramentas de planejamento experimental para a obtenção de melhores condições experimentais nas quais o rendimento dos produtos de bioconversão, entre eles o α -terpineol, são maximizados (BICAS *et al.*, 2009; ROTTAVA *et al.*, 2011).

Não existem relatos na literatura sobre a otimização de processos biotecnológicos de conversão de α -pineno em derivados oxigenados, sendo assim, o objetivo desse trabalho foi o screening de novas linhagens de fungos com potencial de biotransformação de monoterpenos, principalmente o α -pineno e posterior estudo de otimização.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os substratos utilizados nos estudos de biotransformação foram (R)-(+)-limoneno (Sigma-Aldrich, $\geq 93\%$ de pureza) e (1S)-(-)- α -pineno (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ de pureza). Os padrões utilizados para confirmação dos produtos foram: R-(+)- α -terpineol (Fluka, 99% de pureza), (1S)-(-)- verbenona (Sigma-Aldrich, $\geq 93\%$ de pureza), (S)-*cis*-verbenol (Sigma-Aldrich, 95% de pureza) e mirtenol (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$ de pureza).

Para a extração dos compostos de biotransformação, foi utilizado acetato de etila P.A.(Synth) com 1% de n-decano (Sigma-Aldrich, $>99\%$ de pureza) como padrão interno.

2.2 Linhagens fúngicas utilizadas no Screening

No total 81 linhagens de fungos pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas foram selecionadas para a etapa inicial desse projeto. As linhagens fúngicas selecionadas foram isoladas de diversas fontes naturais como solo, folhas, frutos e estocadas em meio Yeast-Malt (YM; g.L⁻¹: Glicose = 1,0; Peptona bacteriológica = 0,5; Extrato de Malte = 0,3; Extrato de Levedura = 0,3 e ágar = 2,0) em tubos inclinados em ambiente refrigerado. Dessa forma, após a seleção das linhagens, essas foram reativadas em placas de meio YM, a 30°C em estufa bacteriológica por 72 horas até crescimento satisfatório. As linhagens crescidas foram novamente repicadas e estocadas como descrito anteriormente até a garantia de pureza da linhagem.

Tabela 1. Linhagens fúngicas utilizadas no screening de biotransformação de terpenos.

Código da Linhagem	Substrato	
	R-Limoneno	Alfa-pineno
ALB 30108 2288SEC	X	X
ALB 24108 M.MEIKEY 2	X	X
ALB 24108 PITAYA POLPA2.1	X	X
ALB 23108 A.NIGER	*	*
ALB 30108 A5-33	X	X
ALB 30108 356	X	X
ALB PERA WILL SEM-9	*	*
ALB 23108 MEX.MUR CASCA8	X	X
ALB 30108 144	X	X
ALB 30108 201	X	X
ALB 23108 PITAYA POLPA 2.2	X	X
ALB 30108 PERA PORT P-10	X	X
ALB 30108 2025 SEC	X	X
ALB 30108 154 SEC	X	X
ALB 30108 198	X	X
ALB 23108 MARACUJÁ SEM2	*	*
ALB 30108 212	*	*
ALB 30108 209	X	X
ALB 30108 44-21	X	X
ALB 24108 CAJU CAST 10	-	-
ALB 30108 18.36	X	X
ALB 30108 234	X	X
ALB 24108 M.MEIKEY 1	X	X
ALB 24108 MAÇÃ VERDE S.7	X	X
ALB 23108 403 MARI	X	X
ALB 30108 31.54	X	X

ALB 30108 MAÇA VERDE S.6	X	X
ALB 30108 353	X	X
ALB 23108 PITAYA POLP 2.1	X	X
ALB 23108 POKAN A. 2.2	X	X
ALB 30108 33.52	X	X
ALB 30108 RHIZOPUS SP.	X	X
ALB M. MEIKEY 2	X	*
ALB 23108 49 SEC.	X	X
ALB 23108 PEN. ITALICUM	X	X
ALB 30108 48.32	X	X
ALB 30108 338	*	X
ALB 30108 181	*	X
ALB 24108 ASP. ORYZAE	X	X
ALB 24108 G.CANDIDUM	X	X
ALB 23108 PERA P. TALO 5	X	X
ALB 24108 RHIZOPUS 2	X	X
ALB 30108 3.30	X	X
ALB 23108 CUPUAÇU 3	X	X
ALB 30108 DAMASCO S.3	X	X
ALB 23108 G.CANDIDUM 2	X	X
ALB 30108 165	X	X
ALB 30108 52.37	X	X
ALB 30108 1.29	X	X
ALB 23108 A. ORYZAE	X	X
ALB 23108 M.MEIKEY 1	X	X
ALB 23108 BARU 13	X	X
ALB 13108 207	X	X
ALB 30108 2036 2036 SEC	X	X
LF APD 81	X	X
LF APD 62	X	X
LF APD AV 1	X	X
LF APD 250 T24	X	X
LF APD 485	X	X
LF APD M2	X	X
LF APD 38	X	X
LF APD 331	X	X
LF APD 54B	X	X

LF APD 49 PDA	X	X
LF APD 49 YM A	X	X
LF APD 49 YM B	X	X
LF APD 165	X	X
LF APD 207	X	x
LF APD 2188 A	X	X
LF APD 2188 B	X	X
LF APD C 514	X	X
LF APD 52	X	X
LF APD 27	X	X
LF APD 44	X	X
LF GM F1	X	X
LF GM F2	X	X
LF GM F3	X	X
LF GM F4	X	X
LF GM F5	X	X
LF GM F6	X	X
LF GM F7	X	X
Total	81 linhagens	

(X): linhagem utilizada no estudo de biotransformação ; (*): linhagem não utilizada no estudo de biotransformação.

2.3 Pré-inóculo

Cada linhagem foi repicada em meio Yeast-Malt (YM; g.L⁻¹: Glicose = 1,0; Peptona bacteriológica = 0,5; Extrato de Malte = 0,3; Extrato de Levedura = 0,3 e ágar = 2,0) e estocadas a 30°C em estufa bacteriológica por 72 horas até crescimento satisfatório. As linhagens com crescimento e pureza satisfatórios foram utilizadas para o preparo do inóculo para o processo de biotransformação.

2.4 Inóculo

Foi retirado 1cm² do ágar de cada placa com linhagens que apresentaram crescimento satisfatório em 72h. Em seguida o mesmo foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YM líquido para a homogeneização com Ultraturrax

(Ika, Wilmington, NC, USA), e incubado em shaker climatizado a 30°C a 150 rpm por 72 horas.

2.5 Processo de biotransformação

A biomassa crescida foi filtrada a vácuo com filtro Whatman nº 1 em condições estéreis e transferida para um erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio mineral (em g.L⁻¹: MgSO₄ = 0,5; NaNO₃ = 3,0; K₂HPO₄ = 1,0; KCl = 0,5 e Fe₂SO₄ = 0,01) . Foram adicionados 0.5% de α -pineno ou de *R*-(+)-Limoneno e o processo de biotransformação foi conduzido a 30°C, 150 rpm por 96 horas em shaker climatizado.

Foram selecionadas as linhagens de fungos capazes de resistir a concentração dos monoterpenos citados anteriormente em meio mineral, em que esses monoterpenos foram a única fonte de carbono e que demonstrassem a capacidade de utilizá-los como substratos para a produção de compostos de aroma com maior valor mercadológico.

Alíquotas de 500uL do meio de biotransformação foram retiradas e extraídas com igual volume de acetato de etila com 1% (v/v) de n-decano como padrão interno, sendo que 1µL foi injetado em diferentes tempos (0h, 24h, 48h, 72h, 96h) em cromatógrafo a gás para monitoramento do processo. Amostras controle foram realizadas em meio mineral com as concentrações de substratos anteriormente citadas, na ausência de biocatalisador.

2.6 Estudo da influência da idade no inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do α -pineno

Para verificar qual da idade do inóculo mais adequado ao processo de biotransformação de *S*-(-)- α -pineno buscou-se avaliar o potencial de produção de verbenona, cis-verbenol e mirtenol pela linhagem fúngica LBGM F6 em diferentes idades do inóculo.

O preparo dos inóculos deu-se em meio YM líquido a partir de 1cm² de uma placa de YM sólido com 72 horas de crescimento, como descrito no item 2.4. No estudo foram obtidos três inóculos: Inóculo A, com 48 h de crescimento em meio YM líquido; Inóculo B, com 72 horas de crescimento em meio YM líquido e Inóculo C, com 96 horas de crescimento em meio YM líquido. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7 Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de produtos de oxidação do alfa-pineno pela linhagem fúngica LB GM F6

Alguns autores sugerem que a indução pelo substrato na fase de crescimento pode aumentar os rendimentos em processos de biotransformação de compostos terpênicos (TAN, DAY, CADWALLADER, 1998; ADAMS, DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2003; FONTANILLE, LARROCHE, 2003). Dessa forma, durante o preparo do inóculo procedeu-se mais uma etapa, a adição de 0,1% de substrato (*S*-(-)- α -pineno) no meio YM líquido. Assim, foi avaliada a capacidade de biotransformação em diferentes idades de inóculo e sob indução enzimática pelo substrato.

2.8 Identificação e quantificação dos produtos de Biotransformação

As alíquotas do item anterior foram analisadas em 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 $\times$ 0.25 mm diâmetro interno $\times$ 0.25 μ m 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.

A quantificação foi realizada por curva de calibração contendo pontos de diferentes concentrações de padrões com elevada pureza para os substratos (*1S*)-(-)- α -pineno ou *R*-(+)-limoneno, e para os produtos de interesse *S*-(-)- verbenona, (*S*)-*cis*-verbenol, mirtenol e *R*-(+)- α -terpineol, utilizando acetato de etila como solvente e n-decano como padrão interno. Para que se estabeleça o efeito de matriz, correspondente a biomassa dos micro-organismos, foi realizada ainda curvas de quantificação em matriz (meio mineral juntamente com biomassa autoclavada) com quantidades definidas de substratos para a determinação da eficiência de extração e correção dos resultados.

Em paralelo foram realizadas análises das amostras em Cromatógrafo a gás acoplado a um Espectrômetro de Massas. 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 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 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 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$. 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

2.9 Planejamento Experimental e Estudo de Otimização do Processo Biotecnológico

Considerando a importância das variáveis tipicamente ligadas ao processo biotecnológico como temperatura, agitação, quantidade de biocatalisador e concentração de substrato avaliou-se a influência dessas variáveis na produção de derivados oxigenados pela linhagem de fungo LB GM F6 utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 4 variáveis, para que fossem estabelecidas as condições ótimas do processo a partir da análise do modelo de superfície de respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Os pontos centrais para o estudo de otimização possui condições padrão utilizados no processo de biotransformação e os seus valores encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional

Variáveis	Código	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
Inóculo ($\text{g}\cdot 50\text{ mL}^{-1}$)	X1	1	2	3	4	5
Substrato (% v/v)	X2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Agitação (rpm)	X3	50	100	150	200	250
Temperatura (°C)	X4	20	35	30	35	40

Tabela 3. Matriz DCCR 24 e seus respectivos níveis codificados.

Ensaio	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
25	0	0	0	0
28	0	0	0	0

2.10 Análise de Resultados

Os resultados foram analisados pelo software STATISTICA ® versão 12.0 considerando um nível de significância de 10 % ($p < 0,1$) para o DCCR. Esse nível está adequado para processos biotecnológicos segundo estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de linhagens fungicas para a biotransformação de α -Pineno

No screening realizado com 81 linhagens de fungos pertencentes à coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas, 5 linhagens se mostraram capazes de utilizar α -pineno como substrato para a produção de verbenona, contudo, apenas uma linhagem apresentou rendimento significativo, maior que 50 mg.L⁻¹ em 96 horas de processo. A linhagem LF GM F6, portanto foi escolhida para a realização de um estudo voltado a verificação das possíveis variáveis que poderiam afetar a produção de verbenona e outros derivados oxigenados como *cis*-verbenol e mirtenol.

3.2 Seleção de linhagens fungicas para biotransformação de *R*-(+)-limoneno

No screening realizado com 81 linhagens de fungos pertencentes a coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas, 3 linhagens se mostraram capazes de utilizar *R*-(+)-Limoneno como substrato para a produção de derivados oxigenados, como α -terpineol e limoneno-1,2-diol contudo, nenhuma das linhagens apresentou rendimento significativo, maior que 30 mg.L⁻¹ em 96 horas de processo e dessa não foram selecionadas para posteriores estudos.

3.3 Identificação e quantificação dos produtos de Biotransformação de α -pineno

Para a linhagem LB GM F6 foram identificados e quantificados três derivados oxigenados do α -pineno: *S-cis*-verbenol (tempo de retenção 5.3 minutos), mirtenol (tempo de retenção 5,7 minutos) e *S*-(-)-verbenona (tempo de retenção 5.9 minutos) (figura 10). A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos produtos observados com padrões de elevada pureza em Cromatógrafo a Gás com ionização por chama (CG-FID) e por comparação com a biblioteca NIST no Cromatógrafo a Gás acoplado a um analisador de Massas com ionização por elétrons (CG-MS) (Figura 11).

O processo de biotransformação foi conduzido durante 96 horas e as concentrações dos produtos observados foram aproximadamente: 61 mg.L⁻¹ de *cis*-verbenol, 24 mg.L⁻¹ de mirtenol e 66 mg.L⁻¹ de verbenona (valores já corrigidos considerando uma eficiência de extração de 59%).

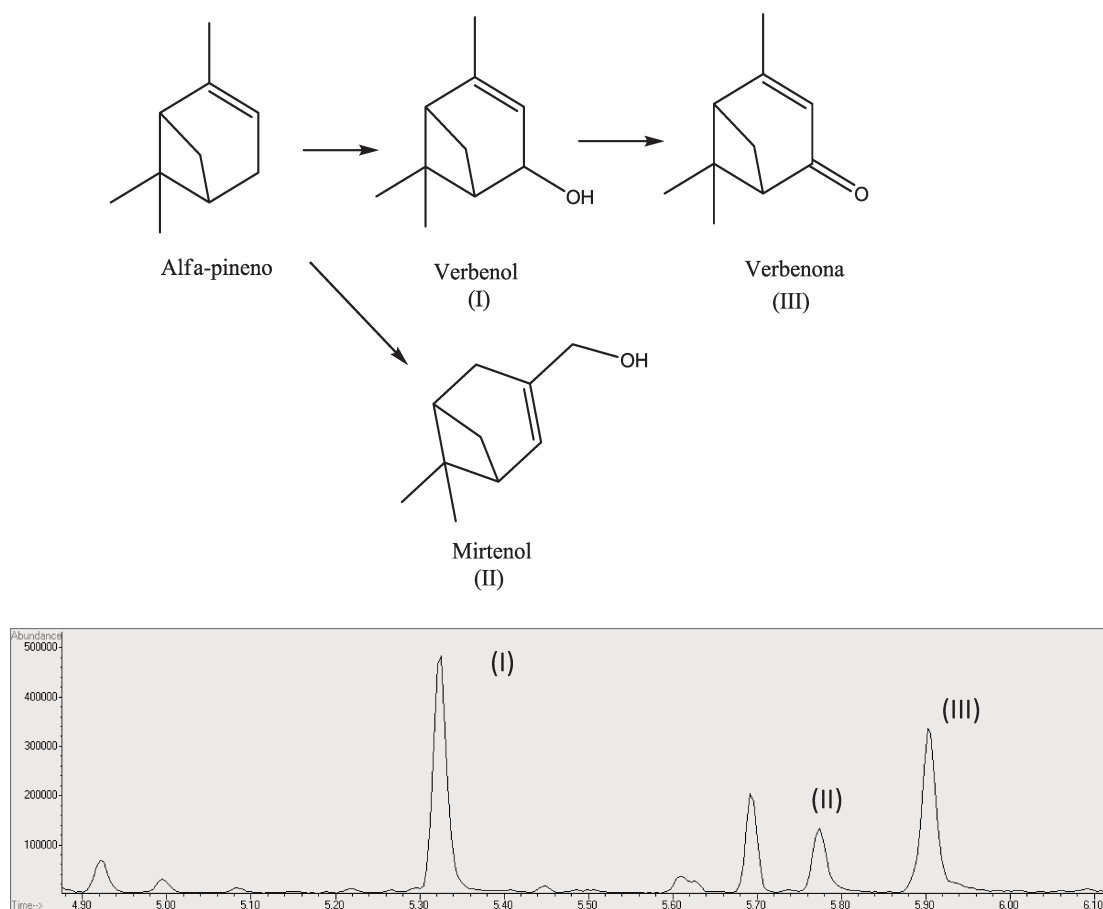
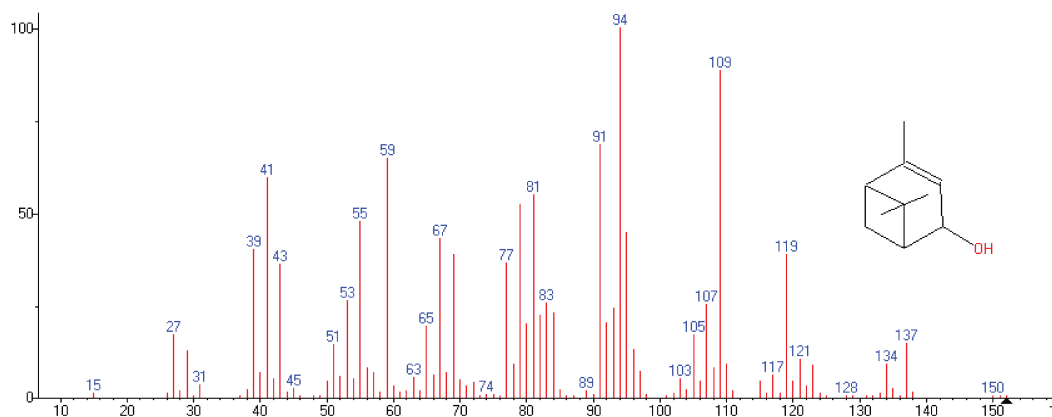
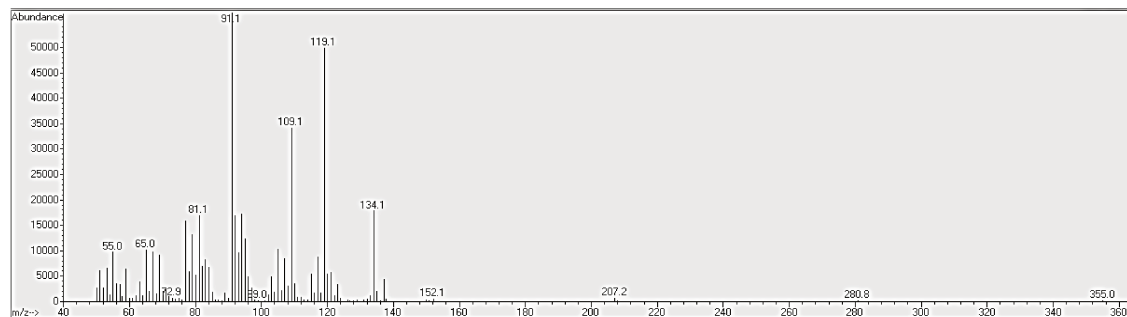


Figura 10. Cromatograma dos compostos produzidos a partir da biotransformação de α -pineno em 96h de processo em meio mineral, temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm, pela linhagem LBGM F6: I) *cis*-verbenol; II) mirtenol; III) verbenona.

Verbenol: 5.321 min



Mirtenol: 5.794 min

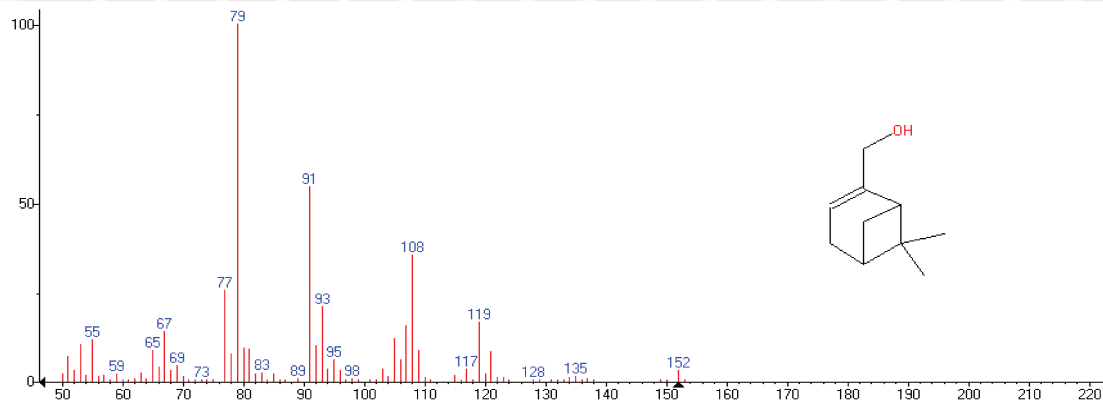
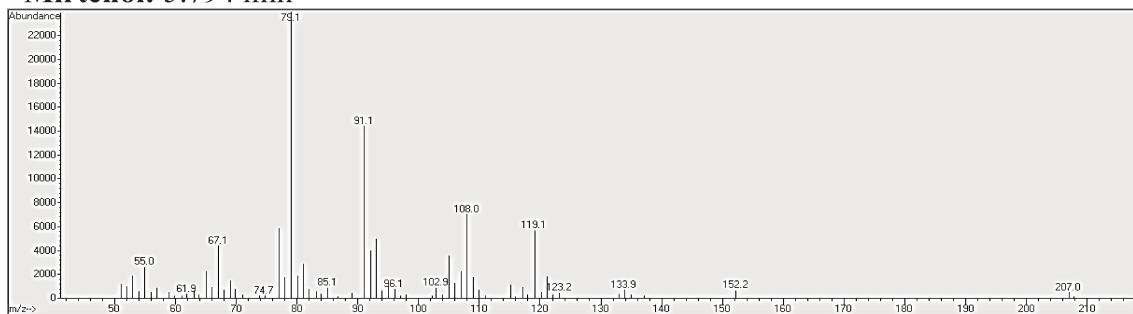


Figura 11. Espectro de Massas dos produtos de oxidação do α -pineno: verbenol; mirtenol e verbenona (continua na próxima página).

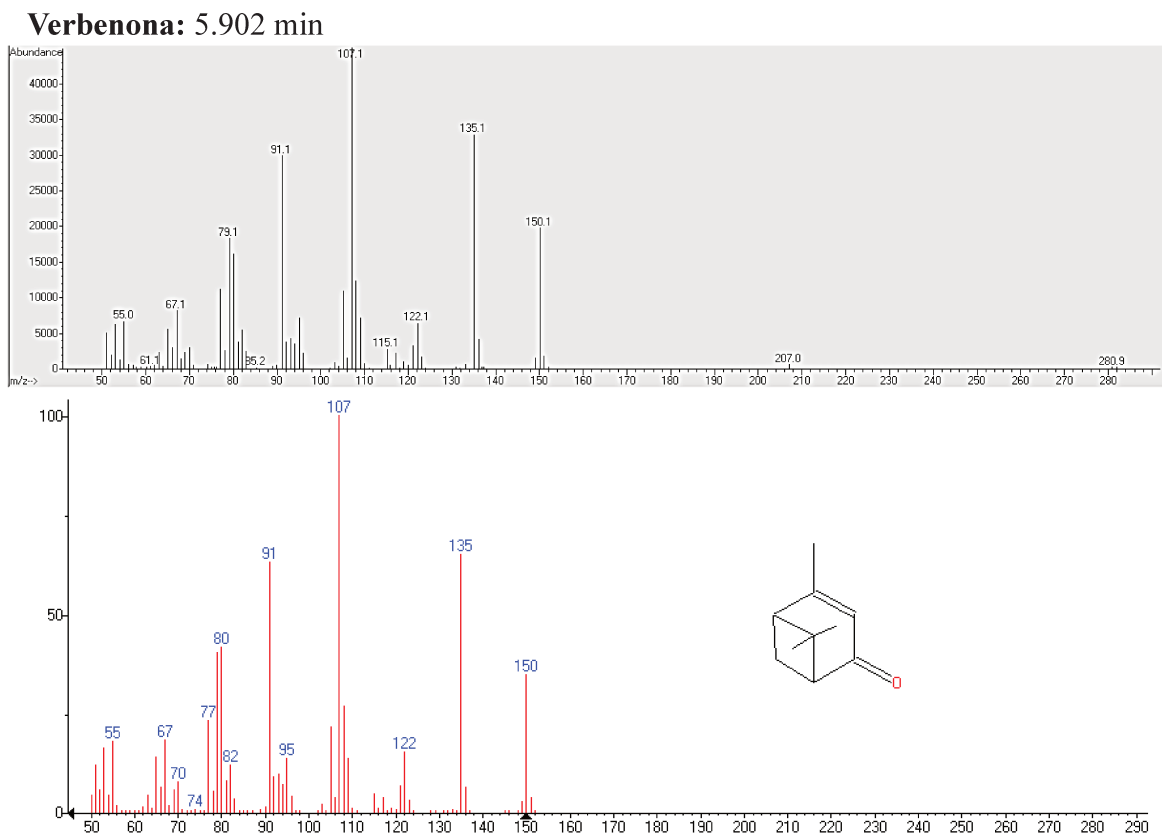


Figura 11. (continuação). Espectro de Massas dos produtos de oxidação do α -pineno: verbenol; mirtenol e verbenona.

3.4 Estudo da influência da idade no inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do α -pineno pela linhagem fúngica LB GM F6

O preparo dos inóculos deu-se em meio YM líquido a partir de 1cm^2 de uma placa com 72 horas de crescimento. No estudo foram obtidos três inóculos: Inóculo A, com 48 h de crescimento em meio YM líquido; Inóculo B, com 72 horas de crescimento em meio YM líquido e Inóculo C, com 96 horas de crescimento em meio YM líquido.

Observou-se que inóculo e pré inóculo com 72horas de cultivo foram os que apresentaram melhores resultados, e assim a padronização do processo de biotransformação foi para um inóculo com 72 horas de crescimento em meio YM líquido. A produção de verbenona foi de aproximadamente 66mg.L^{-1} , em torno de 8 vezes maior que do inóculo com 48 horas e 3 vezes superior a produção observada no inóculo com 96 horas de cultivo.

A idade do inóculo está associada ao desenvolvimento adequado da maquinaria enzimática, metabolismo e também a fatores adaptativos dos micro-organismos ao ambiente químico e físico imediato nos processos fermentativos (SEN; SWAMINATHAN, 2004). Dessa forma, percebe-se que as maiores concentrações dos produtos de oxidação de α -pineno ocorreram no inóculo com idade de 72 horas em 96 horas de processos de biotransformação caracterizando esse tempo como o mais adequado para a formação das enzimas responsáveis pelo processo de oxidação do substrato em questão.

Tabela 4. Efeito da idade do inóculo na formação de produtos de oxidação de α -pineno.

Idade do Inóculo	Verbenona (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
A (48h)	5,2± 1,2	6,7± 2,3	7,1± 1,6	8,3± 1,9
B (72h)	15,9± 2,4	24,7± 3,6	39,9± 5,9	65,8 ± 4,1
C (96h)	8,3± 3,1	13,7± 1,7	16,2± 2,5	20,3 ± 3,5

Idade do Inóculo	Verbenol (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
A	6.1± 2,6	8,9 ± 1,6	13,3± 3,2	14,1 ± 2,2
B	19,0± 1,1	28,2 ± 1,9	32,4± 2,2	61,1 ± 1,6
C	5,6 ± 1,4	6,8± 2,2	7,5 ± 1,5	9,7 ± 1,9

Idade do Inóculo	Mirtenol (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
A	N.D	N.D	A.D	6,6 ± 2,4
B	15,7± 1,2	17,8± 1,1	21,3± 1,9	25,6 ± 2,1
C	N.D	7,3 ± 2,6	10,5± 2,4	13,8 ± 3,2

N.D: Não detectado. A.D: Apenas detectado, não quantificado.

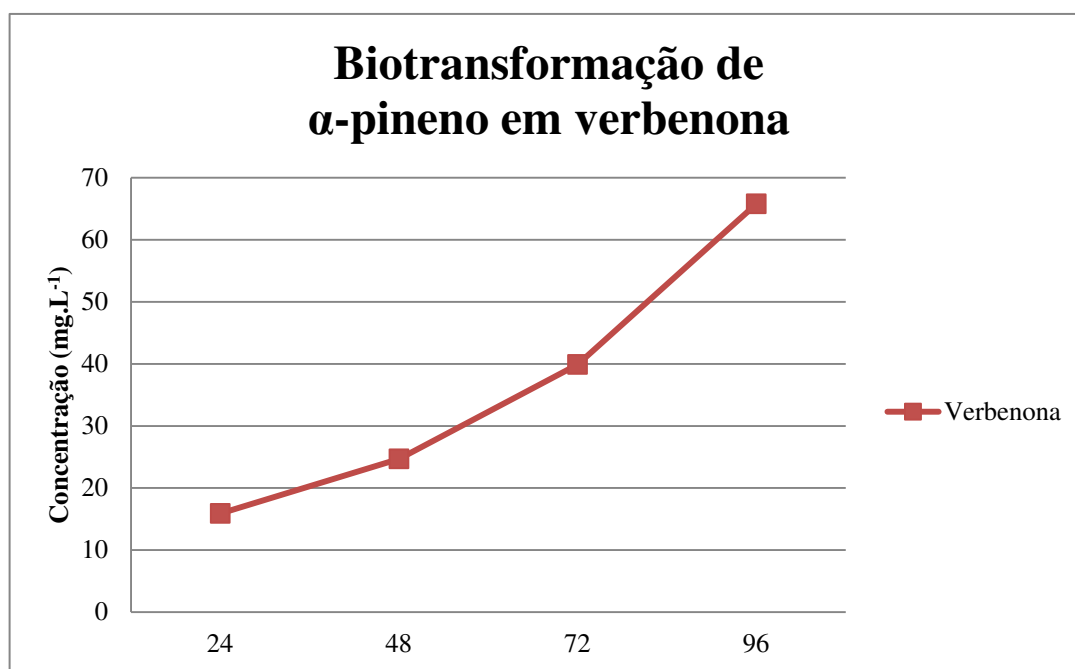


Figura 12. Produção de verbenona pela linhagem fúngica LBGMF6 em 96 horas de processo. Condições experimentais: 30°C, 150 rpm, 0,5% de substrato e inóculo de 72 horas.

3.5 Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de verbenona e outros produtos de oxidação do alfa-pineno pela linhagem LBGM F6

No presente trabalho, a indução enzimática não apresentou efeitos positivos para o aumento da produção de compostos aroma a partir de *S*-(-)- α -pineno. Houve uma redução de aproximadamente 44 % na concentração de *S*-(-)-verbenona com inóculo de 72 horas de idade em 96 horas de processo de biotransformação em meio mineral. No entanto o processo de conversão de *S*-(-)- α -pineno em verbenol pouco foi afetado para as mesmas condições. Assim, percebe-se que a indução enzimática não foi favorável nos estudos de biotransformação com a linhagem LB GM F6 e essa estratégia foi descartada nos estudos para o aumento da concentração dos compostos de aroma conduzidos posteriormente (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da indução enzimática e idade do inóculo na formação de produtos de oxidação de α -pineno.

Idade do Inóculo	Verbenona (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
A (48h)	N.D	N.D	N.D	N.D
B (72h)	10,1± 1,3	13,6± 1,9	24,8± 2,9	29,6 ± 2,2
C (96h)	N.D	11,2± 2,3	12,7± 2,8	14,3 ± 2,5

Idade do Inóculo	Verbenol (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
48h	N.D	N.D	N.D	N.D
72h	13,0± 2,3	18,2 ± 2,2	22,8± 2,8	28,9 ± 2,6
96h	N.D	6,8± 2,2	7,5 ± 1,5	9,7 ± 1,9

Idade do Inóculo	Mirtenol (mg.L ⁻¹)			
	24h	48h	72h	96h
48h	N.D	N.D	N.D	N.D
72h	N.D	N.D	12,6± 2,7	15,3 ± 2,8
96h	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D: Não detectado. A.D: Apenas detectado, não quantificado.

PARTE 2

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE VERBENONA UTILIZANDO LINHAGEM DE FUNGO ENDOFÍTICO LBGM F6 ISOLADO DA ROMÃ (*Punica granatum*)

1. Estudo de otimização

Para a otimização do processo biotecnológico de biotransformação de α -pineno em verbenona utilizando a linhagem fungica mais promissora encontrada no screening foi realizado um delineamento composto central rotacional de 4 variáveis, composto de 16 combinações possíveis para os dois níveis estudados, acrescidas de 8 ensaios correspondentes aos níveis axiais e mais 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios. Os resultados dos experimentos do DCCR são dados em relação à concentração (g.L^{-1}) de *S*-(-)-verbenona (Tabela 6). No estudo de otimização não foram consideradas as concentrações de *cis*-verbenol e mirtenol como variáveis dependentes, sendo assim, não serão utilizadas para a avaliação estatística pois as concentrações, da mesma forma como ocorreu no estudo de indução enzimática, foram afetadas sobremaneira sendo que esses compostos somente foram detectados em alguns dos ensaios, provavelmente por conta das diversas condições testadas e que afetaram a produção dos mesmos.

As variáveis estudadas foram: $\mathbf{x}_1$: Quantidade de Inóculo, em g.50 mL^{-1} ; $\mathbf{x}_2$: Quantidade de Substrato (*S*-(-)- α -pineno), em %v/v; $\mathbf{x}_3$: Agitação, em rpm e $\mathbf{x}_4$: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Buscou-se estabelecer as condições ótimas para essas variáveis no processo de biotransformação de α -pineno através da análise de superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas após o tratamento estatístico dos resultados obtidos no DCCR.

Observando os dados da Tabela 6, percebe-se consideráveis variações nas concentrações de verbenona nos ensaios tanto das combinações (ensaios 1 a 16) quanto dos pontos axiais (ensaios 17 a 24), revelando dessa forma que o extrapolamento nos níveis das variáveis estudadas é pertinente, uma vez que, permite avaliar o comportamento do

processo biotecnológico em condições diversas das usuais. Comparando-se os pontos centrais (ensaios 24 a 28), que representam as condições-padrão do processo, com os demais pontos observa-se em termos quantitativos que existem influências significativas na produção de verbenona quando diferentes combinações das variáveis são realizadas.

Tabela 6. Resultados do DCCR para a resposta Concentração de Verbenona (g.L^{-1}).

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	Concentração de Verbenona (g.L^{-1})
1	-1	-1	-1	-1	0,01418
2	+1	-1	-1	-1	0,01912
3	-1	+1	-1	-1	0,02506
4	+1	+1	-1	-1	0,02646
5	-1	-1	+1	-1	0,05884
6	+1	-1	+1	-1	0,04055
7	-1	+1	+1	-1	0,07455
8	+1	+1	+1	-1	0,07579
9	-1	-1	-1	+1	0,03182
10	+1	-1	-1	+1	0,03607
11	-1	+1	-1	+1	0,03618
12	+1	+1	-1	+1	0,03825
13	-1	-1	+1	+1	0,03464
14	+1	-1	+1	+1	0,06473
15	-1	+1	+1	+1	0,10168
16	+1	+1	+1	+1	0,09498
17	-2	0	0	0	0,03754
18	+2	0	0	0	0,06112
19	0	-2	0	0	0,03909
20	0	+2	0	0	0,03622
21	0	0	-2	0	0,01407
22	0	0	+2	0	0,10614
23	0	0	0	-2	0,04829
24	0	0	0	+2	0,02304
25	0	0	0	0	0,06173
26	0	0	0	0	0,06051
27	0	0	0	0	0,06136
28	0	0	0	0	0,06149

A análise dos coeficientes de regressão está na tabela 7 e revelam juntamente com p -valor quais são os parâmetros estatisticamente significativos e que farão parte do modelo matemático predito para o processo de biotransformação de α -pineno em verbenona.

A significância de cada coeficiente foi determinada pelo p -valor e pelo teste de t -Student. Quanto maior for a magnitude em módulo do valor de t obtido em relação ao valor de t tabelado e menor o valor de p , mais significativo é o coeficiente correspondente. Isto implica que os efeitos linear e quadrático para a variável x_2 (substrato) foram significativos considerando um intervalo de confiança de 90 %. Além disso, os efeitos linear da variável x_3 (agitação) e quadrático da variável x_4 (temperatura) também foram significativos. Em termos de interações entre as variáveis a análise estatística mostrou que a interação entre as variáveis x_2 e x_3 também foram significativos a 10% de significância.

Tabela 7. Mínimos quadrados e significância dos coeficientes de regressão dos parâmetros do modelo (96 horas de biotransformação).

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(13)	p -valor
Média	0,061273	0,006944	8,82359	0,000001
I	0,002757	0,002835	0,97243	0,348583
I ²	- 0,002549	0,002835	- 0,89928	0,384859
S	0,006969	0,002835	2,45826	0,028763
S²	- 0,005468	0,002835	- 1,92884	0,075873
A	- 0,020948	0,002835	7,38937	0,000005
A ²	0,000144	0,002835	0,05092	0,960167
T	0,002221	0,002835	0,78342	0,447418
T²	- 0,005966	0,002835	- 2,10433	0,055376
I x S	- 0,001436	0,003472	- 0,41360	0,685907
I x A	- 0,000395	0,003472	- 0,11382	0,911121
I x T	0,002526	0,003472	0,72753	0,479797
S x A	0,007718	0,003472	2,22278	0,044590
S x T	0,002166	0,003472	0,62396	0,543449
A x T	- 0,000700	0,003472	- 0,20166	0,843302

t(13) = valor t de Student para 13 graus de liberdade; I = inóculo; S = substrato; A = agitação; T = temperatura. Em negrito e vermelho os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para o modelo.

Após a determinação dos coeficientes de regressão, foi possível montar o modelo incluindo somente os termos significativos, com um nível de significância de 0,10 representado na equação abaixo:

$$\text{Concentração de verbenona (g.L}^{-1}\text{)} = 0,061273 + 0,006969x_2 - 0,005468x_2^2 - 0,020948x_3 - 0,005966x_4 + 0,007718x_2x_3$$

Com o objetivo de verificar a validade do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi feita considerando apenas as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,10$) da tabela 7.

Tabela 8. ANOVA do modelo quadrático

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F calculado	<i>p</i> -valor
Regressão	0,013908	5	0,002782	19,18345	0,044
Resíduos	0,003200	22	0,000145		
Total	0,017108	27		$F_{0,90(5,22)} = 2,13$	
R²	0,81				

SQ= Soma dos quadrados; gl= graus de liberdade; QM: Quadrados médios

A tabela de ANOVA (Tabela 8) demonstrou que o modelo quadrático ajustado para as respostas do processo é satisfatório. O coeficiente de determinação (R^2) para a concentração de verbenona foi igual a 81,29 %, apesar de não ideal esse valor é perfeitamente aceitável para sistemas biológicos (RODRIGUES; IEMMA, 2005). O teste F foi altamente significativo, em que o valor de F calculado (19,183) mostrou-se nove vezes maior que o respectivo valor de F tabelado para 5 graus de liberdade da regressão e 22 graus de liberdade dos resíduos, $F_{5,22} = 2,13$, enquanto que o *p*-valor do modelo mostrou-se menor que 0,1. Portanto, a equação do modelo é válida e pode ser graficamente representada por meio de superfícies de respostas e as respectivas curvas de contorno (figura 13).

A análise das superfícies de respostas, figura 13a e 13b, permite verificar que quando o substrato está em torno de 0,6% e o inóculo na faixa de 3 a 4 gramas, a produção

de verbenona foi em torno de 60 mg.L^{-1} . As figuras 13c e 13d mostram os efeitos da agitação e da quantidade de inóculo, indicando que em valores superiores a 250 rpm e 3 a 4 gramas de inóculo a produção de verbenona seria superior a 100 mg.L^{-1} . A análise das figuras 13e e 13f mostra que as faixas de temperatura e inóculo ótimas são em torno de 33°C e 3,0 a 4,5 gramas de inóculo.

Na figura 13g e 13h, observa-se que em valores maiores que 250 rpm de agitação e concentrações superiores a 0,7 % de substrato seria possível alcançar uma concentração de verbenona maior que 140 mg.L^{-1} . A figura 13i e 13j, mostra que a faixa ótima em relação a temperatura e substrato é aquela que está em torno de 30°C e 0,6% de substrato. Já a ultima figura, 13k e 13l mostram novamente que em valores superiores de agitação haveria um incremento na produção de verbenona, em uma temperatura em torno de 30°C , confirmando que essa temperatura seria a mais adequada para o processo.

Para validar as condições ótimas resultantes da análise das superfícies de respostas foi realizado o processo de biotransformação em triplicata utilizando 0,6% de substrato, 30°C , 4g de inóculo e 30°C , e considerando a inviabilidade operacional de agitações maiores que 250 rpm para o processo envolvendo fungos, o valor de 250 rpm foi fixado. Obteve-se em torno de $97,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de verbenona nessas condições. Esse valor é aproximadamente 10 % menor que a concentração obtida no ensaio 22 do DCCR (3,0 g de inóculo, 0,5% de substrato, 250 rpm e 30°C). A validação é aceitável pois a agitação não foi superior ao recomendado após a análise das superfícies de respostas resultantes da otimização (maior que 250 rpm), além de considerar o fato de que a biomassa utilizada sofreu influência inter-dia já que houve novo preparo da mesma e ainda considerando que existem fatores adaptativos relacionados a sensibilidade do micro-organismo nesse tipo de processo, o que compromete a uniformidade dos resultados.

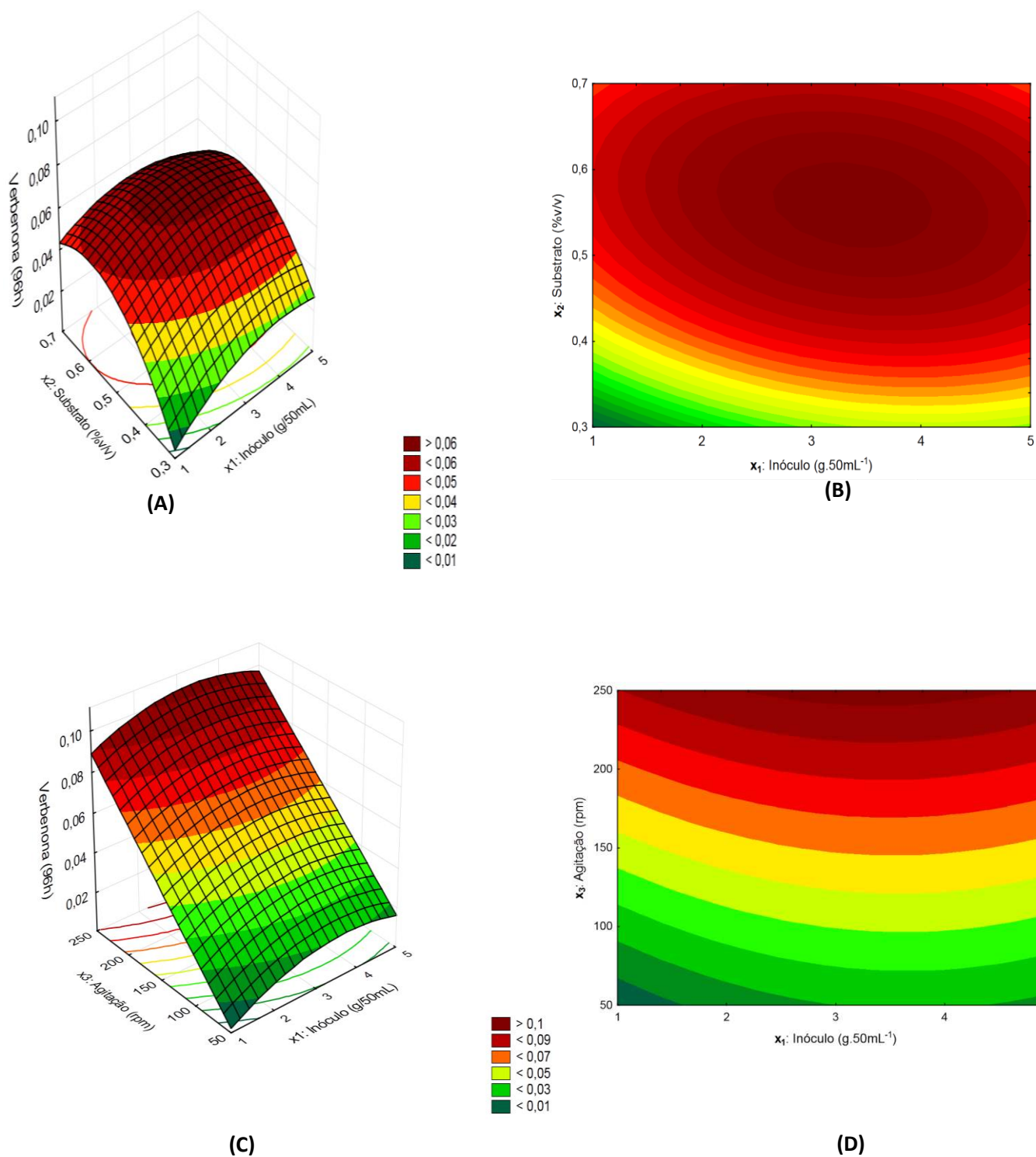
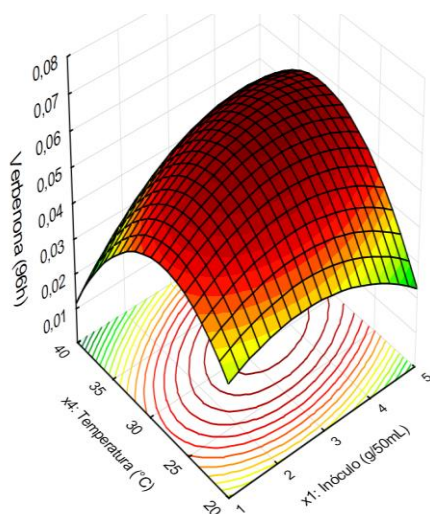
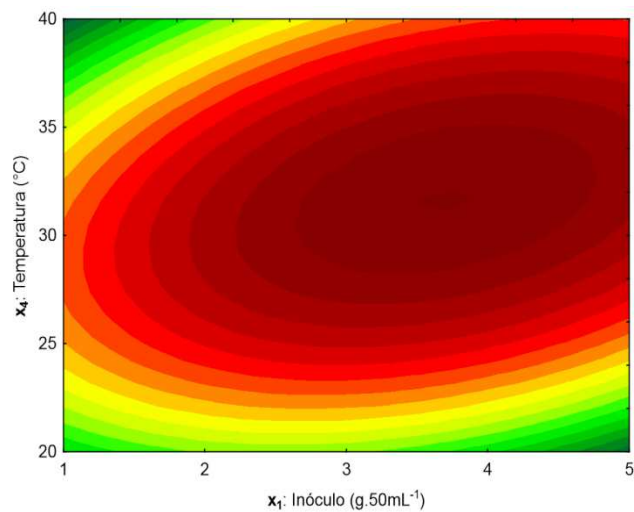
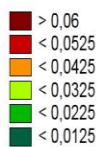


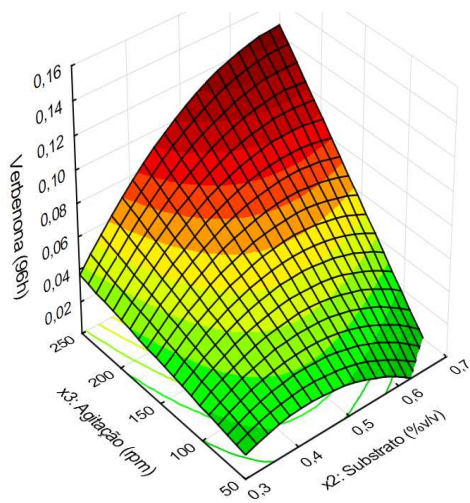
Figura 13. Superfícies de respostas e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).



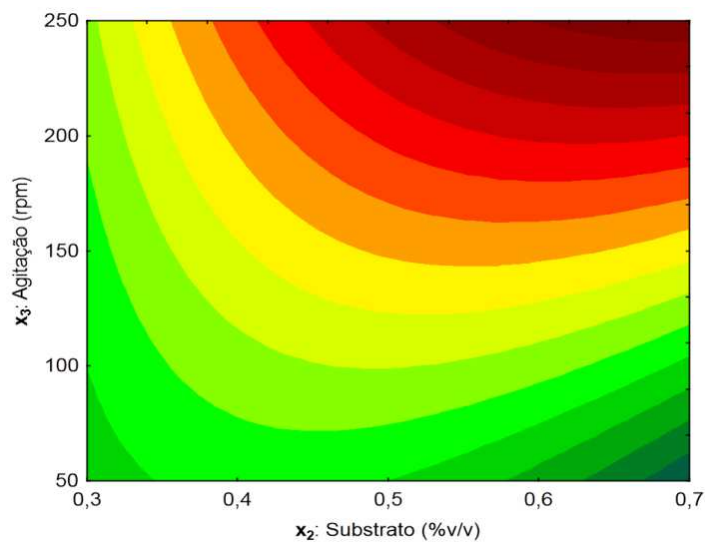
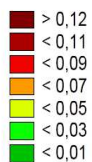
(E)



(F)

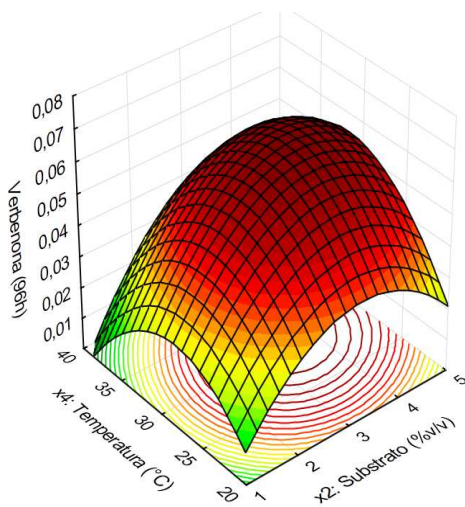


(G)

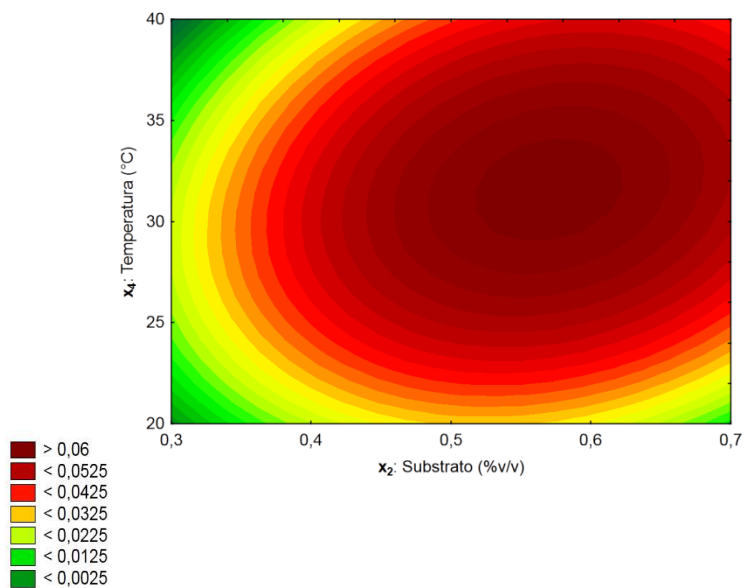


(H)

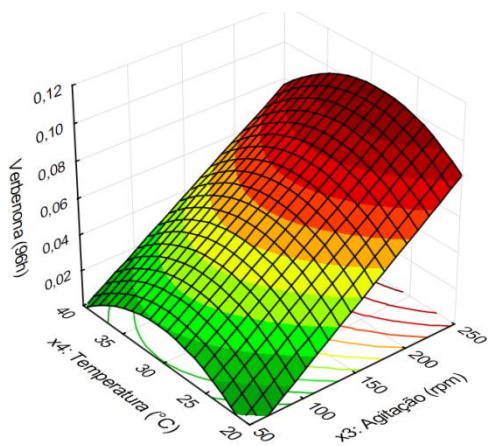
Figura 13. Superfícies de respostas e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).



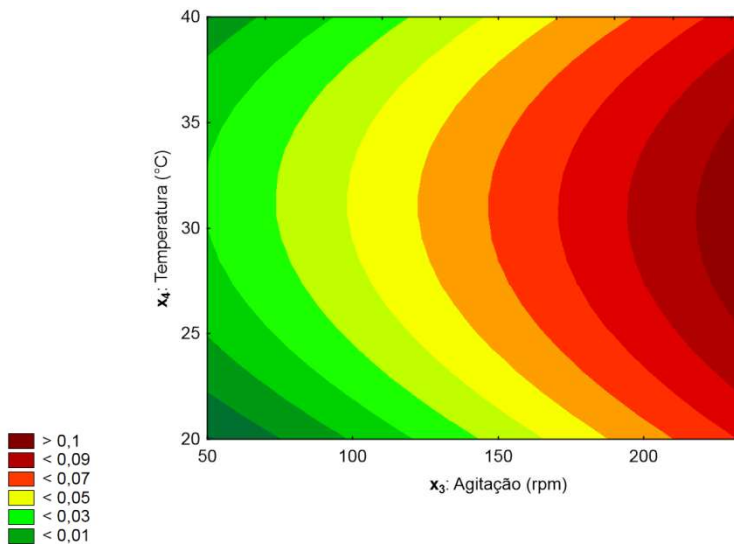
(I)



(J)



(K)



(L)

Figura 13. Superfícies de respostas e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).

2. Conclusão

O estudo de otimização utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional para a produção biotecnológica de verbenona a partir de *S-(-)-α-pineno* foi descrito pela primeira vez. De acordo com as superfícies de respostas e curvas de contorno as melhores condições para a maior produção de verbenona seriam 30°C, 3 a 4g de inóculo, 0,6 % de substrato e agitações superiores a 250 rpm.

Considerando as faixas utilizadas no estudo e os resultados obtidos, percebe-se que o nível superior de agitação testado não abrangeu o valor ótimo, sendo necessário a primeira vista o aumento da agitação para valores maiores que 250 rpm. Contudo, agitação superior a esse valor, pode ter impacto negativo uma vez que se trata de uma linhagem fúngica e agitações elevadas poderiam comprometer a integridade do micélio e por consequência inviabilizando o processo. Além disso, uma faixa de agitação superior a 250 rpm é desvantajosa em termos operacionais.

Nas condições validadas: 0,6% de substrato, 30° C, 250 rpm e 4g de inóculo houve um aumento em torno de 30% na produção inicial de verbenona, sendo isso um incremento considerável no processo e que foi alcançado graças a utilização do DCCR, demonstrando dessa maneira a utilidade do planejamento experimental e a otimização de processos na área de biotecnologia.

A linhagem utilizada no estudo (LBGM F6) já está em processo de identificação.

3. Referências

- ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*- investigation of the culture conditions. *Food Chemistry*. v. 80, pp. 525-534, 2003.
- AGRAWAL, R.; DEEPIKA, N.U.A.; JOSEPH, R. - Strain improvement of *Aspergillus* sp. And *Penicillium* sp. by Induced Mutation for Biotransformation of α -pinene to Verbenol. *Biotechnology Bioengineering*, v. 63, p. 249-252, 1999.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *The Journal of Antibiotics*, v. 58, p. 1–26, 2005.
- BICAS, J.L. Estudos de obtenção de compostos de aroma pela biotransformação de compostos terpênicos. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. - Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, p.669-674, 2007.
- BORGES, W. DE; BORGES, K.; BONATO, P.; SAID, S.; PUPO, M. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. *Current Organic Chemistry*, v.13, p. 1137-1163, 2009.
- DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi- Study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.11, pp. 265-270, 2001.
- FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, p. 235-240, 2006.

FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Optimization of isonovalal production from α -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.60, pp.534-540, 2003.

GÉNIE, L. DE; PASCAL, C. B.; LANDAIS, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.

GHORAI, SHAKUNTALA.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v.42, p. 577-587, 2009.

HUNTER, A.C.; WATTS, K.R.; DEDI, C.; DODD, H.T. An unusual ring-A opening and other reactions in steroid transformation by the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.116, p.171-177, 2009.

KRINGS, U.; HARDEBUSCH, B.; ALBERT, D.; BERGER, R.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Odor-active Alcohols From the Fungal Transformation of α -Farnesene. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p. 9079-9084, 2006.

KRISTAN; K.; RIŽNER, T.L. Steroid-transforming enzymes in fungi. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.129, p. 79-91, 2012.

KUMAR, R.; HARI, A.; MEENAKSHI, N. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v. 3, p.1756-1763, 2011.

NAKADAI, T.; NASUNO, S.; IGUCHI, N. Purification and properties of alkaline proteinase from *A. oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 37, p.2685–2694, 1973.

NOMA, Y.; YAMASAKI, S.; ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*, v.31, pp.2725-2727, 1992.

PARANTHAMAN, R.; VIDYLAKSHMI, R.; MURUGESH, S.; SINGARAVADIVEL, K. Optimization of various culture media for tannase production in submerged fermentation by *Aspergillus flavus*. *Advances in Biological Research*, v.3, p.34-39, 2009.

PUPO, M.T.; BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; BONATO, P.S. Fungal Biotransformations: a Powerful Tool in Drug Metabolism Studies; Saikai, R.; Bezbaruah, R.L.; Bora, T.Ch., Ed.; *Microbial Biotechnology*, New India Publishing Agency: New Delhi. p. 47-66, 2008.

RAMÍREZ-CORONEL, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; DARVIL, A.; AUGUR, C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with B-glucosidase activity. *Microbiology*, v.149, p.2941-2946, 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. – Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma Estratégia Seqüencial de Planejamentos. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005.

ROTTAVA, I.; CORTINA, P.F.; MARTELLO, E.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; ANTUNES, O.A.C.; OESTREICHER, E.G.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. Optimization of α -terpineol production by biotransformation of R-(+)-Limonene and (-)-B-Pinene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 164, pp.514-523, 2011.

SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; SAXENA, S.; GULATI, R. Role of fungal enzymes in food processing. *Applied Mycology and Biotechnology*, v.1, p.353-386, 2001.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*. v.21, pp.141-148, 2004.

SHIBUYA, H.; KITAMURA, C.; MAEHARA, S.; NAGAHATA, M.; WINARNO, H.; SIMANJUNTAK, P.; KIM, H-S.; WATAYA, Y.; OHASHI, K. Transformation of Cinchona alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Cinchona pubescens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.51, p.71-74, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, v.23, p. 09-19, 2009.

TAN, Q.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* NRRL 1202. *Process Biochemistry*. v.33, pp.29-37, 1998.

TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnology Letters*. v.27, pp.149-153, 2005.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -TERPINEOL A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE *R*-(+)-LIMONENO POR LINHAGEM DE *BACILLUS TEQUILENSIS*

**Bruno Nicolau Paulino¹, Gustavo Molina², Marina Gabriel Pessoa¹, Meissa Rocha
Essenfelder Abrahão¹, Gláucia Maria Pastore¹**

¹ Laboratório de Bioaromas, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n° 80, CEP 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

² Instituto de Ciência e Tecnologia, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Rodovia MGT 367-Km 583 n°5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

O α -terpineol é um monoterpenóide comercialmente valorizado e utilizado na indústria de cosméticos e higiene pessoal. Além disso, é descrito na literatura diversas propriedades biológicas para esse composto e pode ser produzido via biotecnológica a partir de *R*-(+)-limoneno. Esse capítulo traz um estudo de otimização do processo de bioconversão de *R*-(+)-limoneno à α -terpineol utilizando uma linhagem bacteriana de *Bacillus tequilensis* isolado de resíduos de processamento de frutas cítricas. A produção de α -terpineol em estudos preliminares era de em torno de 25 mg.L⁻¹ e após a otimização e validação do processo nas condições consideradas ótimas por meio da análise de superfícies de respostas para esse linhagem, foi aumentada para 85 mg.L⁻¹. Portanto, a aplicabilidade de ferramentas estatísticas em processos biotecnológicos de produção de aromas é vantajosa e permite o aumento de rendimento em estudos de escala laboratorial, permitindo assim possíveis aplicações em estudos de *scale-up*.

1. Introdução

O primeiro relato da biotransformação de limoneno em α -terpineol foi em 1969, por uma linhagem de *Cladosporium* sp (KRAIDMAN, MUKHERJEE, HILL, 1969). Desde então inúmeros estudos avaliaram o potencial de biotransformação para vários tipos de micro-organismos, principalmente fungos e bactérias (TRYTEK, FIEDUREK, 2005; BICAS, 2009; BICAS *et al.*, 2008; MOLINA *et al.*, 2013).

O α -terpineol é um monoterpenóide cíclico hidroxilado, incolor e de aroma ligeiramente adocicado valorizado comercialmente e utilizado na indústria de cosméticos e higiene pessoal (BAUER, GARBE, SURBURG, 2001; MAROSTICA; PASTORE, 2007; BHATIA; LETIZIA; API, 2008). Está presente em teores de 3 a 4% em óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Salvia officinalis* e *Carthamus tinctorius* (BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX, 1949; KANAT; ALMA, 2004; HARRATHI *et al.*, 2012). Além da sua valorização como composto de aroma, recentes estudos evidenciaram importantes atividades biológicas do α -terpineol, como atividade antioxidante, antiproliferativa, atividade antimicrobiana e antimutagênica (MARÓSTICA JR. *et al.*, 2009; BICAS *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2012; KUREKCI *et al.*, 2013; ZHOU;TAO; JIA, 2014; DI SOTTO *et al.*, 2013)

Recentemente, alguns dos processos de biotransformação de limoneno em α -terpineol tiveram suas condições otimizadas através de técnicas de planejamento experimental e seus rendimentos foram aumentados significativamente (BICAS *et al.*, 2008; ROTTAVA *et al.*, 2011). Dessa forma, a utilização de ferramentas estatísticas se mostra promissora sob o ponto de vista de aumento de rendimento uma vez que possibilita a determinação de condições ótimas nos processos de bioconversão.

Portanto, estudos de otimização de processos que utilizam substratos monoterpênicos como o *R*-(+)-limoneno para a produção de α -terpineol, são sem dúvida uma importante abordagem na área de biotecnologia, visto que os substratos são de baixo custo e uma vez estabelecidas às condições ótimas do processo, é possível a obtenção um composto valorizado comercialmente, considerado natural e com atividades biológicas.

Assim o objetivo desse capítulo foi o estudo da otimização da produção de α -terpineol a partir de *R*-(+)-limoneno utilizando uma linhagem bacteriana LB285JLB isolada de resíduos de processamento de frutas cítricas e resistente a altas concentração de *R*-(+)-limoneno.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os substratos utilizados no estudo de biotransformação foi (*R*)-(+)-Limoneno (Sigma-Aldrich, $\geq 93\%$ de pureza) e padrão utilizado para confirmação do produto foi o *R*-(+)- α -terpineol (Fluka, 99% de pureza).

Para a extração dos compostos de biotransformação, foi utilizado acetato de etila P.A.(Synth) com 1% de n-Decano (Sigma-Aldrich,>99% de pureza) como padrão interno.

2.2 Manutenção e crescimento da linhagem bacteriana

A linhagem bacteriana foi obtida da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas. Essa linhagem vem de um estudo prévio de isolamento de micro-organismos de resíduos de processamento e se mostrou resistente em concentrações maiores que 2% de limoneno (BICAS; PASTORE, 2007). A linhagem foi crescida e estocada em placa contendo meio YM.

2.3 Identificação da linhagem por sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S

A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da cultura, segundo protocolo descrito por Van Soolinger *et al.* (1993). Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p10f e p1100r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.

Os produtos da amplificação foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os primers utilizados para o sequenciamento foram 10f e 1100r.

As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados à linhagem LB285JLB para realização das análises filogenéticas.

As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMSON *et al.*, 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.00 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

2.4 Preparo do biocatalisador bacteriano

Pré-inóculo foi preparado a partir da transferência de três alçadas de uma cultura em meio sólido de 24 horas de idade para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YM líquido. Em seguida, o meio foi incubado a 30 ° C e 150 rpm durante 24 horas, para atingir uma densidade óptica, cerca de 3 a 600 nm (OD600).

Vinte mililitros do pré-inóculo foram transferidos assepticamente para um erlenmeyer de 500 mL com 180 mL de meio mineral (em g L⁻¹, NaNO₃: 3,0; K₂HPO₄: 1,0; MgSO₄ • 7H₂O: 0,5; KCl: 0,5; Fe₂SO₄: 0,01) e 1% de *R*-(+)-limoneno como única fonte de carbono. Novamente procedeu-se a incubação a 30 ° C e 150 rpm em shaker climatizado, até um crescimento satisfatório.

Após atingir um crescimento satisfatório o meio com micro-organismo foi centrifugado (2600g) durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e a biomassa resultante

foi re-suspensa em 50 mL de tampão fosfato (20 mmol.l⁻¹) pH 7,5 e utilizado como biocatalisador no processo de biotransformação.

2.5 Otimização da Produção de α -terpineol

Para a otimização do processo biotecnológico de biotransformação de *R*-(+)-limoneno em α -terpineol utilizando a linhagem bacteriana LB285JLB, foi desenvolvido um Delineamento Composto Central Rotacional de 4 variáveis, composto de 16 combinações possíveis para os dois níveis estudados, acrescidas de 8 ensaios correspondentes aos níveis axiais e mais 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios. As variáveis estudadas foram: **x₁** : Quantidade de Substrato (*R*-(+)-limoneno) , em %v/v; **x₂**: Quantidade de Inóculo, em DO₆₀₀; **x₃**: Temperatura (°C) e **x₄**: Agitação, em rpm (Tabela 9).

Tabela 9. Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional para Otimização da produção de α -terpineol.

Variáveis	Código	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
Substrato (%v/v)	X1	0,2	0,6	1	1,4	1,8
Inóculo (DO ₆₀₀)	X2	2	4	6	8	10
Temperatura (°C)	X3	20	25	30	35	40
Agitação (rpm)	X4	0	75	150	225	300

Os resultados dos experimentos do DCCR são dados em relação à concentração (g.L⁻¹) de α -terpineol (Tabela 10).

Buscou-se estabelecer as condições ótimas para essas variáveis na produção de α -terpineol a partir da análise de superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas após o tratamento estatístico dos resultados obtidos no DCCR.

Tabela 10. Resultados do DCCR para a resposta Concentração de α -Terpineol em 72 horas de processo.

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Concentração de α - Terpineol (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	0,006
2	+1	-1	-1	-1	0,006
3	-1	+1	-1	-1	0,014
4	+1	+1	-1	-1	0,007
5	-1	-1	+1	-1	0,022
6	+1	-1	+1	-1	0,003
7	-1	+1	+1	-1	0,017
8	+1	+1	+1	-1	0,003
9	-1	-1	-1	+1	0,069
10	+1	-1	-1	+1	0,029
11	-1	+1	-1	+1	0,075
12	+1	+1	-1	+1	0,045
13	-1	-1	+1	+1	0,031
14	+1	-1	+1	+1	0,019
15	-1	+1	+1	+1	0,027
16	+1	+1	+1	+1	0,018
17	-2	0	0	0	0,015
18	+2	0	0	0	0,027
19	0	-2	0	0	0,020
20	0	+2	0	0	0,035
21	0	0	-2	0	0,018
22	0	0	+2	0	0,040
23	0	0	0	-2	0,002
24	0	0	0	+2	0,082
25	0	0	0	0	0,051
26	0	0	0	0	0,055
27	0	0	0	0	0,059
28	0	0	0	0	0,058

A análise estatística dos dados experimentais e a obtenção das superfícies de resposta foram realizadas no software Statistica 12.0 (StatSoft Inc, Oklahoma, USA).

2.6 Quantificação e identificação de α -terpineol

Alíquotas de 500 μ L foram retiradas em diferentes tempos do processo e foram analisadas em 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 $\times$ 0.25 mm diâmetro interno $\times$ 0.25 μ m 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.

A quantificação foi realizada por curva de calibração contendo pontos de diferentes concentrações de *R*-(+)-Limoneno e *R*-(+)- α -terpineol, utilizando acetato de etila como solvente e n-decano como padrão interno. O efeito de matriz foi determinado através de curva com os reagentes citados acima em meio de biotransformação contendo biomassa autoclavada do micro-organismo.

Para a identificação do produto de biotransformação, foi utilizado um Cromatógrafo a gás acoplado a um Espectrômetro de Massas. 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 μ m 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.

3. Resultados e Discussão

3.1 Identificação do micro-organismo

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem LB285JLB apresentou 100% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Bacillus subtilis*, *B. tequilensis* e *B.licheniformis*, além de similaridade com sequências de várias linhagens de *Bacillus* sp. contidas nas bases de dados consultadas.

A análise filogenética (Figura 14) recuperou a linhagem LB285JLB em um agrupamento com a linhagem tipo de *Bacillus tequilensis*, identificando a linhagem em nível de espécie.

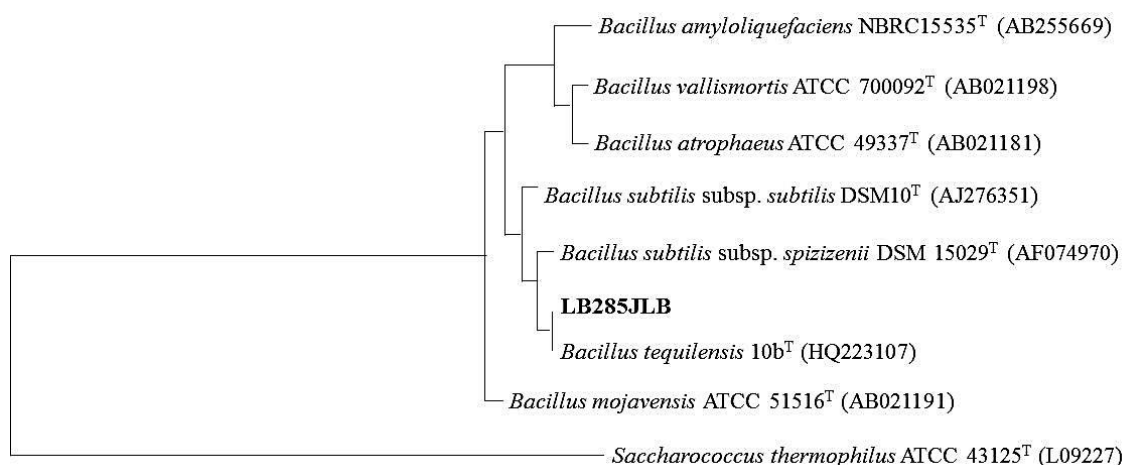


Figura 14. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência do gene RNA ribossomal 16S da linhagem LB285JLB e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.

3.2 Otimização do processo de biotransformação

A análise dos coeficientes de regressão (Tabela 11) revela juntamente com os valores de *p*-valor quais são os parâmetros estatisticamente significativos e que farão parte do modelo matemático predito para o processo de produção de α -terpineol.

A significância de cada coeficiente foi determinada pelo p -valor e pelo teste de t -Student. Quanto maior for a magnitude em módulo do valor de t obtido em relação ao valor de t tabelado e menor o valor de p , mais significativo é o coeficiente correspondente.

Dessa forma, considerando os critérios acima discutidos, percebe-se que apenas o efeito linear da variável agitação (A) e os efeitos quadráticos para as variáveis substrato (S^2), quantidade de inóculo (I^2) e temperatura (T^2), além da interação temperatura x agitação ($T \times A$) foram estatisticamente significativos.

Tabela 11. Mínimos quadrados e significância dos coeficientes de regressão dos parâmetros do modelo (72 horas de biotransformação).

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(13)	p -valor
Média	0,055750	0,006909	8,43510	0,000001
S	- 0,004458	0,002698	- 1,65232	0,122404
S^2	-0,009594	0,002698	- 3,55557	0,003519
I	0,002125	0,002698	0,78755	0,445081
I^2	- 0,007969	0,002698	-2,95332	0,011200
T	- 0,02792	0,002698	- 1,03463	0,319706
T^2	0,007594	0,002698	- 2,81434	0,014623
A	0,016458	0,002698	6,09068	0,000038
A^2	- 0,004344	0,002698	- 1,60985	0,131434
S x I	0,000687	0,003305	0,20804	0,838421
S x T	0,001438	0,003305	0,43499	0,670701
S x A	- 0,003188	0,003305	- 0,96455	0,352370
I x T	0,002563	0,003305	0,77542	0,451965
I x A	0,000813	0,003305	0,24587	0,809625
T x A	- 0,008438	0,003305	- 2,55322	0,024045

t(13) = valor t de Student para 13 graus de liberdade; I = inóculo; S = substrato; A = agitação; T = temperatura. Em negrito e vermelho os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0.05$) para o modelo.

Após a determinação dos coeficientes de regressão, foi possível elaborar o modelo reparametrizado, com um nível de significância de 0,05 representado na equação abaixo:

$$\text{Concentração de } \alpha\text{-terpineol (g.L}^{-1}\text{)} = 0,055750 - 0,009594x_1^2 - 0,007969x_2^2 - 0,007594x_3^2 + 0,016458x_4 - 0,008438x_3x_4$$

Para verificar a validade do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando apenas as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) da tabela 11.

Tabela 12. ANOVA do modelo quadrático.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F calculado	<i>p</i> -valor
Regressão	0,011251	5	0,002250	15,5172	<0,001
Resíduos	0,003200	22	0,000145		
Total	0,014451	27		$F_{0,95(5,22)} = 2,68$	
R²	0,73				

SQ= Soma dos quadrados; gl= graus de liberdade; QM: Quadrados médios

A tabela de ANOVA (Tabela 12) revela que o modelo quadrático ajustado para as respostas do processo é adequado. O coeficiente de determinação (R^2) para a concentração de α -terpineol foi igual a 73,59 %, apesar de não ideal esse valor é considerado razoável para esse tipo de processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005). O teste F foi altamente significativo, em que o valor de F calculado (15,5172) mostrou-se cinco vezes maior que o respectivo valor de F tabelado para 5 graus de liberdade da regressão e 22 graus de liberdade dos resíduos, $F_{5,22} = 2,68$ para um nível de significância de 0,05, enquanto que o *p*-valor do modelo mostrou-se menor que 0,001.

Portanto, a equação do modelo é válida e pode ser graficamente representada através de superfícies de respostas e as respectivas curvas de contorno (Figura 15).

Resultados preliminares mostraram que essa linhagem foi capaz de resistir concentrações em torno de 8% de *R*-(+)-limoneno, utilizando-o como única fonte de carbono e também que esse micro-organismo era capaz de produzir 27 mg.L⁻¹ de α -terpineol durante o processo de biotransformação (MOLINA, 2010).

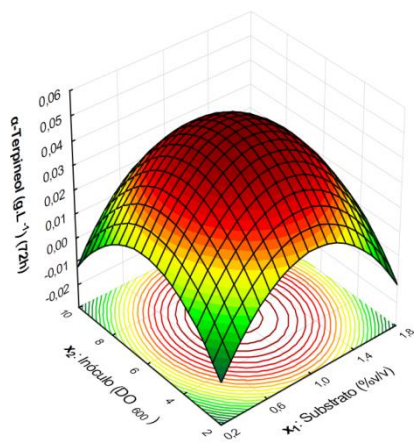
A análise da superfície de resposta e curva de contorno que relacionam substrato e quantidade de inóculo, figura 15a e 15b, percebe-se que o ponto ótimo para a produção de α -terpineol está em 1% de substrato e DO₆₀₀ na faixa de 6 para quantidade de inóculo, o que resultaria em uma produção maior que 40 mg.L⁻¹. As figuras 15c e 15d mostram o

efeito da interação da temperatura e da quantidade de inóculo no processo, indicando que em valores superiores de 30°C e DO₆₀₀ na ordem de 6 para a quantidade de inóculo seriam os recomendáveis para alcançar maiores concentrações de α -terpineol, superiores a 30 mg.L⁻¹. A análise das figuras 15e e 15f mostra que a faixa ótima de agitação e concentração de substrato não foi alcançada mas que seria em torno de 1% de substrato, corroborando com as análises anteriores, e valores maiores que 300 rpm.

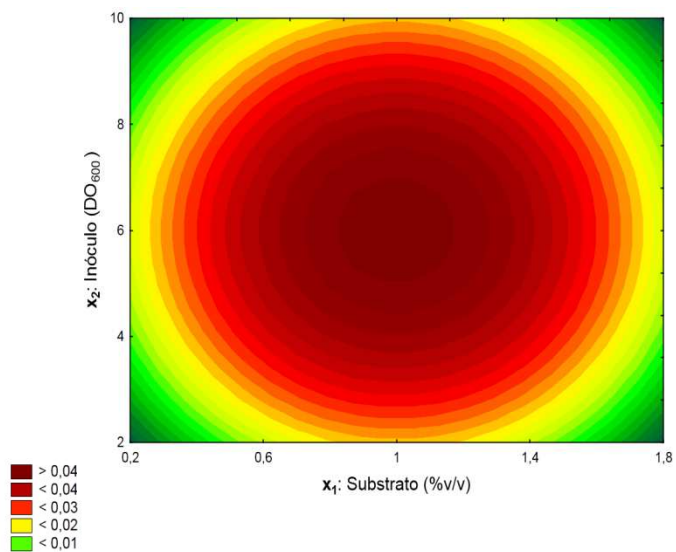
Nas figuras 15g e 15h, fica claro as condições ótimas de temperatura e quantidade de inóculo mais adequadas ao processo em questão, valores de 30° C e DO₆₀₀ respectivamente. Esses valores são condizentes com as de outras superfícies analisadas.

As demais superfícies e curvas de contorno, 15i,15k, e 15j e 15l, mostram a influência da agitação juntamente com quantidade de inóculo e temperatura. Novamente percebe-se a influência determinante da agitação uma vez que para se alcançar produções de α -terpineol maiores que 70mg.L⁻¹, a temperatura ótima seria de 30°C, inóculo com valor de DO₆₀₀ em torno de 6 e agitação superior a 300 rpm.

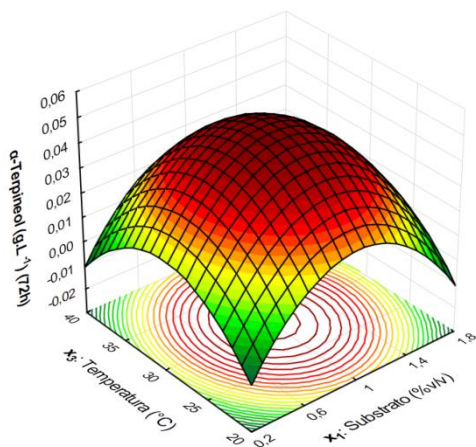
A validação experimental foi realizada em triplicata e o valor médio de α -terpineol produzido foi de aproximadamente 85mg.L⁻¹, valor esse condizente com o valor predito pelo modelo que foi de em torno de 82 mg.L⁻¹. A partir da análise das superfícies de resposta as condições ótimas para o processos são: inóculo com valor de DO₆₀₀ próximo de 6,0, temperatura de 30°C, concentração de substrato em torno de 1,0% e valores de agitação superiores a 300 rpm.



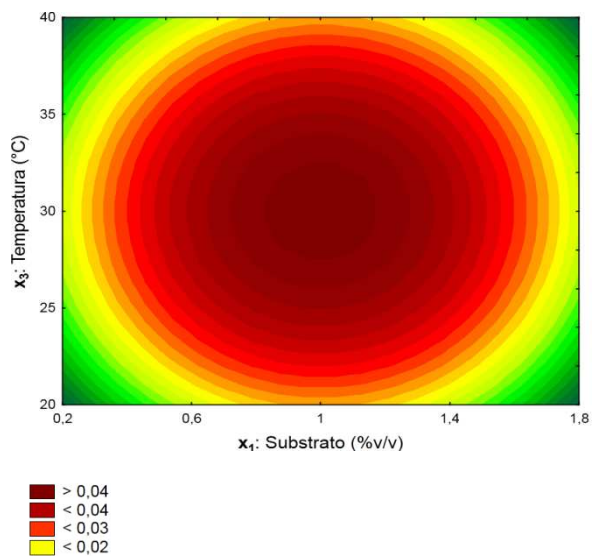
(A)



(B)

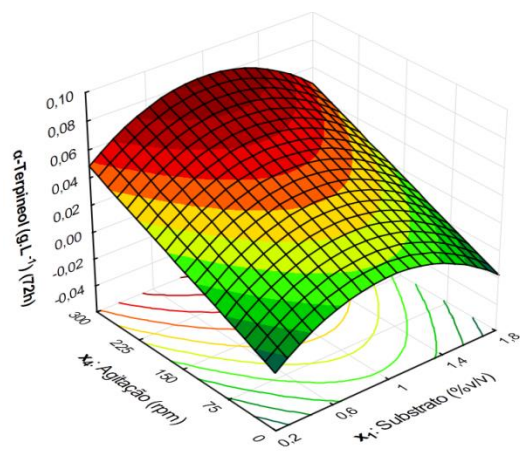


(C)

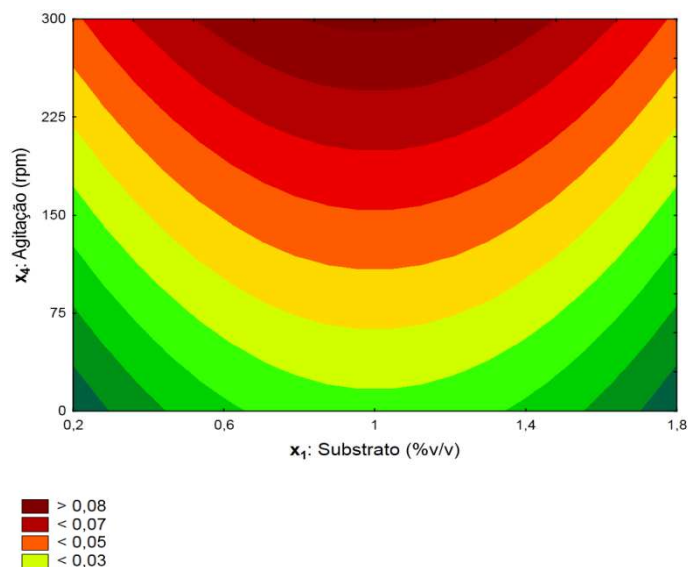


(D)

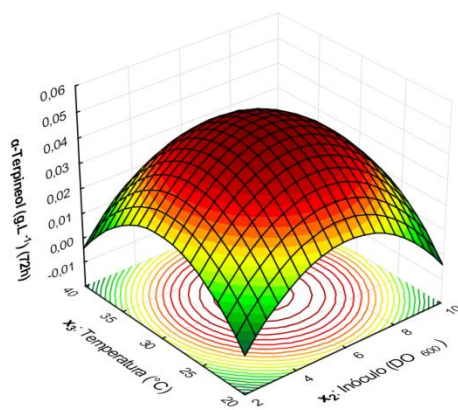
Figura 15. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).



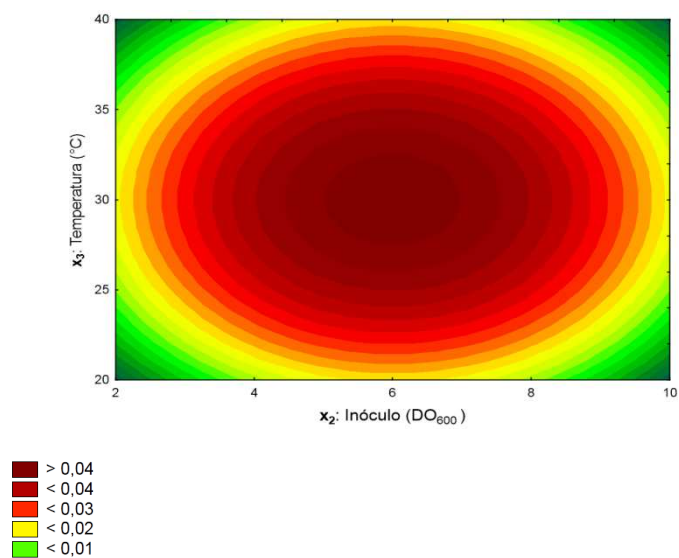
(E)



(F)

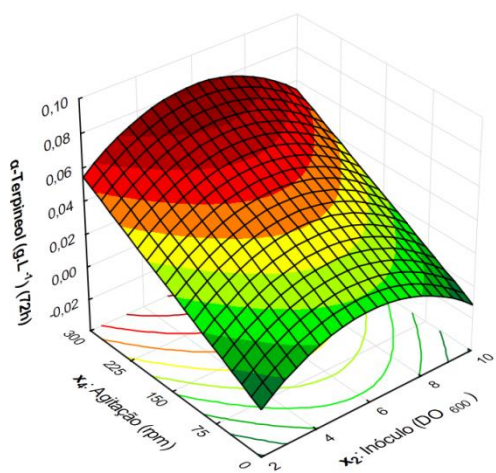


(G)

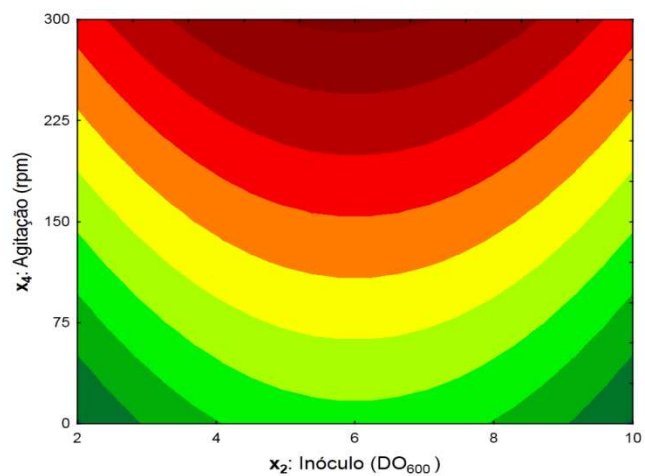


(H)

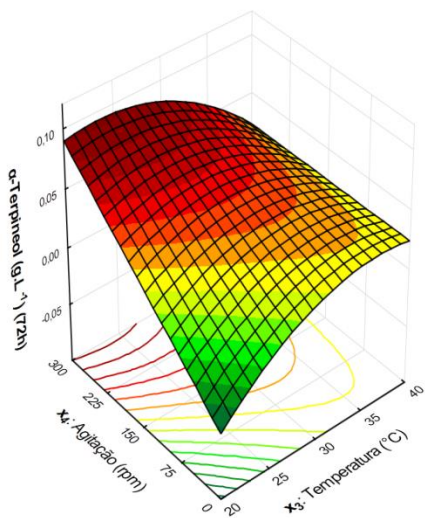
Figura 15. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático (continua na próxima página).



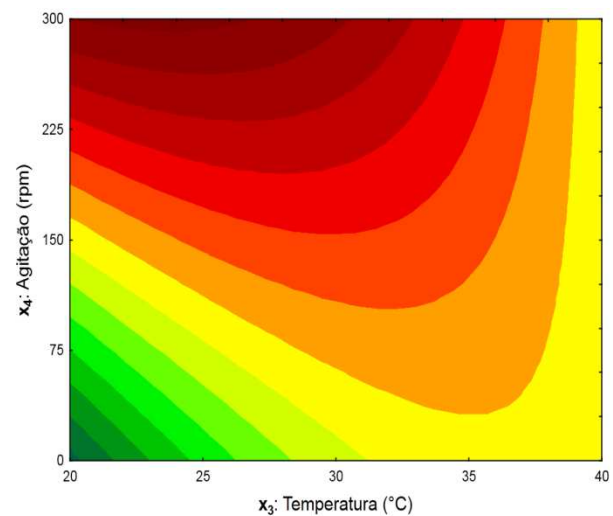
(I)



(J)



(K)



(L)

Figura 15. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir do modelo matemático.

4. Conclusão

A otimização da produção biotecnológica de α -terpineol a partir de *R*-(+)-limoneno foi descrita utilizando uma linhagem de *Bacillus tequilensis* isolada de resíduo de processamento de frutas cítricas. De acordo com as superfícies de respostas e curvas de contorno as melhores condições para a maior produção de α -terpineol foram 30°C, DO₆₀₀ igual a 6 de inóculo, 1,0 % de substrato e agitações superiores a 300 rpm elevando a produção de α -terpineol de 25 mg.L⁻¹ para aproximadamente 85 mg.L⁻¹ (concentração obtida na validação do processo), um aumento de 3 vezes a produção inicial.

Considerando as faixas utilizadas no estudo e os resultados obtidos, percebe-se que novamente o nível superior (+2) de agitação testado não contemplou o valor ótimo, sendo necessário o aumento da agitação para valores maiores que 300 rpm para esse processo. Contudo, levando-se em conta termos operacionais a condição de agitação foi fixada para 250 rpm para a validação experimental.

5. Referências

- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.
- BHATIA, S.P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on alpha-terpineol. Food and Chemical Toxicology. v.46, pp.S280-S285, 2008.
- BICAS, J.L.; FONTANILLE, P.; PASTORE, G.M.; LARROCHE, C. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonas. Journal of Applied Microbiology. v.105, pp.1991-2001, 2008.
- BICAS, J.L. Estudos de obtenção de compostos de aroma pela biotransformação de compostos terpênicos. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- BICAS, J.L.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; GODOY, H.T.; PASTORE, G.M. Optimization of R-(+)-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 1061-1070, 2008.
- BICAS, J.L., PASTORE, G.M. Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. Brazilian Journal of Microbiology. pp. 563-567, 2007.
- BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. Food and Chemical Toxicology. v.49, 1610-1615, 2011.
- BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX. Oleum Melaleucae (O. Melal.). Oil of Melaleuca. London, pp. 597-598, 1949.
- DI SOTTO, A.; DURAZZI, F.; SARPIETRO, M.G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and antioxidante activities of some bioflavours from wine. Food and Chemical Toxicology. v.60, pp.141-146, 2013.

HARRATHI, J.; HOSNI, K.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATTIA, H.; MARZOUK, B.; MAGNÉ, C.; LACHAËL, M. Effect of salt stress on growth, fatty acids and essential oils in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 34, pp. 129–137, 2012.

KANAT, M.; ALMA, M.H. Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Pest Management Science*. v.60, pp. 173–177, 2004.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. v.16, pp.11-120, 1980.

KRAIDMAN, G.; MUKHERJEE, B.B.; HILL, I.D. Conversion of D-limonene into an optically active isomer of α -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriological Proceedings*. v.69, pp. 63-67, 1969.

KUREKCI, C.; PADMANABHA, J.; BISHOP-HURLEY, S.L.; HASSAN, E.; AL JASSIM, R.A.M.; McSWEENEY, C.S. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. *International Journal of Food Microbiology*. v.166, pp.450-457, 2013.

MARÓSTICA, M.R., PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*. v. 101, pp.345–350, 2007.

MARÓSTICA JR., M.R.; SILVA, T.A.A.R.; FRANCHI, G.C.; NOWILL, A.; PASTORE, G.M.; HYSLOP, S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of Orange essential oil. *Food Chemistry*. v.116, pp.8-12, 2009.

MOLINA, G.; PINHEIRO, D.M.; PIMENTEL, M.R.; SANTOS, R.; PASTORE, G.M. Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits. *Food Sci. Biotechnol.* v.22, p.999-1006, 2013.

MOLINA, G. Prospecção de processos biotecnológicos de interesse industrial. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, 2010.

PARK, S-N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J-K. Antimicrobial effect of linalool and a-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. v.18, pp.369-372, 2012.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A., 2005. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma Estratégia Seqüencial de Planejamentos, First edit. ed. Casa do Pão de Queijo, Campinas.

ROTTAVA, I.; CORTINA, P.F.; MARTELLO, E.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; ANTUNES, O.A.C.; OESTREICHER, E.G.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. Optimization of a-terpineol production by biotransformation of R-(+)-Limonene and (-)-B-Pinene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 164, pp.514-523, 2011.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. v. 4, pp.406–425, 1987.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. v.24, 1596–1599, 2007

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. v.25, pp.4876–4882, 1997

TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. – A Novel Psychrotrophic Fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene Biotransformation. *Biotechnology Letters*. v. 27, p. 149-153, 2005.

VAN SOOLINGEN, D., DE HAAS, P.E., HERMANS, P.W., GROENEN, P.M., VAN EMBDEN, J.D. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. v. 31, pp.1987–1995, 1993.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. Food Control. v.37, pp. 277-283, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

O primeiro capítulo da Dissertação trouxe uma revisão de literatura sobre compostos monoterpênicos, incluindo monoterpenos e monoterpênóides, abordando suas características químico-estruturais, atividades biológicas e pontenciais aplicações em biotecnologia.

O segundo capítulo foi dividido em duas partes: A primeira parte trata do *screening* de 81 linhagens de micro-organismos capazes de biotransformar dois substratos monoterpênicos presentes em grandes percentuais em resíduos de processamento de frutas cítricas e de papel e celulose, limoneno e α -pineno. Das linhagens testadas apenas 5 linhagens demonstraram esse potencial, contudo, apenas uma linhagem fúngica foi a que propiciou rendimento acima de 50 mg.L^{-1} e foi foco de estudo de efeito de indução enzimática e estudo de influência de idade do inóculo no processo de produção de aroma. Os resultados mostraram que o inóculo com 72 horas de crescimento foi o mais viável, sendo utilizado como padrão para a condução do processo biotecnológico em estudos posteriores visando à produção de derivados oxigenados. A indução enzimática por sua vez não demonstrou aplicação já que ocorreu significativa diminuição na produção de derivados oxigenados de α -pineno.

A Parte II foca no estudo de otimização do processo de biotransformação, utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 4 variáveis. A variável dependente foi a concentração de verbenona em 96 horas de processo. De acordo com a análise das superfícies de respostas e curvas de contorno, as melhores condições para a maior produção de verbenona foram 30°C , 3 a 4g de inóculo, 0,6 % de substrato e agitações superiores a 250 rpm. A otimização proporcionou o estabelecimento de condições mais favoráveis ao processo, elevando a produção de 66 mg.L^{-1} para aproximadamente 108 mg.L^{-1} em um dos ensaios do DCCR e em torno de 98 mg.L^{-1} no ensaio de validação.

O terceiro capítulo consiste no estudo de otimização do processo de bioconversão de *R*-(+)-limoneno à α -terpineol utilizando uma linhagem bacteriana de *Bacillus tequilensis* isolado de resíduos de processamento de frutas cítricas. A produção de α -terpineol em estudos preliminares era de em torno de 25 mg.L^{-1} e após a otimização e validação do

processo foi verificado que as condições consideradas ótimas por meio da análise de superfícies de respostas para esse linhagem seriam aquelas em que a temperatura era de em torno de 30°C, DO₆₀₀ igual a 6 de inóculo, 1,0 % de substrato e agitações superiores a 300 rpm. Nessas condições a produção de α -terpineol foi aumentada para 85 mg.L⁻¹.

Portanto, demonstrou-se a aplicabilidade de ferramentas estatísticas em processos biotecnológicos de produção de aromas, sendo que a otimização de processos é uma importante e vantajosa abordagem já que permite o estabelecimento de condições em que há um aumento do rendimento em estudos de biotransformação em escala laboratorial permitindo assim possíveis aplicações em estudos de *scale-up*.

As próximas etapas desse trabalho estão relacionadas à identificação da linhagem LBGM F6 e ainda a utilização dessa linhagem em estudos para a avaliação do seu potencial de biotransformação com outros substratos monoterpênicos e possíveis estudos de otimização.

