

**URI - CAMPUS ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE (-)-BETA-PINENO UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTURA**

**MICHELI EIKO YONEHARA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL  
FEVEREIRO DE 2012**

# **BIOTRANSFORMAÇÃO DE (-)-BETA-PINENO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTURA**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Micheli Eiko Yonehara

Comissão Julgadora:

---

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.  
Orientadora

---

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc.  
Orientador

---

Prof. Morgana Karin Pierozan, D. Sc.

---

Prof. Ieda Rottava, D. Sc.

---

Prof. Elisandra Rigo, D. Sc.

Erechim, 28 de fevereiro de 2012

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*Dedico esta monografia aos meus pais, minha irmã e meu querido marido, pelo apoio que me deram, estiveram sempre presentes e acreditaram em meu potencial, me incentivando na busca de novas realizações.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Desejo expressar o meu sincero agradecimento, aos meus professores orientadores, por todo o apoio prestado, pela disponibilidade para ajudar, pelo interesse demonstrado e por todos os conselhos.

Agradeço à professora Ieda Rottava, que sempre demonstrando paciência e muito interesse em repassar seus ensinamentos, me ensinou e aconselhou, bem como pela sua valiosa dedicação, me ajudou bastante a concluir este trabalho. Por tudo, o meu muito obrigado.

À Universidade Regional Integrada - URI Campus de Erechim pela estrutura e condições para alcançar estes resultados, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e todo seu corpo docente.

Aos bolsistas que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado agradeço as horas de almoço bem passadas, os finais de tarde para descontrair e todos os jantares que tornaram este tempo mais divertido.

A todos os meus professores que me acompanharam durante toda a minha vida de estudante, pois me ensinaram e me mostraram o quanto estudar é bom.

À minha família, pelo apoio ao longo de todos os caminhos que passei, pela dedicação, incentivo, confiança e amor incondicional.

Ao meu marido Rogério, pelo amor, incentivo, compreensão pelos momentos de ausência e estresse, enfim, obrigado por estar sempre ao meu lado.

E por fim, um muito obrigado a todos os meus amigos e amigas, que sempre estiveram ao meu lado e torceram pelo meu sucesso, pois sem eles este trabalho não seria possível.

“O entusiasmo é a maior força da alma.  
Conserva-o e nunca te faltará poder para  
consequires o que desejas.”

*Napoleão Bonaparte*

Resumo da dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em engenharia de alimentos.

## BIOTRANSFORMAÇÃO DE (-)-BETA-PINENO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTURA

Micheli Yonehara

Fevereiro/2012

Orientadores: Geciane Toniazzo e Rogério Luis Cansian

Os processos de biotransformações constituem-se numa alternativa atraente, pois são efetuadas por micro-organismos vivos e derivados biológicos e, portanto, seus produtos podem ser considerados como “natural”. Ocorrem em condições reacionais brandas de temperatura e pressão, reduzindo os impactos ambientais. Os monoterpenos são substratos interessantes para a produção biotecnológica de compostos aromatizantes e produtos farmacêuticos por serem substâncias de alta disponibilidade.  $\beta$ -pinenos são monoterpenos biciclícos produzidos em quantidades significativas pelas coníferas da família das *Pinaceae*, sendo os maiores constituintes do óleo essencial destas plantas, atingindo concentrações de 75 a 90% do óleo. O objetivo deste trabalho foi realizar reações de biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno em diferentes meios reacionais, e utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultivo. Estes apresentam um elevado potencial de uso para conversão protéica além de ser uma fonte alternativa. Nas reações foi utilizado um fungo filamentoso, *Aspergillus* sp., pré-selecionado, codificado como 04.05.08, isolado de caule de laranjeira por Rottava (2010). Foram empregadas cinco condições experimentais diferentes para a adição do substrato, que define o início da reação, sendo estas identificadas por R01, R02, R03, R04 e R05. Nas reações R01 e R02 a adição do substrato foi única e, nas reações R03, R04 e R05, a adição do substrato foi de forma sequencial. A maior concentração do produto  $\alpha$ -terpineol foi obtida na reação R02, 1600mg/L, seguida pela obtida na reação R05, 944mg/L. Ambas as reações foram realizadas em Meio Mineral, após crescimento das células em caldo PD. Este trabalho busca também a maximização do processo na produção do monoterpenóide oxigenado, denominado de  $\alpha$ -terpeniol mediante utilização de

técnica de planejamento experimental. O processo de biotransformação com condições experimentais que apresentaram as melhores produções foi maximizado utilizando o planejamento experimental. Nesta etapa foram estudadas as influências da temperatura (20; 28 e 36°C), pH (4,5; 6 e 7,5) e massa do inóculo (1; 3 e 5 g) na reação. Na maximização do processo foram mantidas constantes as condições da reação R02, onde, após 36 horas de crescimento do micro-organismo em caldo PD, foi realizada a centrifugação das células, e após estas transferidas para outro frasco com meio mineral e realizada à adição única de 1,5% (v/v) de (-)-β-pineno diluído em 1,5% (v/v) de etanol absoluto. Concentração de cerca de 1582,70 mg/L de α-terpineol foi alcançada no experimento 6 do planejamento experimental. Foi verificado que a temperatura apresentou efeito significativamente positivo e o pH efeito significativamente negativo na produção de α-terpeniol. As melhores condições correspondem a uma temperatura de 36°C, massa de inóculo de 5g e pH do meio reacional de 4,5. Na avaliação da produção de α-terpineol utilizando meios de cultivo agroindustriais observou-se que, utilizando 40g/L de AMM e 40g/L de glicerol para produção do inóculo, as concentrações de α-terpineol são similares às obtidas utilizando caldo PD para produção do inóculo, portanto pode ser utilizado como alternativa de aproveitamento.

**Palavras-chave:** Biotransformação, (-)-β-pineno, α-terpineol, resíduo agroindustrial

Abstract of dissertation presented to food engineering program as a partial fulfillment of the requirements for the master in food engineering

## BIOTRANSFORMATION OF (-)-BETA-PINENE USING AGRO-INDUSTRIAL WASTES AS CULTURE MEDIA

Micheli Yonehara

February/2012

Advisors: Geciane Toniazzo and Rogério Luis Cansian

Biotransformation has been an efficient method to obtain important commercial compounds such as monoterpenes that have a range of applications in the pharmaceutical, perfumery, cosmetics and food industries. The ability of the cells and fungi cultures to transform these compounds monoterpenos has being mainly used for the synthesis of oxygenated derivatives aiming at the production of flavours and fragrances. This work describes the evolution of biotransformation of monoterpenes (-)- $\beta$ -pinene, using suspensions of filamentous fungi preselected, coded as 04:05:08, isolated stem orange. The biotransformation reactions occurred in different culture media. In the biotransformation reactions were used five different experimental conditions for the addition of substrate (R01, R02, R03, R04 e R05). The main product obtained from (-)- $\beta$ - $\alpha$ -pinene was terpeniol, the highest concentration of product was obtained in the reaction R02, 1600 mg/L, followed by reaction R05, 944mg/L. In evaluating the production of  $\alpha$ -terpineol as a culture medium using an agro-industrial waste noted that, using 40 g/L of corn steep liquor and 40 g/L of glycerol, to produce the inoculum concentrations of  $\alpha$ -terpineol are similar to those obtained using a synthetic medium for the production of inoculum can therefore be used as an alternative use of industrial residues.

**Keywords:** Biotransformation, (-)- $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpineol, agro-industrial residue

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Biotransformação.....	17
2.1.1 Seleção de biocatalisador.....	19
2.1.2 Seleção de Substrato.....	21
2.1.3 Seleção das condições de cultivo e do método de biotransformação.....	22
2.1.3.1 Biotransformação com células em crescimento.....	22
2.1.3.2 Biotransformação com células previamente crescidas.....	23
2.1.3.3 Biotransformação com células imobilizadas.....	24
2.1.3.4 Biotransformações com extratos enzimáticos e enzimas isoladas.....	26
2.1.3.5 Biotransformação em sistemas multifásicos.....	27
2.1.3.6 Biotransformação envolvendo várias etapas.....	28
2.1.3.7 Biotransformações oxidativas e oxigenases microbianas.....	29
2.2 Terpenos.....	31
2.3 Monoterpenos.....	36
2.3.1 Monoterpenos acíclicos.....	36
2.3.2 Monoterpenos monocíclicos.....	37
2.3.3 Monoterpenos bicíclicos.....	38
2.4 Biotransformação de monoterpenos.....	40
2.4.1 Biotransformação de beta-pineno.....	42
2.5 Resíduo agroindustrial.....	45
2.6 Considerações finais.....	46
3 MATERIAL E MÉTODO.....	47
3.1 Micro-organismo.....	47
3.2 Material.....	47
3.2.1 Reagentes/solventes e meios de cultura.....	47
3.2.2 Substratos e padrões químicos.....	48
3.3 Metodologia.....	48
3.3.1 Esterilização dos materiais e meios de cultivo e de reação.....	48
3.3.2 Curva de crescimento do micro-organismo 04.05.08.....	48
3.3.3 Produção de inóculo.....	49

3.3.4 Avaliação das condições experimentais nas reações de biotransformação	49
3.3.5 Extração, identificação e quantificação dos produtos obtidos na biotransformação.....	51
3.3.5.1 Extração.....	51
3.3.5.2 Identificação dos produtos da biotransformação.....	51
3.3.5.3 Quantificação dos produtos da biotransformação.....	52
3.3.6 Avaliação da produção de $\alpha$ -terpineol.....	52
3.3.7 Produção de inóculo utilizando meios de cultivo agroindustriais.....	53
3.3.8 Caracterização dos meios de cultivo agroindustriais.....	53
4 resultados e discussão.....	55
4.1 Curva de crescimento do micro-organismo 04.05.08.....	55
4.2 Reações de biotransformação.....	56
4.3 Maximização da produção de $\alpha$ -terpineol.....	59
4.4 Avaliação da produção de $\alpha$ -terpineol utilizando meios de cultivo agroindustriais para produção do inóculo.....	62
5 CONCLUSÕES E sugestões.....	66
5.1 CONCLUSÕES.....	66
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	68
6 REFERÊNCIAS.....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de biotransformação. ....	19
Figura 2 - Reações gerais de oxidação catalisadas por oxigenases (MOLINA,2007). .....	30
Figura 3 - Representação de uma unidade de isopreno (PETERSEN, 2006).....	32
Figura 4 - Esquema de condensação de unidades isoprênicas – formação dos precursores de terpenos C10, C15, C20, C25, C30 e C40 (TONIAZZO, 2005).....	34
Figura 5 - Exemplos de monoterpenos acíclicos (TONIAZZO, 2005).....	36
Figura 6 - Estrutura de isômeros do $\alpha$ -mentano (TONIAZZO, 2005).....	37
Figura 7 - Estrutura de 1,8-terpin e seus derivados (TONIAZZO, 2005).....	37
Figura 8 - Estrutura de monoterpenos monocíclicos oxigenados nas posições 2 e 3 (TONIAZZO, 2005).....	38
Figura 9 - Estrutura de monoterpenos oxigenados nas posições 7 e 10 (TONIAZZO, 2005).....	38

Figura 10 - Séries de monoterpenos bicíclicos (TONIAZZO, 2005).....	39
Figura 11- Monoterpenos bicíclicos da série dos pinenos (TONIAZZO, 2005).....	39
Figura 12 - Derivados oxigenados dos pinenos (TONIAZZO, 2005).....	39
Figura 13 - Série dos canfanos (TONIAZZO, 2005).....	40
Figura 14 - Série dos fenchanos (TONIAZZO, 2005).....	40
Figura 15 - Representação esquemática do $\beta$ -pineno (WIKIMEDIA COMMONS, 2010).....	42
Figura 16 - Principais rotas metabólicas envolvidas na biotransformação de $\beta$ -pineno (BUSMANN & BERGER, 1994; Van DYK et al., 1998; LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).....	44
Figura 17 – Curva de crescimento do <i>Aspergillus</i> sp. codificado como 04.05.08.....	55
Figura 18 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no DCC 23 para a produção de $\alpha$ -terpineol.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações de micro-organismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.....	25
Tabela 2 - Classe de enzimas segundo Enzyme Commission e suas aplicações em processos (SANTANIELLO et al.,1992).....	29
Tabela 3 - Classificação de terpenos segundo unidades isoprênicas (SJÖSTRÖM, 1981).....	33
Tabela 4 - Exemplos de processos de biotransformação de monoterpênos.....	42
Tabela 5 - Variáveis e níveis avaliados no Delineamento Composto Central (DCC) 23.....	52
Tabela 6 - Composição do meio de cultivo para o micro-organismo 04.05.08.....	53
Tabela 7 - Resultados da biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno pelo fungo filamentoso 04.05.08 ( $\alpha$ -terpineol).....	56
Tabela 8 - Resultados da biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno pelo fungo filamentoso 04.05.08 (Mirtenol). ....	59
Tabela 9 - Matriz experimental do DCC 23 (valores reais e codificados) para produção de $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno como substrato.....	60
Tabela 10 - Avaliação da temperatura para produção de $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08.....	61
Tabela 11 - Avaliação do pH para produção de $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08.....	62
Tabela 12 - Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (N <sub>2</sub> ) dos meios de cultivo agroindustriais sem pré-tratamento (RIBEIRO, 2011).....	63
Tabela 13 - Componentes minerais dos meios de cultivo agroindustriais sem pré-tratamento (RIBEIRO, 2011).....	63
Tabela 14 - Avaliação da produção de $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de AMM e glicerol para cultivo do inóculo.....	63
Tabela 15 - Avaliação da produção de $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de APA e glicerol para cultivo do inóculo.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Os aromas e sabores são um dos mais importantes atributos utilizados na indústria de alimentos, bebidas e cosméticos. A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente os aromas, tem sido relatado, porém este material é considerado caro e inviável às indústrias, na tentativa de contornar este problema tem-se trabalhado na produção biotecnológica destas substâncias.

Compostos de aroma são obtidos atualmente por dois processos principalmente: síntese química e extração de fontes naturais. As sínteses químicas geralmente criam altos impactos ambientais por emitirem certa carga de resíduos não-biodegradáveis. Aromas extraídos diretamente de plantas estão sujeitos a instabilidades advindas da sazonalidade, ataque de pragas e efeitos geográficos. Em contrapartida os processos biotecnológicos, por outro lado, em geral não emitem alta carga de resíduos e estão menos sujeitos à variações sazonais, oferecendo algumas vantagens sobre alguns dos processos existentes para a produção compostos de aromáticos (JANSSENS *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, a produção biotecnológica de compostos de aroma e sabor vem sendo estimulada pela crescente demanda do mercado consumidor por produtos rotulados como “naturais” e “saudáveis”. As legislações norte-americana e européia referem-se aos compostos de aroma naturais como aqueles preparados tanto por processos físicos (extração de suas fontes naturais) como por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados da natureza, sendo que o composto gerado deve ser idêntico ao já existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como ‘natural’. Isso, aliado ao interesse por aromas naturais em vez de aromas sintéticos, levou a um aumento de investigações focadas em produção biotecnológica dos denominados ‘bioaromas’ (MARÓSTICA, 2006).

Aromatizantes e/ou saborizantes naturais, obtidos por biotransformação, tendem a substituir os produtos sintéticos, pois são efetuadas por organismos vivos e derivados biológicos e, portanto, tem a possibilidade de obtenção do *status* “natural”. Este fato pode ser considerado verdadeiro devido às vantagens do processo de biotransformação em comparação com a síntese química, além do

grande potencial oferecido pela transformação microbiana na produção de novos compostos de sabor com diferentes aplicações nas indústrias. Os micro-organismos podem alterar e degradar uma variedade de moléculas orgânicas e complexas, assim pode-se esperar que um deles seja capaz de catalisar a reação de interesse específico (ROTTAVA, 2010). Além disso, são obtidas em condições reacionais brandas de temperatura e pressão, reduzindo os impactos ambientais por emitirem menor carga de resíduos industriais, sendo compatíveis com o meio ambiente (GIRI *et al.*, 2001).

Definem-se como processos de biotransformação aqueles em que se utilizam sistemas biológicos, onde um composto orgânico é modificado em um produto estruturalmente similar através de reações específicas. Estes sistemas se denominam biocatalisadores e se caracterizam por serem enzimas ou células íntegras, de micro-organismos naturais ou recombinantes (HANSON, 1998; GIRI *et al.*, 2001; DOBLE *et al.*, 2004).

A biotransformação via precursores monoterpenos que podem ser convertidos em seus mais valiosos derivados oxigenados, geralmente chamados terpenóides, é uma das classes de metabólitos secundários com o maior número de substâncias descritas (PETERSEN, 2006).

O reino vegetal tem fornecido grande parte dos metabólitos secundários com grande valor agregado, estes metabólitos em geral, são compostos voláteis produzidos por micro-organismos, isto é, não são essenciais para seu metabolismo, eles são os principais responsáveis pelos aromas característicos dos óleos essenciais e são utilizados na produção biotecnológica por apresentar complexidade natural e difícil emulação laboratorial.

Alguns monoterpenos como limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, podem ser isolados em grandes quantidades a partir de óleos essenciais, a baixo custo, para serem então utilizados como matéria-prima na síntese de *flavors* e fragrâncias de maior valor agregado (TONIAZZO, 2005).

Os monoterpenos,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, são encontrados nos óleos de muitas espécies de árvores coníferas, notavelmente o pinheiro. É também encontrado no óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Ambos os enantiômeros são conhecidos na natureza; o (-)- $\alpha$ -pineno é mais comum em pinheiros europeus, enquanto o (+)- $\alpha$ -isômero é mais comum na América do Norte. A mistura racêmica está presente em alguns óleos tais como o óleo de eucalipto.

A bioconversão de limoneno para um terpineol como principal produto final tem sido descrito utilizando uma vasta gama de micro-organismos, como catalisador, dentre eles podemos citar: *Pseudomonas* sp. (YOO & DAY, 2002), *Cladosporium* sp. (MATTISON *et al.*, 1971), *Penicillium* sp., *Penicillium digitatum* isolada de casca de laranja, (MATTISON *et al.*, 1971;. TAN *et al.*, 1998;. Van RESBURG *et al.*,1997) e *Pseudomonas gladiolos* (CADWALLADER & BRADDOCK, 1992; DEMYTTENAERE *et al.*, 2001).

No entanto, a bioconversão de  $\beta$ -pineno para um terpineol tem sido pouco descrito na literatura. Van Dyk, van Resburg e Moleleki (1998), utilizando *Hormonema* sp., obtiveram pinocanfona de (-)  $\beta$ -pineno. Yoo e Day (2002), utilizando-se *Pseudomonas* sp. obtiveram de limoneno, p-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, cânfora, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, endo-borneol, e p-cimeno-8-ol. *Aspergillus niger* ATCC 9642 foi usado também como catalisador para biotransformação, o composto obtido foi um terpineol com conversão baixa (até 4%) (TONIAZZO *et al.*, 2005).

Buscando uma redução dos custos de produção destes compostos, temos como alternativa a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo, sendo de baixo custo, e produzindo estes compostos com interesse industrial e de valor agregado (ORZUA *et al.*, 2009).

Os resíduos agroindustriais apresentam um elevado potencial de uso para conversão protéica, como meio, pois, possui baixo valor de proteínas (base seca) e uma boa quantidade de carboidratos (açúcar e amido), que podem ser metabolizados como fonte de energia pelos micro-organismos nas reações.

Com base nos aspectos acima referidos, este trabalho visa realizar reações de biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno em diferentes meios reacionais, e utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultivo, busca também a maximização do processo na produção do monoterpênóide oxigenado, denominado de  $\alpha$ -terpeniol, mediante utilização de técnica de planejamento experimental.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biotransformação

A biotransformação é uma tecnologia relativamente recente na síntese de compostos orgânicos e aparece como melhor alternativa para os casos onde as reações químicas são de difícil realização. Em vários casos, é muito laborioso funcionalizar certas posições de moléculas via rota sintética, devido às várias etapas requeridas, resultando em baixos rendimentos e inviabilizando economicamente o processo, gerando também muitos subprodutos (TONIAZZO, 2005; ROTTAVA, 2010).

Porém, a produção biotecnológica de produtos alimentares tem sido usada por seres humanos desde a pré-história para a preparação de bebidas fermentadas, pães, etc. No entanto, foi apenas nas últimas décadas do século 20 que a utilização desta técnica foi estendida para a fabricação de ingredientes, por exemplo, sabores e oligossacarídeos. Desde então, a adoção da biotecnologia industrial tem crescido constantemente em nossa sociedade, mas muitos processos biológicos não estão ainda disponíveis comercialmente devido ao alto custo envolvido no processo (BICAS *et al*, 2010).

A maioria dos compostos de aroma usados no mundo (aproximadamente 80%) utiliza processos químicos para sua obtenção. Entretanto, observa-se uma nova tendência em países desenvolvidos, como a Alemanha, onde 70% de todos os compostos de aroma utilizados em alimentos são 'naturais'(MARÓSTICA, 2006).

As biotransformações podem ocorrer, entre outros métodos, com culturas em crescimento, já crescido, células imobilizadas, enzimas purificadas, ou sistemas multifásicos (BICAS, 2009).

Em alguns casos é possível observar menor seletividade pela geração de mais de um produto quando se trabalha com micro-organismos íntegros (células íntegras) devido às células conterem diferentes grupos de enzimas capazes de transformar o substrato (ROTTAVA, 2010).

Reações que são efetuadas por enzimas isoladas de células, são altamente específicas ao substrato, permitindo reconhecê-lo de forma régio e estereosseletiva,

sendo, portanto, capazes de realizarem reações não acessíveis por processos químicos clássicos (PETERSEN, 2006).

Os micro-organismos utilizam suas enzimas constitutivas e indutivas para degradar e sintetizar uma grande variedade de compostos químicos. Além dos seus substratos naturais, cada enzima pode, ainda, aceitar outros compostos estruturalmente semelhantes, e assim, catalisar reações de compostos xenobióticos (composto químico, não nutriente, estranho ao organismo). Os produtos da reação, se não sofrerem posterior degradação, podem ser isolados do meio onde os micro-organismos se desenvolveram (GIRI *et al.*, 2001).

Micro-organismos como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, possuem grande capacidade de biossíntese de novo e de biotransformação e bioconversão de precursores de terpenos (SCHRADER & BERGER, 2001).

Enzimas similares podem apresentar diferentes seletividades para a mesma molécula. De qualquer maneira, e por sorte, a seletividade pode ser alterada variando o meio, otimizando as condições de cultivo, adicionando solventes orgânicos e inibidores de enzimas não desejadas, com a modificação da estrutura do substrato ou a mutação genética do micro-organismo, entre outros. Atualmente existe uma tendência crescente no uso de biocatalisadores, aplicados na obtenção de moléculas complexas de interesse industrial, especialmente no setor farmacêutico, onde são requisitos fundamentais as propriedades de seletividade e especificidade em um processo de síntese (SCHULZE & WUBBOLTS, 1999; TONIAZZO, 2005; POLLARD & WOODLEY, 2006; ROTTAVA, 2010).

A grande maioria dos estudos de biotransformação de monoterpenos descritos até o momento são apenas acadêmicos, sendo inviáveis do ponto de vista industrial, pois sua aplicação direta em escalas maiores esbarra em problemas como a toxicidade dos micro-organismos devido a multiplicidade dos metabólitos originados na reação e ainda a relação inversa que contrasta com um longo tempo de fermentação necessário para a acumulação de produto gerado e a baixa estabilidade e volatilidade do monoterpeno, isto resulta em baixas concentrações dos produtos finais e intermediários, sendo um dos motivos da elevação dos custos da recuperação dos compostos gerados (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001).

Abaixo segue fluxo do processo de biotransformação (Figura 1) que se inicia com a seleção do biocatalisador e substrato apropriados para a transformação desejada.

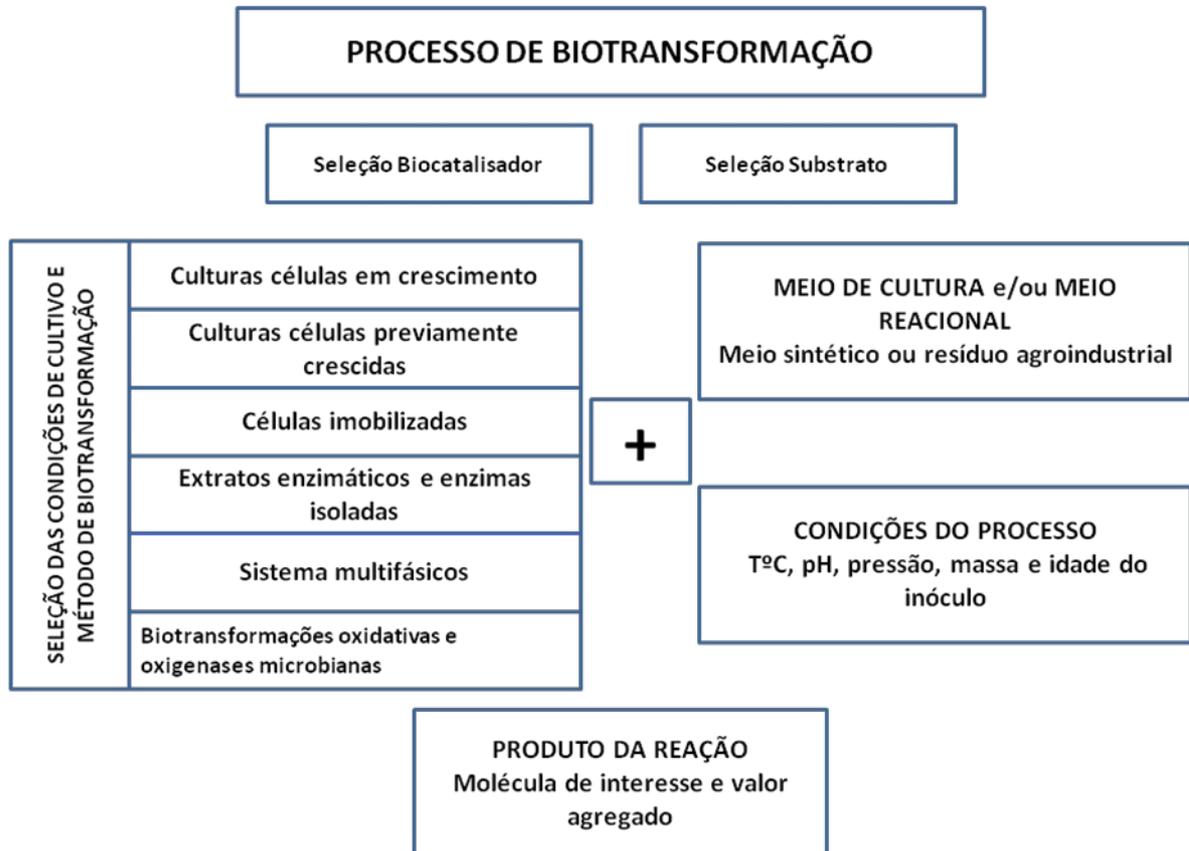


Figura 1 – Esquema do processo de biotransformação.

A seleção das condições de cultivo e do método de biotransformação devem ser realizados buscando sempre a melhor condição para crescimento do micro-organismo e a realização da reação. Variáveis das condições de cultivo como pH, temperatura, concentração e forma de adição do substrato, concentração de oxigênio dissolvido, concentração e idade do inóculo e composição do meio devem ser estudadas de modo a obter aquelas que permitam o melhor rendimento (ROTTAVA, 2010).

### 2.1.1 Seleção de biocatalisador

Para se iniciar uma biotransformação é necessária primeiramente a seleção de um biocatalisador que seja compatível com o substrato a ser utilizado. A escolha

do tipo de biocatalisador é efetuada entre micro-organismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos como RNA, anticorpos ou enzimas isoladas ou contidas em células.

Teoricamente o organismo, para ser viável como biocatalisador, deve cumprir um conjunto de condições tais como:

- Alta eficiência catalítica: podem elevar a velocidade de uma reação de  $10^8$  a  $10^{12}$  vezes;
- Especificidade ou seletividade de reação: tais como a quimioseletividade onde as enzimas reagem com grupos funcionais específicos, por exemplo, a hidrólise enzimática de ésteres não mostra qualquer propensão para a clivagem de acetais.
- Regiosseletividade ou regioespecificidade: que devido à estrutura tridimensional, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais idênticos localizados em regiões diferentes de uma mesma molécula, a enantioseletividade onde as enzimas atuam como catalisadores quirais na seletividade enantiomérica (capacidade de diferenciar um enantiômero de outro);
- Condução do processo sob condições brandas e biotecnologicamente limpas: As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. As enzimas devem ser efetivas mesmo em baixas concentrações, atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C), pH e pressão atmosférica, estar prontamente disponível, ser inócuo, ser ambientalmente abundante, suscetível à modificação genética, resistente a condições adversas.

Apesar dos fatores descritos acima, alguns estudos sugerem que o uso de enzimas isoladas é preferível, quando existirem limitações com relação à permeabilidade do substrato na membrana da célula, ou quando ocorrerem reações secundárias indesejáveis.

### 2.1.2 Seleção de Substrato

A transformação de substratos adicionados aos meios de cultura desperta o interesse de diversas áreas, como farmacêutica e de alimentos. Os substratos para as biotransformações podem ser da mais variada origem, ou seja, podem ser produtos naturais ou precursores destes, podem ser produtos da própria planta ou de plantas de espécies diferentes, ou até produtos xenobióticos, como por exemplo, pesticidas (BANTHORPE, 1994; GERALDES, 2010).

Para a seleção do substrato é necessário o conhecimento de propriedades físicas e químicas do mesmo e das interações deste com o micro-organismo. Em alguns casos, a enzima que catalisa a reação desejada é intracelular, sendo necessária a entrada do substrato na célula e a saída do produto após a transformação (PEREIRA, 1998b), neste caso o substrato deve ser solúvel e capaz de atravessar a membrana celular. Se o substrato não atravessar a membrana podem ser realizados tratamentos na célula para aumentar a permeabilidade da membrana ou utilizar enzimas isoladas (LEUENBERGER *et al.*, 1984). Ainda é necessário que a célula esteja viva para que o substrato atravesse a membrana (PEREIRA, 1998a), desse modo é ideal que o substrato não seja tóxico. Se a enzima é extracelular não há necessidade de o substrato atravessar a membrana celular, mas ainda é importante que o mesmo seja solúvel e não tóxico. Quando o substrato não é solúvel em água, este deve ser dissolvido em um solvente atóxico e miscível em água (HEATH *et al.*, 1997). A escolha do co-solvente é importante porque esse pode alterar a resposta da reação enzimática (ROURE *et al.*, 1997; KATO *et al.*, 1999). Pode-se ainda utilizar sistemas multifásicos no caso de compostos tóxicos ou pouco solúveis. Ocasionalmente, transformações indesejadas da molécula do substrato podem acontecer. Um dos caminhos para eliminar esse efeito é a modificação da estrutura do substrato (LILLY & WOODLEY, 1996).

Os monoterpênóides têm sido amplamente explorados como substrato para reações biocatalíticas, onde a versatilidade dos sistemas enzimáticos possibilita a obtenção de grande variabilidade estrutural dos compostos obtidos, além de agregar maior valor comercial às moléculas originalmente encontradas na natureza (PETERSEN, 2006).

A biotransformação pode ser realizada pela adição do substrato durante o crescimento das células e, nesse caso, a transformação ocorre ao mesmo tempo em que o micro-organismo cresce, ou pela adição do substrato às células previamente crescidas. É possível, ainda, utilizar enzimas isoladas e, nesse caso, a reação geralmente ocorre em meio aquoso tamponado. Tanto as células íntegras quanto as enzimas podem ser utilizadas na sua forma livre ou imobilizadas. Sistemas bifásicos apresentam vantagens para os casos em que o substrato é tóxico ou pouco solúvel (TONIAZZO, 2005).

### **2.1.3 Seleção das condições de cultivo e do método de biotransformação**

#### **2.1.3.1 Biotransformação com células em crescimento**

Neste método de cultivo, tanto a biotransformação quanto o crescimento celular são realizados ao mesmo tempo, a adição do substrato é feita na inoculação ou durante o crescimento das células. Apesar de tornar o processo mais simples, a adição do substrato durante o crescimento pode afetar as células e a biotransformação devido à toxicidade do mesmo. Os efeitos tóxicos do substrato podem ser minimizados ou eliminados pela sua adição em um tempo de cultivo adequado. Em geral, é recomendado que substratos tóxicos sejam adicionados às células já crescidas ou quando a concentração de biomassa adequada já foi atingida (LEUENBERGER *et al.*, 1984).

Se o substrato não é solúvel no meio de cultura, deve ser dissolvido em um solvente miscível em água. O meio de crescimento, a quantidade e a forma de adição do substrato e o período de incubação devem ser determinados experimentalmente.

Pequenas quantidades do substrato ou análogos presentes no meio desde o início do crescimento podem servir de indutor da enzima desejada, aumentando o acúmulo do produto no meio ou aumentando a taxa de reação. A adição de concentrações de monoterpenos inferiores a 1% em volume ou massa no decorrer do processo, normalmente é utilizada para minimizar efeitos tóxicos sobre os micro-organismos, quando o monoterpeno for à única fonte de carbono (ROTTAVA, 2010).

A adição do substrato em batelada alimentada contínua ou intermitente, de modo que o mesmo seja transformado antes de afetar a célula, também pode contornar o problema da inibição do crescimento pelo substrato (DRUAUX *et al.*, 1987; RABENHORST, 1996; KODAMA *et al.*, 1996; AGRAWAL *et al.*, 1987). Terminada a reação, os produtos são separados das células por filtração ou centrifugação.

### 2.1.3.2 Biotransformação com células previamente crescidas

Esse outro método é realizado em duas etapas, também pode eliminar ou minimizar a inibição pelo substrato, o micro-organismo é crescido em meio adequado e separado do meio por centrifugação ou filtração e após a biomassa é colocada em outro meio, próprio para a biotransformação.

Na primeira fase, o meio de crescimento pode ser mais rico, permitindo o desenvolvimento mais rápido do micro-organismo, além de uma elevada formação de biomassa. A produção da enzima desejada deve ser máxima e a produção de enzimas indesejáveis deve ser controlada. Há casos, como já citados anteriormente, em que pequena quantidade do substrato ou análogo presente no meio de crescimento, desde o início da reação, ajuda na indução da síntese da enzima desejada.

Numa segunda fase, onde a biomassa é colocada em outro meio, permite otimizar o crescimento e a biotransformação em separado, utilizando, se necessário, diferentes condições ambientais em cada etapa. O meio de biotransformação, ao contrário da anterior, deve ser bem simples, basicamente um tampão, solução fisiológica ou apenas água destilada. A adição de um nutriente, como glicose, pode ser necessária na regeneração de cofatores e na manutenção da viabilidade celular. As condições mais adequadas de reação devem ser determinadas experimentalmente.

Toniazzo *et al.* (2005) investigaram a biotransformação de limoneo,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno por *Aspergillus niger* ATCC 9642. As biotransformações iniciaram três dias após a inoculação em frascos com 50 mL de meio. Esta cepa de *A. niger* converteu somente  $\beta$ -pineno à  $\alpha$ -terpineol. A melhor conversão foi de cerca de 4 %, obtida

quando o substrato foi aplicado em solução com 1% de etanol absoluto e utilizada a adição sequencial de substrato (cinco adições de 100  $\mu$ L a cada 24 h).

Rottava (2010) também utilizou este método para a biotransformação de  $\beta$ -pineno em  $\alpha$ -terpineol utilizando uma cepa de fungo filamentosos *Aspergillus sp* onde os experimentos de biotransformação foram iniciados em agitador orbital (150rpm), 72 horas depois da inoculação, foi adicionado o substrato em frascos de cultura com 30mL de meio. A cepa de *Aspergillus* (04.05.08) apresentou a mais alta conversão de  $\beta$ -pineno para  $\alpha$ -terpineol.

Algumas vantagens deste processo em relação ao processo em uma etapa são: menor tempo de transformação, maior concentração de substrato, controle mais fácil de reações e facilidade na extração e purificação do produto. A reutilização de biocatalisadores também é possível, especialmente se estiverem imobilizados (MEDEIROS, 2002).

### 2.1.3.3 Biotransformação com células imobilizadas

O uso de micro-organismos imobilizados (MI) permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células. A maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência do processo. A imobilização é realizada pelas técnicas usuais, como por exemplo: aprisionamento em uma rede macromolecular porosa (poliacrilamida, alginato, agar, colágeno, celulose, etc.), adsorção superficial a um suporte sólido, insolúvel em água (celulose, resinas de troca iônica, óxidos metálicos) e agregação celular cruzada induzida (CHIBATA *et al.*, 1986).

Além disso, as principais vantagens da imobilização é a facilidade na recuperação dos produtos do metabolismo de interesse na fase de “downstream”, separação das células do meio reacional, a possibilidade de reutilização das células repetidamente, principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica e também a possibilidade de operação contínua. Temos também a manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BERGMAIER *et al.*, 2005). Temos também como vantagem, que estes processos podem ser realizados em espaço físico menor,

como em biorreatores, ocorre em ambientes com maior atividade de água e permitem melhor controle de contaminações (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2001).

As técnicas clássicas de imobilização podem ser classificadas em:

a) naturais, as quais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais. A imobilização natural ocorre espontaneamente por meio de interações eletrostáticas.

b) artificiais, as quais incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. Na imobilização artificial, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida.

Verifica-se que este método pode acarretar prejuízos em relação à integridade celular durante o aprisionamento, o que, juntamente com a barreira adicional criada com a presença do suporte, acarreta uma redução da atividade catalítica das células imobilizadas em relação à mesma quantidade de células livres, porém o problema é facilmente contornado com o aumento da densidade das células aprisionadas.

Algumas biotransformações utilizando micro-organismos imobilizados encontram-se na Tabela 1. Estes e outros exemplos foram descritos por CORIZZI *et al.* (2007).

**Tabela 1** - Aplicações de micro-organismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.

Processo	Micro-organismo	Suporte utilizado	Referências
Biotransformação	<i>R. minuta</i>	ágar, clara de ovo	VELANKAR & HEBLE, 2003
	<i>T. versicolor</i>	lã de vidro/PEI	SEDARATI <i>et al.</i> , 2003
	<i>Rhodococcus</i>	alginato	GUO <i>et al.</i> , 2006

Um exemplo da utilização deste método na biotransformação de terpenos foi descrito em estudo desenvolvido por Vanek *et al.* (1999a), onde células imobilizadas de *Solanum aviculaie* e *Discorea deltoideai* foram utilizados para a produção de *cis* e *trans* carveol e carvona a partir de (-)-limoneno, utilizado como substrato.

#### 2.1.3.4 Biotransformações com extratos enzimáticos e enzimas isoladas

As enzimas são capazes de catalisar grande variedade de reações úteis na síntese orgânica e são tradicionalmente divididas em seis classes: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

Pode-se utilizar extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, no processo de biotransformação, este método não se apresenta vantajoso, pois, envolve geralmente um alto custo e também um longo tempo de processo. Segundo Leuenberger *et al.* (1984) este método pode tornar-se vantajoso nas seguintes situações:

- A membrana das células intactas impede a permeação do substrato ou do produto;
- Ocorre degradação do produto ou reações laterais indesejáveis devido à presença de outras enzimas nas células intactas;
- A enzima é extracelular e pode ser facilmente isolada e purificada;
- Uma enzima proveniente de tecido animal ou vegetal precisa ser utilizada;
- A enzima necessária já é comercializada.

Em alguns casos, no método que utiliza enzimas purificadas, não existe a necessidade de purificação completa da enzima, podem ser utilizadas preparações enzimáticas de baixa pureza ou até mesmo extratos celulares crus, porém a utilização de enzima parcialmente purificada pode, no entanto, gerar reações indesejáveis.

Neste mesmo método, quando se verifica que existe a necessidade de utilização de um cofator na reação enzimática, estudos mostram que é preferível utilizar as células intactas. Como as células se encarregam de suprir e regenerar o cofator, a utilização da enzima intacta acaba baixando os custos. Por outro lado, o uso de células íntegras ou intactas pode adicionar contaminantes à mistura reacional e dificultar a recuperação do produto (HOUNG *et al.*, 2003). Além disso, a produtividade é normalmente menor, pois a maioria dos substratos não naturais é

tóxica aos organismos vivos e são tolerados apenas em baixas concentrações (YANG *et al.*, 2005).

No método que utiliza enzimas isoladas ocorre de forma mais comum em reações de hidrólise, mas também apresenta a vantagem de permitir a catálise de reações que não são realizadas em meio aquoso, como esterificações, transesterificações e lactonizações. O equilíbrio entre as reações de hidrólise e o reverso (síntese) pode ser controlado pela atividade de água na mistura reacional: a alta atividade de água favorece a hidrólise; em atividade de água reduzida, as reações de síntese predominam (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Se a enzima é intracelular é preferível utilizar o micro-organismo íntegro, afastando a necessidade do oneroso e complexo isolamento da enzima (VIAZZO *et al.*, 1996). Ainda é necessário que existam mecanismos de transporte adequados para a entrada do substrato na célula e a saída do produto. Isso pode aumentar a seletividade do processo, pois muitas proteínas carreadoras reagem com um único tipo de molécula ou classe química, determinando especificidade ao transporte (MADIGAN *et al.*, 2004).

#### **2.1.3.5 Biotransformação em sistemas multifásicos**

Em geral os processos são formados por uma fase aquosa, que contém o biocatalisador, e por uma fase orgânica, que pode ser o próprio substrato ou um solvente orgânico que atua como um reservatório para o substrato e produto. Logo, a recuperação do produto é facilitada por já estar separado do biocatalisador no reator.

Sistemas aquosos são preferencialmente utilizados nas biotransformações por serem mais compatíveis com enzimas e células. No entanto, muitos substratos apresentam baixa solubilidade em água. A adição de um solvente orgânico ao meio aquoso pode aumentar os rendimentos das reações (LEÓN *et al.*, 1998).

A biotransformação de compostos lipofílicos como esteróides ou terpenóides pode ser limitada pela sua solubilidade em água. A situação pode ser até certo ponto, melhorada com a adição de solventes miscíveis em água ou o uso de agentes emulsificantes (por exemplo, surfactantes do tipo *tween*). Este processo pode acontecer na interface entre as duas fases ou na fase aquosa, sobre a

pequena quantidade de substrato que se solubiliza ao longo do tempo. No entanto, altas concentrações de solventes, assim como de substrato e produto, podem inibir a atividade biocatalítica. Uma solução para o problema consiste em manter uma segunda fase, líquida ou sólida, como um reservatório para o substrato e produto, onde os substratos tóxicos e os inibidores são mantidos em baixas concentrações na fase aquosa, sendo possível adicionar grande quantidade de substrato sem prejudicar o biocatalisador.

As reações de biotransformação realizadas em sistemas bifásicos são implementadas, para proteger os micro-organismos dos efeitos tóxicos de alguns substratos, intermediários e produtos e ao mesmo tempo prever a oxidação dos compostos por ação da água. Desta forma estudos foram realizados utilizando *Pseudomonas putida* nas reações com pinenos onde foram utilizados diversos solventes minimizando problemas associados à biotransformação de terpenos (VAN KEULEN *et al.*, 1998).

Para este processo, o reator pode ser de tamanho menor do que o usado nos sistemas tradicionais. Outra vantagem é a remoção *in situ* do produto, com o deslocamento do equilíbrio termodinâmico em favor da sua formação. Esses fatores contribuem para o aumento da produtividade volumétrica (CARVALHO & FONSECA, 2006).

Por outro lado, os solventes orgânicos podem inibir a reação, desnaturar proteínas e interagir com a membrana celular, causando danos à integridade do biocatalisador. Por isso, o tipo de solvente orgânico e a quantidade utilizada devem ser cuidadosamente analisados para ser atingida a compatibilidade.

#### **2.1.3.6 Biotransformação envolvendo várias etapas**

Biotransformações podem envolver duas ou mais etapas catalisadas por diferentes micro-organismos ou enzimas. A biotransformação como um todo pode ser realizada em apenas uma etapa do processo usando uma mistura de vários biocatalisadores dentro do mesmo reator ou separadamente em um ou mais reatores em série (FAUCONNIER *et al.*, 1999).

### 2.1.3.7 Biotransformações oxidativas e oxigenases microbianas

Devido à presença de diferentes enzimas no interior dos micro-organismos, os processos de biotransformações podem ser conduzidos com diferentes tipos de reações, entre elas a oxi-redução, esterificação e a hidrólise, que podem ser utilizadas na produção de fármacos, aromas e fragrâncias (WELSH *et al.*, 1989; HAGEDORN & KAPHAMMER, 1994). Na Tabela 2, temos alguns exemplos:

**Tabela 2** - Classe de enzimas segundo *Enzyme Commission* e suas aplicações em processos (SANTANIELLO *et al.*, 1992).

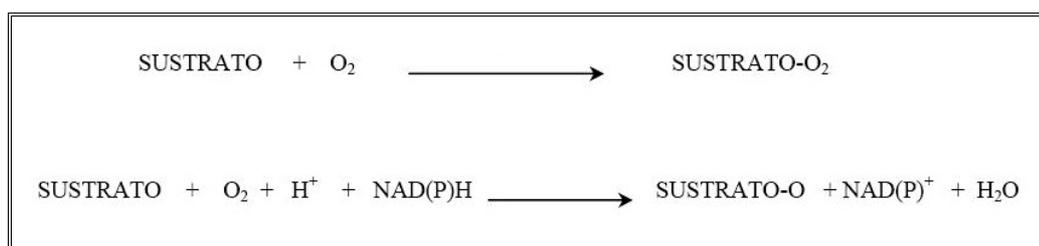
Classe de enzimas	Subclasses mais utilizadas	Reações mais comuns (tipo de reação)	Necessidade de coenzima
Hidrolases	Esterases, lipases, amidases (proteases e acilases), fosfatases e epóxido hidrolases	Hidrólise e formação de ésteres, amidas, fosfato e hidrólise de epóxidos	Não
Oxidoredutases	Desidrogenases, mono e dioxigenases, peroxidases	Oxidação e redução de alcoóis, epoxidação, hidroxilação de alcenos e alcanos	Sim
Transferases	Quinases	Fosforilação (dependente de ATP)	Sim
Ligases	Aldolases, transaldolases, glicosidases, transaminases	Reação aldólica, formação de ligação glicosídica, formação de ésteres sulfato e ligação C-N	Não
Liases	Carboxilases, amônia-liases, hidroliases	Adição e eliminação em ligações como C=C, C=O, C=N	Não
Isomerases	Racemases, epimerases	Isomerização como racemização, epimerização, rearranjos	Não

Em processos de biotransformações, as reações químicas mais utilizadas são as reações de oxidação. A utilização de biocatalisadores oxidativos atualmente é considerada uma alternativa para problemas não solucionados pela catalise química convencional. Problemas este que envolvem principalmente a possibilidade de controle das reações de oxidação a partir de reagentes utilizados. Em contraste, a alta seletividade de enzimas oxidantes constitui uma das principais vantagens no desenvolvimento deste tipo de reação de biotransformação (BURTON, 2003).

Dentre as muitas vantagens do uso destas enzimas, podem ser incluídas, a estereoseletividade, regioseletividade, aumento na funcionalização e a introdução de quiralidade. A efetividade destas reações pode ser atribuída, particularmente, ao alto poder oxidante, através de reações químicas com formação de produtos muito estáveis (SCHTZE *et al.*, 1999; DUETZ *et al.*, 2001; BOYD, 2001; CIRINO & ARNOLD, 2002).

Oxidações microbiológicas são reações de oxidação conduzidas por enzimas presentes em micro-organismos íntegros ou por frações destes. As enzimas que conduzem este tipo de reação são classificadas de acordo com a característica do produto obtido (FABER,1995). As enzimas que catalisam a incorporação direta do oxigênio molecular em uma molécula orgânica são denominadas oxigenases e compreendem várias famílias de proteínas. Por muito tempo, as oxigenases foram consideradas enzimas incomuns, cuja presença se limitava a organismos vivos primitivos como bactérias e fungos do solo (HAYAISHI *et al.*, 1955; URLACHER *et al.*, 2004).

O ar serve como fonte de oxigênio molecular enquanto que equivalentes de redução são derivados do NADH<sub>2</sub> ou NADPH através de proteínas de transferência de elétrons, podendo ser visualizado na Figura 2 (Petersen, 2006).



**Figura 2** - Reações gerais de oxidação catalisadas por oxigenases (MOLINA,2007).

As monoxigenases mais estudadas e usadas em biotransformação até agora pertencem ao grupo citocromo P-450. As P-450 têm sido submetidas a numerosos estudos de engenharia genética com a finalidade de compreender suas funções e propriedades para convertê-las em catalisadores mais eficientes (SCHLITING *et al.*, 2000; CIRINO & ARNOLD, 2002). As P-450 catalisam preferencialmente a monoxigenação de compostos hidrofóbicos e tem a extraordinária capacidade de introduzir oxigênio em ligações C-H não ativadas (URLANCHER & SCHMID, 2006).

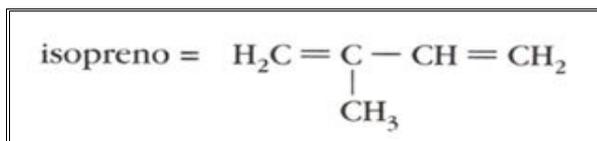
Esta enzima, facilmente encontrada em praticamente todas as células vivas, aparece como principal modelo de agente biocatalítico de oxidação, e tem mostrado grande potencial na oxidação de diversas classes de substâncias, entre elas a dos monoterpenos (VAN DER WERF *et al.*, 1997). As enzimas P-450 ocorrem frequentemente como sistemas complexos com estrutura quaternária formada por 2 componentes: uma hidroxilase e uma redutase (ROTTAVA, 2010).

## 2.2 Terpenos

Os óleos essenciais são uma fonte abundante de terpenos voláteis, substâncias largamente distribuídas na natureza. Estes ocorrem amplamente na natureza, na sua maioria em plantas, mas também em alguns animais e micro-organismos. Os terpenos e seus derivados, os terpenóides, constituem um dos grandes grupos de metabólitos secundários presentes em grande proporção no reino vegetal e são os responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais (constituintes odoríferos das plantas que podem ser extraídos a partir da destilação em corrente de vapor). Ocorrem abundantemente em partes vegetativas, frutos e flores e apresentam uma elevada concentração nas estruturas reprodutoras e nas folhas durante, e imediatamente após, a floração. É também a classe mais representativa nas resinas das plantas, além de serem ótimas substâncias para conversões estereoespecíficas (DUDAREVA *et al.* 2005; PADUCH *et al.* 2007).

Fragrâncias florais, frutadas, amadeiradas e cítricas destacam-se dentre os aromas apresentados por terpenos isolados. Esta variedade de fragrâncias e aromas, ponto de grande relevância no interesse comercial por estes produtos, pode ser atribuída à ocorrência de um grande número de isômeros para esta classe de metabólitos (PETERSEN, 2006).

Estas substâncias naturais são denominadas como terpenos e são constituídas por unidades C<sub>5</sub>, denominadas unidades isoprênicas ou “unidades do isopreno”, acopladas no modo “cabeça-cauda”, derivados do 2-metil-butadieno, as quais podem ser representadas da seguinte maneira (Figura 3):



**Figura 3** - Representação de uma unidade de isopreno (PETERSEN, 2006).

As substâncias C<sub>5</sub>, denominadas hemiterpenos, raramente são encontradas na natureza, em sua forma livre. No entanto, a fusão de duas ou mais unidades isoprênicas resulta numa das mais importantes classes de substâncias, extremamente rica em diversificações estruturais, tanto no tamanho como na forma de suas cadeias carbônicas, denominadas de esqueletos terpênicos. A fusão das unidades de isopreno pode ser “cabeça-cauda” formando cadeias lineares ou podem formar anéis. Os terpenos podem existir como hidrocarbonetos ou podem também estar ligados à compostos com oxigênio como grupos hidroxilos, carbonilos, cetonas ou aldeídos (PADUCH *et al.* 2007).

Existe mais de 30.000 terpenoides conhecidos, sendo divididos em vários subgrupos de acordo com o número de unidades isoprênicas. Os terpenos mais abundantes são constituídos por 10, 15, 20 e 30 átomos de carbono, denominados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, respectivamente, conforme Tabela 3.

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como diterpenos, são geralmente encontrados em óleos vegetais extraídos com solventes orgânicos além de serem unidades terpênicas pouco voláteis e, portanto, excluídas do grupo dos óleos essenciais (SCHANTZ, 1967; CROTEAU, 1987; TYLER *et al.*, 1996; PETERSEN, 2006).

**Tabela 3** - Classificação de terpenos segundo unidades isoprênicas (SJÖSTRÖM, 1981).

Prefixo	Número de átomos de carbono	Número de unidades de isopreno C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>
Mono	10	2
Sesqui	15	3
Di	20 (ácidos resínicos)	4
Tri	30 (esteróides)	6
Tetra	40 (carotenóides)	8
Poli	>40 (borrachas naturais)	>8

Sabe-se que os terpenos não se formam na natureza a partir do isopreno, o qual nunca foi encontrado como produto natural. Existem nas plantas duas vias biosintéticas para a produção de terpenos: uma citosólica, a via do ácido mevalônico e outra plastidial denominada via independente do ácido mevalônico ou via 1-deoxi-D-xilulose fosfato (DXP) ou ainda via metileritritol fosfato (MEP). O precursor dos terpenos é o ácido mevalônico (Figura 4) que é produzido a partir da acetil-CoA. Os precursores dos terpenos são identificados como ésteres difosfatos denominados pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e pirofosfato de isopentilalila (IPP) (DEWICK, 1997).

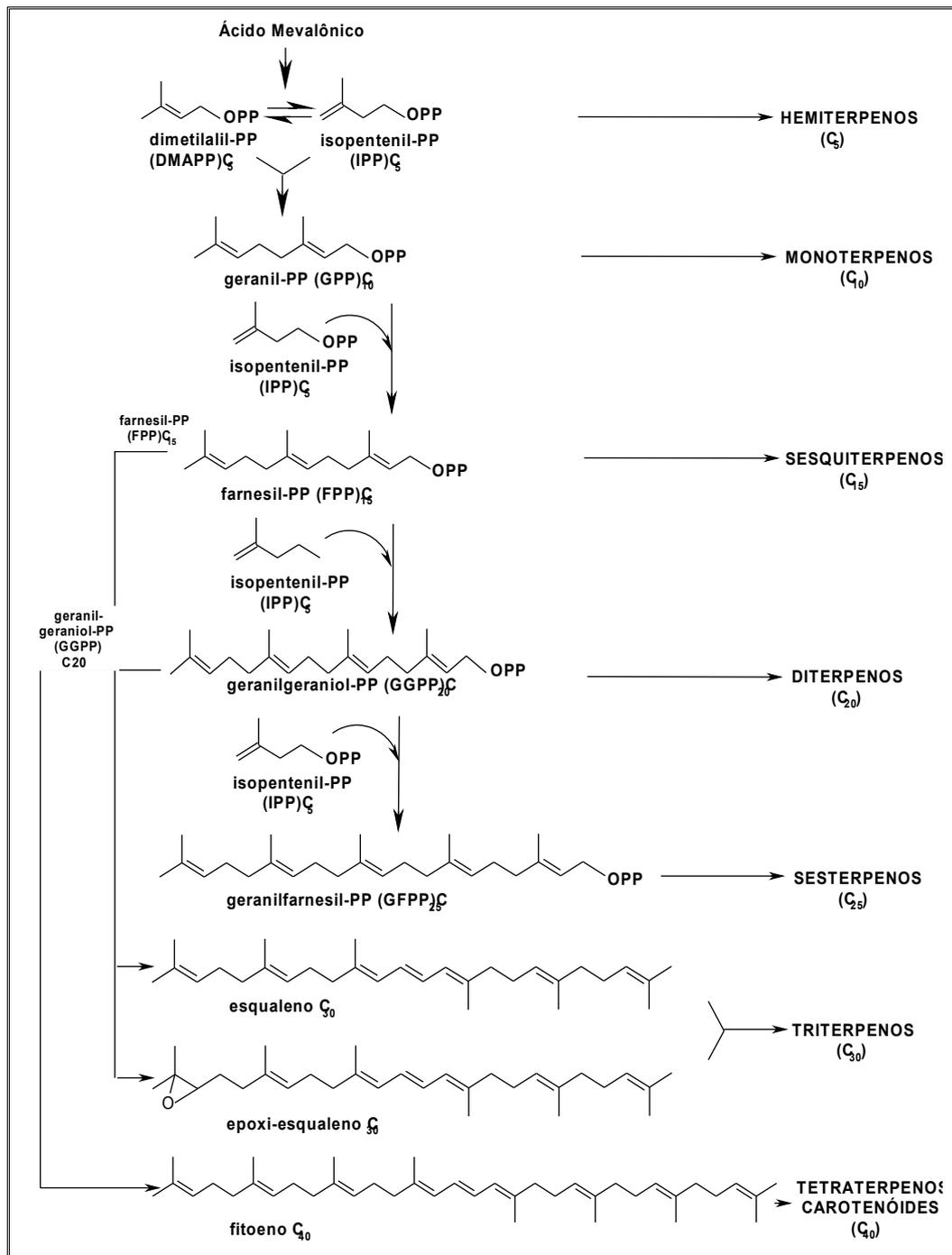


Figura 4 - Esquema de condensação de unidades isoprênicas – formação dos precursores de terpenos C10, C15, C20, C25, C30 e C40 (TONIAZZO, 2005).

A biossíntese de monoterpenos ocorre pela combinação de DMAPP e IPP via enzima preniltransferase, formando a unidade básica pirofosfato de geranila (GPP) em um mecanismo que envolve a ionização de DMAPP, com formação de um cátion alílico e com a adição à dupla ligação da molécula de IPP. O encadeamento “cabeça-cauda” destes isômeros ocorre através de uma reação de adição

eletrofílica, seguida de eliminação estereoespecífica de próton. Sendo assim, a fusão de uma unidade IPP a uma unidade DMAPP produz o geranyl-pirofosfato (GPP), precursor dos terpenos C<sub>10</sub>, os monoterpênicos. Adição de uma unidade IPP à GPP resulta no farnesil-pirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C<sub>15</sub>). Sucessivos acréscimos de unidades IPP originam o geranylgeraniol-pirofosfato (GGPP) e geranyl-farnesil-pirofosfato (GFPP), precursores dos diterpenos (C<sub>20</sub>) e sesterpenos (C<sub>25</sub>), respectivamente. A formação dos precursores dos triterpenos (C<sub>30</sub>) ocorre de forma diferenciada dos anteriores. O esqualeno (precursor de C<sub>30</sub> de plantas inferiores) e o epóxi-esqualeno (gerador dos triterpenos de plantas superiores), são formados por encadeamento “cauda-cauda” de duas unidades C<sub>15</sub> (FPP). A condensação “cauda-cauda” de duas unidades C<sub>20</sub> (GGPP) resulta no fitoeno, precursor dos tetraterpenos, mais conhecidos como carotenóides (C<sub>40</sub>) (DEWICK, 1997).

A ligação dupla formada apresenta geralmente configurações trans, mas a unidade GPP pode sofrer modificações através de sua ligação dupla formando isômeros LPP (pirofosfato de linalila) e NPP (pirofosfato de nerila), o que possibilita a obtenção de novos monoterpênicos. Com a mudança da estereoquímica são obtidos compostos com diferentes características principalmente quanto à sua utilização como flavorizantes e perfumes, propriedades relacionadas com a presença de grupos funcionais diversos tais como alcoóis, aldeídos e ésteres (HARBORNE, 1989; MANN, 1994; DEWICK, 1997; PETERSEN, 2006).

Podemos destacar os terpenos oxigenados como aqueles de maior importância para a indústria por apresentarem sabores e odores característicos, sendo atrativos do ponto de vista industrial. Estudos reafirmam a importância destes compostos como flavorizantes em processos industriais, como nas fermentações envolvendo a produção de cerveja (KING & DICKINSON, 2003) e na produção de alimentos, onde alguns exemplares terpenóides conferem sabor até 1000 vezes mais doce do que a sacarose (SOUTO-BACHILLER *et al.*, 1997; PETERSEN, 2006).

Dentre os 60-100 compostos de aromas e fragrâncias produzidos biotecnologicamente em escala industrial, poucos terpenóides estão entre eles, apesar de suas características sensoriais únicas e crescente demanda. As principais razões para tal baseiam-se na natureza química das substâncias e nas moléculas de

interesse: baixa solubilidade, alta volatilidade e citotoxicidade dos terpenos e terpenóides impedem bioprocessos convencionais (SCHRADER & BERGER, 2001).

## 2.3 Monoterepenos

Os monoterepenos são moléculas contendo 10 átomos de carbono em sua estrutura, se classificam em acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (WHITTAKER, 1972; IKAN, 1991; BAUER *et al.*, 2001).

A diversidade de moléculas monoterpênicas estende-se consideravelmente através de reações de ciclização, as quais possibilitam a formação de sistemas monocíclicos e bicíclicos, observados para um grande número de compostos voláteis já relatados. Assim a grande maioria dos monoterepenos isolados deriva de processos de ciclização (DEMYTTENAERE & KIMPE, 2001; PETERSEN, 2006).

### 2.3.1 Monoterepenos acíclicos

Muitos terpenos têm também as unidades isoprênicas dispostas em anéis, cuja biossíntese é feita através de precursores de cadeia aberta por reações de ciclização via carbocátions (Figura 5).

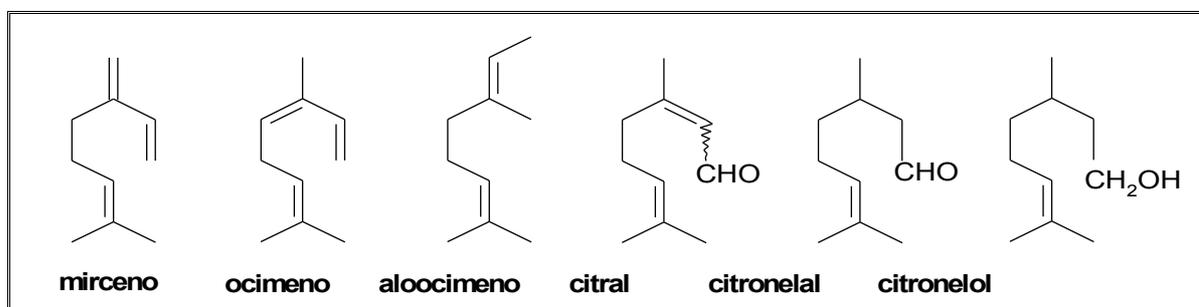


Figura 5 - Exemplos de monoterepenos acíclicos (TONIAZZO, 2005).

Existem também os compostos oxigenados, como o geranial e o neral, aldeídos isômeros que na natureza aparecem na forma de uma mistura denominada

citral, o citronelal e o citronelol. A maior parte dos monoterpenos acíclicos existentes na natureza possui aromas agradáveis, o que os tornam interessantes na indústria de aromas e fragrâncias (ROTTAVA; 2010).

### 2.3.2 Monoterpenos monocíclicos

A maioria dos monoterpenos monocíclicos possui o esqueleto *p*-mentano. Dentre os 14 dienos isômeros possíveis a partir deste esqueleto, apenas 6 existem na natureza (Figura 6).

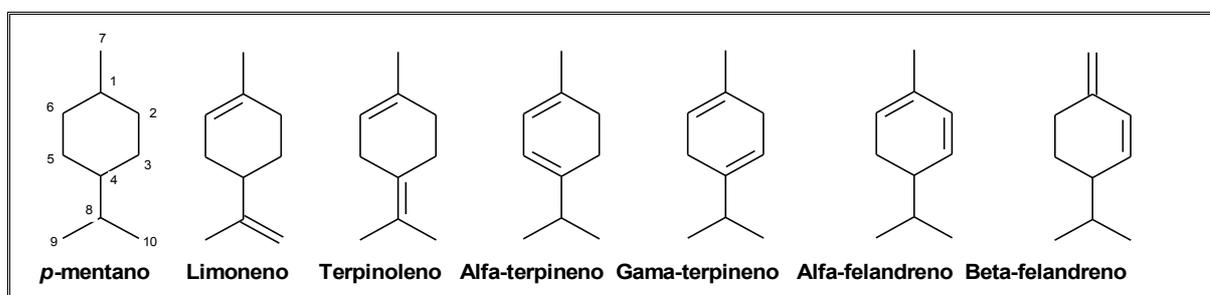


Figura 6 - Estrutura de isômeros do *p*-mentano (TONIAZZO, 2005).

Existe um grande grupo de monoterpenos monocíclicos oxigenados. Alguns podem ser considerados como produtos da desidratação do 1,8-terpin. Neste grupo, encontram-se o  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -terpineol e o 1,8 cineol (Figura 7).

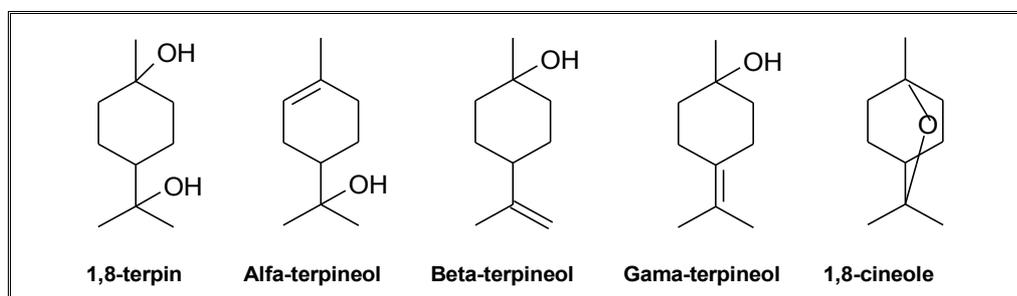


Figura 7 - Estrutura de 1,8-terpin e seus derivados (TONIAZZO, 2005).

Compostos oxigenados nas posições 2 e 3 fazem parte de um extenso grupo de álcoois e cetonas com vários graus de insaturações e complexa estereoquímica. Alguns integrantes deste grupo encontram-se representados abaixo na Figura 8:

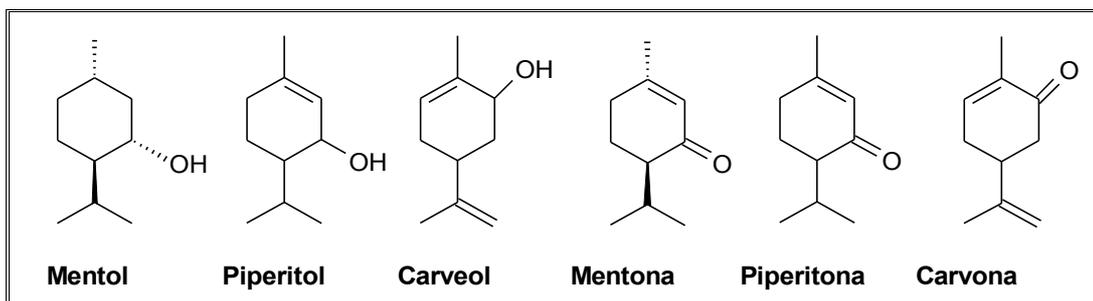


Figura 8 - Estrutura de monoterpenos monocíclicos oxigenados nas posições 2 e 3 (TONIAZZO, 2005).

Existem poucos terpenóides oxigenados nas posições 7 e 10. Destacam-se o álcool, aldeído e ácido perílico e o 1-*p*-menteno-9-al (Figura 9).

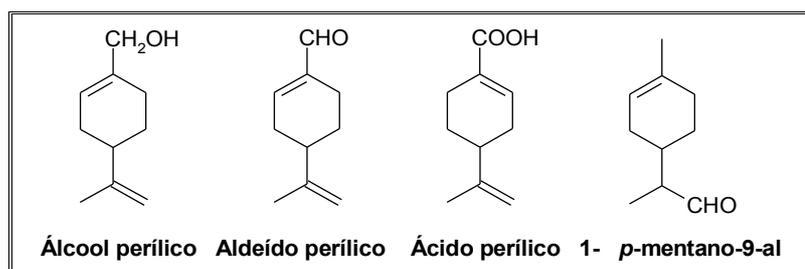


Figura 9 - Estrutura de monoterpenos oxigenados nas posições 7 e 10 (TONIAZZO, 2005).

### 2.3.3 Monoterpenos bicíclicos

Os monoterpenos bicíclicos são subdivididos em cinco grupos de acordo com o esqueleto carbônico. Os grupos ou séries foram nomeados de acordo com o hidrocarboneto saturado de origem. Abaixo se encontram representados os esqueletos de cada um dos grupos, assim como a numeração adotada para os átomos de carbono de sua estrutura. Compostos bicíclicos sofrem, com relativa facilidade, rearranjos no esqueleto carbônico, gerando produtos com esqueletos diferentes do material de partida (Figura 10).

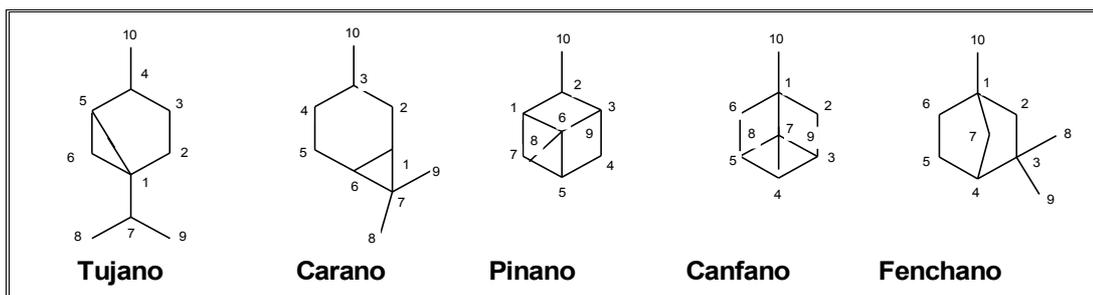


Figura 10 - Séries de monoterpenos bicíclicos (TONIAZZO, 2005).

Os membros das séries dos tujanos e caranos (Figura 11) caracterizam-se pela presença de um anel de ciclopropano que se abre quando submetido às condições ácidas. Os membros das séries dos pinanos apresentam um anel ciclobutano, que pode facilmente sofrer expansão ou clivagem. Estas reações definem a química dos pinenos.

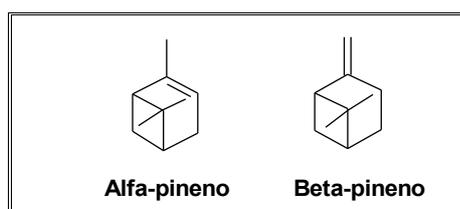


Figura 11- Monoterpenos bicíclicos da série dos pinenos (TONIAZZO, 2005).

Existe uma grande quantidade de compostos oxigenados que deriva dos pinenos. Os mais importantes são álcoois, aldeídos e cetonas (Figura 12).

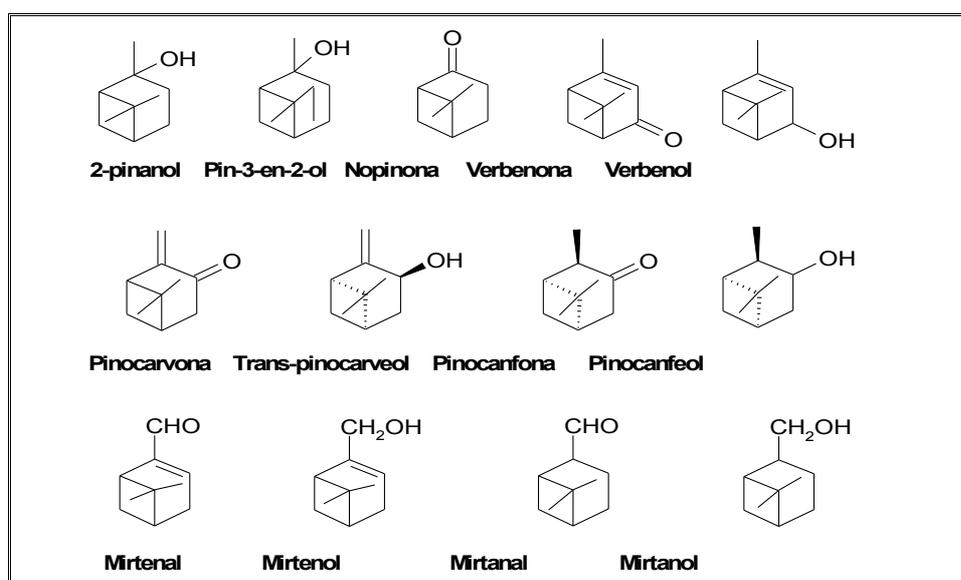


Figura 12 - Derivados oxigenados dos pinenos (TONIAZZO, 2005).

Os compostos da série dos canfanos e fenchanos (Figura 13) apresentam um anel de ciclopentano. A cânfora é o principal representante da série dos canfanos.

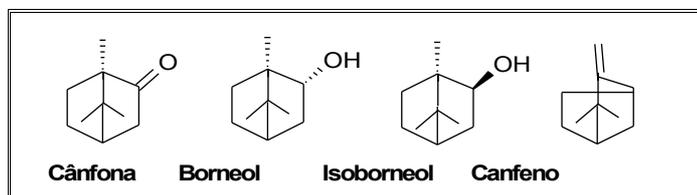


Figura 13 - Série dos canfanos (TONIAZZO, 2005).

Fenchona é o principal representante da série dos fenchanos (Figura 14) onde outros compostos similares aos da série dos canfanos são encontrados.

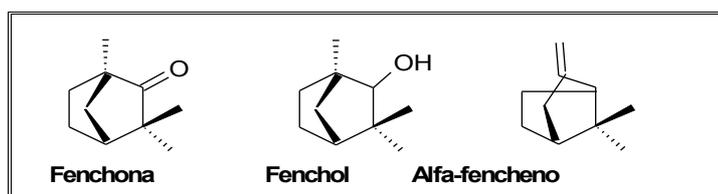


Figura 14 - Série dos fenchanos (TONIAZZO, 2005).

Os estudos de monoterpenos bicíclicos também é de grande interesse, o que justificou a realização de importantes trabalhos como de YOO *et al.* (2001), que empregaram  $\alpha$  e  $\beta$  pinenos utilizando *Pseudomonas* sp. com formação de limoneno, cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\alpha$ -terpeniol e borneol, sendo bioconvertidos 33,5% de  $\alpha$ -pineno e de 58,8% de  $\beta$ -pineno (PETERSEN, 2006).

## 2.4 Biotransformação de monoterpenos

A biotransformação de monoterpenos pode resultar em compostos de alto valor na indústria de aromas e fragrâncias, este é um processo biológico pelo qual um precursor apropriado é modificado para um produto recuperável, especialmente aqueles que levam à compostos com funções oxigenadas, este processo é catalisado por enzimas e gera produtos com aromas característicos e agradáveis.

Os produtos contendo oxigênio têm maior valor de mercado que os hidrocarbonetos correspondentes, em geral. Isto ocorre porque são intermediários sintéticos mais avançados, ou produtos finais com diferentes usos, sejam em cosméticos, fragrâncias ou substratos para polímeros, entre outros. Em particular, monoterpenos oxigenados, por exemplo, carvona, verbenona e pinocarvona, constituem-se em substâncias reconhecidamente importantes na indústria de alimentos, cosméticos e perfumaria. Limoneno, alfa- e beta-pinenos são os substratos de eleição para produção destes e outros monoterpenos oxigenados (ANTUNES, 2005).

A utilização de micro-organismos e suas enzimas na produção de um determinado composto, assim como a manipulação genética destes, podem substituir complexas sínteses que necessitam de diversas etapas para a obtenção do produto desejado, por um único passo de biotransformação. Muitos estudos descrevem a biotransformação de terpenos utilizando enzimas, extratos celulares e células inteiras de bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos e plantas (DE CARVALHO & DA FONSECA, 2006).

As biotransformações diferem das fermentações, nas quais os produtos, como antibióticos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos e solventes, originam-se a partir de substratos simples pela ação de um complexo sistema biossintético do metabolismo (SATO, 2001). Várias reações de biotransformação foram relatadas em outros trabalhos, como a hidroxilação em outras posições da molécula, a desidrogenação (inserção de dupla ligação), oxidação de alcoóis a cetonas, clivagem da cadeia lateral, dentre outras.

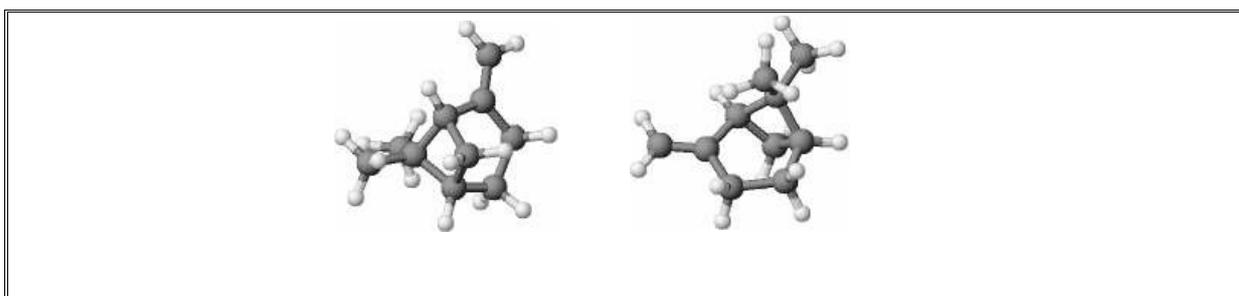
As oxidações catalíticas seletivas de moléculas orgânicas se encontram dentro dos mais importantes processos tecnológicos na indústria química. Entre os compostos naturais suscetíveis a transformações biocatalíticas se encontram os monoterpenos, principalmente limoneno,  $\beta$  e  $\alpha$ -pineno, que por serem os mais abundantes nas espécies vegetais, se tornam candidatos ideais para a geração de oxi-derivados (MOLINA, 2007).

Apesar de existirem vários trabalhos na literatura referentes a processos de biotransformação com esses compostos, ainda é necessária a busca de micro-

organismos que conduzam a conversões maiores e mais seletivas, otimizando o processo (ROTTAVA, 2010).

### 2.4.1 Biotransformação de beta-pineno

Além de ser obtido por fracionamento da terebentina, o  $\beta$ -pineno (6,6-dimetil-2-metileno) (Figura 15) pode ser obtido a partir da isomerização de  $\alpha$ -pineno, porém nenhum método totalmente sintético existe. O  $\beta$ -pineno é comercializado com pureza de 80 a 95%, dependendo do uso (ENCYCLOPEDIA.ORG, 2003; KIRK & OTHMER, 1981; KOLICHESKI, 2009).



**Figura 15** - Representação esquemática do  $\beta$ -pineno (WIKIMEDIA COMMONS, 2010).

Experimentos realizados por Petersen (2006) com óleo de terebentina, composto principalmente por  $\beta$ -pineno, foram realizados com células vegetais de *C. roseus*, o resultado mostrou que o óleo foi completamente consumido e como produto principal obteve-se  $\alpha$ -terpeniol.

Os pinenos são de grande valor como precursores dos aromas e a maioria dos seus derivados (84%) ocorrem por síntese química (AGER, 1999, YOO *et al.*, 2001). A Tabela 4 apresenta alguns exemplos de biocatalizadores tendo como substrato  $\alpha$  e  $\beta$  – pineno.

Substrato	Biocatalisador	Produtos	Referências
		Verbenona, trans-verbenol,	
$\alpha$ -pineno	<i>Hormonema</i> sp.	Pinocanfona,	Van DYK et al. (1998)
$\beta$ -pineno	UOFS Y-0067	3-hidroxi-pinocanfona	
			AGRAWAL & JOSEPH (2000)
$\alpha$ -pineno	<i>Aspergillus</i> sp.	Verbenol	(2000)
	<i>Penicillium</i> sp.	Verbenona	
		Verbenona, $\alpha$ -terpineol, borneol,	
$\alpha$ -pineno	<i>Aspergillus</i>	limoneno, terpinen-4-ol,	ROSENBAUM (2000)
$\beta$ -pineno	<i>niger</i>	$\rho$ -cimene-8-ol, álcool fenchílico, pinocarvona, pinocarveol	
$\alpha$ -pineno	<i>Botrytis cinerea</i>	3 $\beta$ - hidroxi(-)- $\beta$ -pineno, 9- hidroxi(-)- $\alpha$ -pineno,	FAROOQ et al. (2002)
$\alpha$ -pineno	<i>Pseudomonas</i>	4 $\beta$ - hidroxi(-)- $\alpha$ -pineno-6-one $\rho$ -cimeno, limoneno, $\alpha$ -	YOO et al. (2001)
$\beta$ -pineno	sp.	terpineol, $\alpha$ -terpinoleno, borneol	YOO E DAY (2002)

A maioria dos micro-organismos utilizados como biocatalisadores na produção de terpenos são os fungos, e um exemplo típico é o gênero *Ceratocystis* que produz compostos de aroma. A produção de compostos de aromas diversos (citronelol, geraniol, linalol, nerol,  $\alpha$ -terpineol e outros) utilizando cepas de *Ceratocystis* foi verificado na literatura (BLUEMKE & SCHRADERB, 2001;. COLLINS & HALIM, 1977;. LANZA et al., 1976,.; HUBBALI et al., 1978).

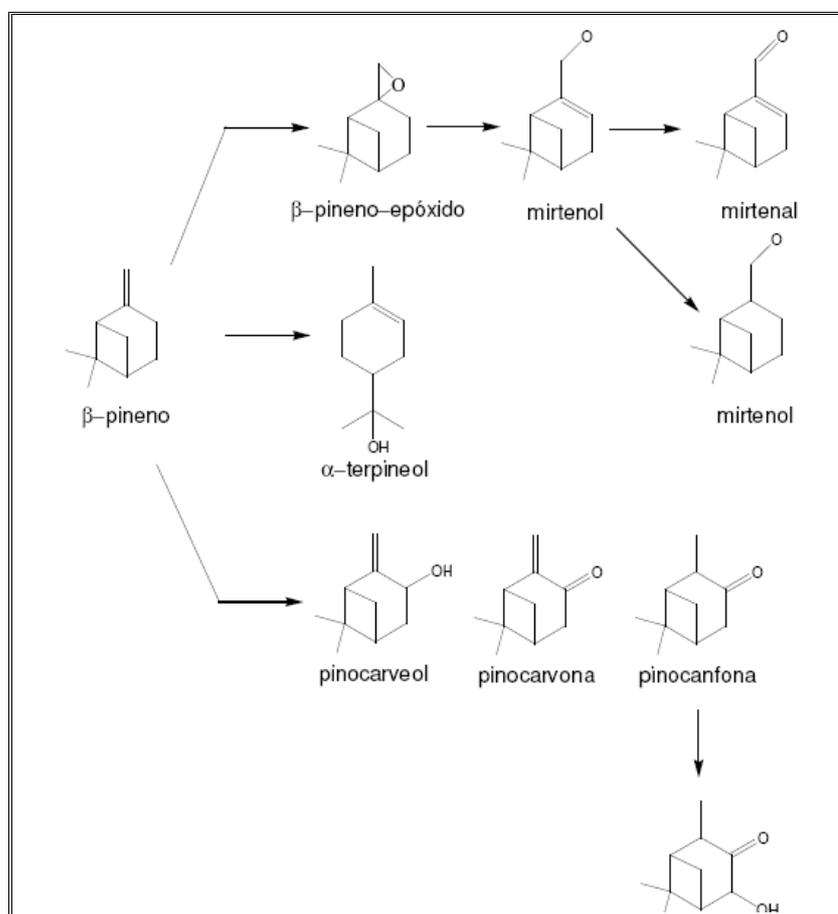
Diversas rotas estão descritas para a biotransformação do  $\beta$ -pineno. A biotransformação de  $\beta$ -pineno por *Homonema* sp. resultou na produção de pinocanfona (0,1 g/L) e da hidróxicetona 3-hidróxi-pinocanfona (0,2 g/L) após 72h (VAN DYK, VAN RENSBURG & MOLELEKI 1998).

Busmann e Berger (1994) relataram a biotransformação de  $\beta$ -pineno por basidiomicetos. Os produtos obtidos foram 42 verbenol, verbenona, mirtenol e trans-

pinocarveol. Mais recentemente, Lindmark-Henriksson (2003) relatou algumas rotas metabólicas para sua biotransformação.

Nos experimentos realizados por Petersen (2006), utilizando  $\beta$ -pineno, levaram a obtenção do mesmo produto majoritário, sugerindo que a formação de  $\alpha$ -terpeniol ocorreu para os 3 ensaios realizados, através de um mesmo conjunto de enzimas, a biotransformação foi realizada utilizando culturas de células vegetais de *Catharanthus roseus*.

A Figura 16 abaixo mostra alguns dos produtos obtidos da biotransformação deste monoterpreno.



**Figura 16** - Principais rotas metabólicas envolvidas na biotransformação de  $\beta$ -pineno (BUSMANN & BERGER, 1994; Van DYK *et al.*, 1998; LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

Quando  $\beta$ -pineno foi submetido à biotransformação por diversos organismos, vários produtos foram originados: *trans*-pinocarveol por linhagens de *Aspergillus niger* e *Armillariella mellea*; 1,4-cineol, 1,8-cineol, mirtenol e mirtenal por *Ganoderma*

*applanatum* e *Pleurotus flabellatus*; borneol, cânfora e ácido b-isopropimérico por *Pseudomonas* sp.; e pinocanfona e isopinocanfona por *Hyssopus officinalis* são alguns dos principais relatos (Lindmark-Henriksson, 2003).

## 2.5 Resíduo agroindustrial

As indústrias alimentares, agrícolas e florestais geram anualmente milhões de toneladas de resíduos, por exemplo, bagaços, cascas, polpas, resíduos aquosos e outros, muitos dos quais levantam questões sérias de eliminação e, conseqüentemente, custos consideráveis para diversas indústrias. Portanto, uma gestão integrada destes resíduos de acordo com o conceito de "reduzir, reutilizar e reciclar" está constantemente a ser pesquisado (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

O resíduo agroindustrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A simples disposição destes no meio ambiente pode gerar emissões para a atmosfera, para as águas ou para o solo.

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, onde alguns órgãos governamentais e industriais estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza (PELIZER *et al.*, 2007).

Uma das alternativas é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como matérias-primas (meio de cultura) na produção de compostos com interesse industrial e de valor acrescentado (ORZUA *et al.*, 2009).

Atualmente, eles têm sido utilizados como meio de cultura em processos, o uso de meios de cultura de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção, pois se representam como uma fonte alternativa de baixo valor comercial, além de apresentarem disponibilidade local.

Dentre os resíduos temos como exemplo e com maior disponibilidade o soro de queijo, torta e óleo de soja, efluente frigorífico, hidrolisado de levedura, água de parboilização de arroz e a água de maceração de milho.

Maróstica Jr. e Pastore (2007), utilizaram manipueira (água do processamento de farinha de mandioca) como meio para crescimento micelial dos fungos *Penicillium* sp. 2025, *Aspergillus* sp. 2038 e *Fusarium oxysporum* 152B. Após três

dias, a cultura foi filtrada e transferido o inóculo para frascos com 50 mL de meio mineral adicionado de 50  $\mu$ L (0,1 %) de óleo essencial de laranja, para realização da biotransformação. Duas subseqüentes adições de 50  $\mu$ L de óleo essencial de laranja foram efetuadas a cada 24h, uma pequena quantidade de R-(+)- $\alpha$ -terpineol foi produzido por todas as cepas.

## 2.6 Considerações finais

A importância dos aromas e fragrâncias, assim como o espaço que os monoterpenos e seus derivados ocupam neste setor, já foi demonstrada através dos vários estudos publicados sobre o assunto. Além dos compostos mencionados, a gama de produtos obtidos a partir da biotransformação de  $\beta$ -pineno é ampla (TONIAZZO, 2005).

Deve-se agora voltar à atenção para o enorme potencial que têm os processos biotecnológicos, onde compostos de aroma produzidos por biotransformação tendem a substituir os compostos de aroma obtidos sinteticamente. Isso se deve principalmente, como demonstrado ao longo desta revisão, às vantagens que o processo de biotransformação oferece frente à síntese química além da potencialidade das transformações microbianas em produzir compostos de aroma novos e com aplicações diversas na indústria (ROTTAVA, 2010).

A utilização de fungos filamentosos, bactérias e leveduras e suas enzimas como eficazes catalisadores biológicos, utilização de resíduo agroindustrial como fonte alternativa de meio de cultivo, obtendo produtos naturais, e a maximização destes processos por técnicas de engenharia bioquímica são necessárias no sentido de se alcançarem maiores rendimentos que tornem o processo economicamente viável e, conseqüentemente, atraente e aplicável para as indústrias de aromas e fragrâncias (TONIAZZO, 2005).

## 3 MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 Micro-organismo

Fungo filamentosos, *Aspergillus* sp., codificado como 04.05.08, pré-selecionado, isolado de caule de laranjeira por Rottava et al. (2010).

### 3.2 Material

#### 3.2.1 Reagentes/solventes e meios de cultura

Os principais reagentes e meios de cultura utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Acetato de etila (99,5%, Vetec)
- Sulfato de sódio anidro (99%, Vetec)
- Álcool etílico absoluto (99,5%, Nuclear)
- Caldo PD (*Potato Dextrose*: 4g/L de infusão de batatas, 20g/L de dextrose, pH 5,1 ± 0,2, Acumedia)
- Meio PDA (*Potato Dextrose Agar*: 4 g/L de infusão de batatas, 20g/L de dextrose, 15g/L de agar, pH 5,1 ± 0,2, Acumedia)
- Meio Mineral (0,5g/L de MgSO<sub>4</sub>, 3,0g/L de NaNO<sub>3</sub>, 1,0g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g/L de KCl, 0,01g/L de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Brunerie *et. al.*, 1987)
- Diluente Água Salina (8,5g/L NaCl)
- Tween 80 (Vetec)
- Glicerol (glicerina bidestilada 85% PA, Merck – Alemanha)
- Água de Maceração de Milho (AMM) cedida pela CornProducts – Mogi Guaçu/SP
- Água de Parboilização do Arroz (APA) cedida pela Indústria Nelson Wendt-Pelotas/RS.

Todos os reagentes e solventes foram empregados sem nenhum tratamento prévio. Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico.

### 3.2.2 Substratos e padrões químicos

Como substratos e padrões químicos foram usados:

- (-)- $\beta$ -pineno (99%, Fluka)
- (+)- $\alpha$ -terpineol ( $\geq 97.0$  % - soma de enantiômeros, GC, Fluka)

## 3.3 Metodologia

### 3.3.1 Esterilização dos materiais e meios de cultivo e de reação

Todos os materiais empregados foram esterilizados por meio de calor seco (em estufa) à temperatura de 180°C por um período de 2 horas. Os meios de cultivo e de reação foram esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) à temperatura de 121°C por um período de 15 minutos.

### 3.3.2 Curva de crescimento do micro-organismo 04.05.08

Para determinar o perfil do crescimento do micro-organismo utilizado (04.05.08) foi traçada uma curva de crescimento para posteriormente definir o melhor tempo de início do processo de biotransformação. Para obtenção do inóculo fez-se a contagem dos esporos e igual volume da solução de esporos foi adicionada para cada Erlenmeyer. Aliquotas de 1 mL de suspensão de esporos ( $5 \times 10^6$  esporos/mL) foram transferidas assepticamente para erlenmeyers contendo 30 mL de caldo PD (*Potato Dextrose*) e incubados a 28°C, 120 rpm durante 5 dias para a determinação da biomassa.

Na determinação da concentração celular por medida de peso seco foi necessário utilizar amostras de volumes conhecidos que represente o todo. No caso de uma cultura micelial, ou crescimento com formação de *pellets*, a distribuição da biomassa impede que sejam retiradas amostras de partes do volume. Sendo assim, para se determinar a curva de crescimento do fungo filamentoso utilizado neste estudo, após o crescimento deste em caldo PD, em cada ponto de amostragem, um frasco inteiro foi filtrado a vácuo (MARCONI Modelo MA 058) e a biomassa retida no papel de filtro previamente tarado, foi então seca e pesada até obtenção de peso constante (24 h, 105°C). A curva de crescimento microbiano foi construída a partir dos dados de biomassa obtidos a partir do peso seco.

### 3.3.3 Produção de inóculo

Para o preparo do inóculo, uma alçada de esporos foi transferida assepticamente para tubos de centrifuga contendo 20 mL de caldo PD e incubados em agitador orbital (120 rpm) a 28°C por 36 h para atingir o final da fase exponencial de crescimento. Depois de 36 h de crescimento dos micro-organismos, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado. Foi acrescentada água destilada estéril a um volume final de 20 mL. Os tubos foram agitados para ressuspender as células e centrifugados novamente. O sobrenadante foi então descartado e massa celular precipitada foi transferida a um erlenmeyer contendo 30 mL de meio mineral para a realização da reação de biotransformação (ROTTAVA, 2010).

### 3.3.4 Avaliação das condições experimentais nas reações de biotransformação

Nas reações de biotransformação foram empregadas cinco condições experimentais diferentes para a adição do substrato, que define o início da reação, sendo estas identificadas por R01, R02, R03, R04 e R05.

R01 - o micro-organismo foi cultivado em caldo PD por 36 horas (final da fase exponencial de crescimento, conforme apresentado na curva de crescimento, onde o

micro-organismo apresenta um crescimento máximo sendo assim mais resistente a toxicidade do substrato) e a adição do substrato foi realizada diretamente neste mesmo frasco, em adição única de 1,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 1,5% (v/v) de etanol absoluto.

R02 - após 36 horas de crescimento do micro-organismo em caldo PD, foi realizada a centrifugação das células, e após estas transferidas para outro frasco com Meio Mineral e realizada adição única de 1,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 1,5% (v/v) de etanol absoluto.

R03 - o substrato foi adicionado de forma sequencial, ou seja, três adições de 0,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto. Para este experimento o micro-organismo foi cultivado em caldo PD, sendo adicionado diretamente neste frasco o substrato. As adições ocorreram nos tempos de 12, 24 e 36 horas de crescimento do micro-organismo.

R04 - o micro-organismo foi cultivado em caldo PD por 36 horas e a adição do substrato foi realizada diretamente neste mesmo frasco, em três alíquotas de 0,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto, após 24, 48 e 72 horas de reação.

R05 - após 36 h de crescimento do micro-organismo em caldo PD, foi realizada centrifugação das células, e após transferidas para outro frasco com Meio Mineral. Nesta reação foram realizadas três adições de 0,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto, após 24, 48 e 72 horas de reação.

Todos os experimentos foram feitos em triplicata, conduzidos em paralelo com o controle, nas mesmas condições, sem a presença de micro-organismos (meio mineral mais (-)- $\beta$ -pineno ou PD mais (-)- $\beta$ -pineno), o pH do meio ficou em torno de 4,5. Foram mantidos em agitador orbital a 28°C e 175 rpm durante 7 dias.

A temperatura dos experimentos foi definida baseada no trabalho realizado por Tan & Day (1998b), eles relataram a utilização de micélio de *Penicillium digitatum* para obter *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol (0,83 mg/mL). A temperatura ótima relatada é de 28°C com um pH de 4,5, alcançando a maior concentração do produto depois de 48 horas de reação.

Toniazzi *et al.* (2005) mostrou que o EtOH teve um efeito positivo na biotransformação, quando aplicado em concentração de 1mL/100mL. O substrato foi adicionado como solução em etanol absoluto (1:1 v/v). Em todos os experimentos foi

usado 1mL/100mL de substrato em 1mL/100mL de EtOH, a 25°C e 150rpm durante 6 dias.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers fechados com tampa de vidro para evitar a evaporação do produto ou substrato (TONIAZZO *et al.*, 2005; TONIAZZO *et al.*, 2006).

### **3.3.5 Extração, identificação e quantificação dos produtos obtidos na biotransformação**

#### **3.3.5.1 Extração**

Ao final de cada reação a biomassa do fungo filamentoso foi removida por filtração. A recuperação dos produtos foi realizada através de extração líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt) e seca em sulfato de sódio anidro (TONIAZZO, 2005).

#### **3.3.5.2 Identificação dos produtos da biotransformação**

Para identificação dos produtos da reação foram realizadas análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Shimadzu QP5050 A), usando uma coluna capilar DB-WAX (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm). A temperatura da coluna foi programada a 50°C por 3 minutos, aumentando 5°C/minuto a 130°C e depois 15°C/minuto a 210°C por 5 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste e as temperaturas do injetor e detector foram de 250°C. Foram injetados 0,5 µL no sistema GC/MS. Este dispositivo operou com uma taxa de fluxo de 1mL/minuto com um impacto eletrônico de 70eV e no modo split (razão split 1:3). A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas com aqueles da biblioteca Wiley e por comparação adicional dos tempos de retenção do GC de compostos padrões (TONIAZZO, 2005).

### 3.3.5.3 Quantificação dos produtos da biotransformação

As análises quantitativas foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás (GC Shimadzu 2010) com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). Foi usada uma coluna polar capilar (RTx-WaxRestec, 833551, 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) utilizando as mesmas condições experimentais descritas no item anterior. Os componentes foram identificados por injeção dos padrões externos comparada aos tempos de retenção. A quantificação foi realizada pela curva padrão da combinação de interesse, enquanto avaliada a área relativa da combinação de interesse e a curva padrão. Os padrões utilizados foram (-)-β-pineno (99%, Fluka) e (+)-α-terpineol (≥ 97%, Fluka) (ROTTAVA, 2010).

### 3.3.6 Avaliação da produção de α-terpineol

Conforme descrito no item 3.3.3 foi realizado a obtenção do inóculo. As células precipitadas foram pesadas conforme definido no DCC (Delineamento Composto Central) e transferidas a um erlenmeyer contendo 30 mL de meio mineral.

A avaliação da produção de α-terpineol foi realizada mediante técnica de planejamento experimental (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Uma matriz de 'Delineamento Composto Central' (DCC) 2<sup>3</sup> foi realizada e as variáveis estudadas estão representadas na tabela 5. Os resultados foram analisados pelo software STATISTICA® 8.0. O nível de significância de 90% (p < 0,1) foi usado. As demais condições são: após crescimento do inóculo em caldo PD por 36 h, reação em Meio Mineral, adição única de 1,5% de (-)-β-pineno diluído em 1,5% de etanol absoluto e 175 rpm por 7 dias.

**Tabela 5** - Variáveis e níveis avaliados no Delineamento Composto Central (DCC) 2<sup>3</sup>.



### 3.3.7 Produção de inóculo utilizando meios de cultivo agroindustriais

Após reativação do micro-organismo, uma alçada da cepa foi inoculada em tubos de centrifuga contendo 20 mL de meio de cultivo conforme apresentado na Tabela 6 e incubados aerobicamente em agitador orbital (120 rpm) a 28°C por um período de 36 horas. Após as 36 horas de crescimento do micro-organismo, o mesmo procedimento para obtenção do inóculo descrito acima foi realizado.

Foram transferidas a um erlenmeyer contendo 30 mL de meio mineral, 5 gramas de células precipitadas, com adição única de 1,5% de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 1,5% de etanol absoluto, 36°C e 175 rpm por 7 dias para realização da reação de biotransformação, condições definidas no experimento 6 maximizado do planejamento experimental.

**Tabela 6** - Composição do meio de cultivo para o micro-organismo 04.05.08.

# Meio de Cultivo

### 3.3.8 Caracterização dos meios de cultivo agroindustriais

Para caracterizar os meios de cultivo agroindustriais brutos (AMM e APA) e glicerol efetuaram-se as seguintes análises físico-químicas:

a) Minerais totais (cinzas) determinados por incineração em mufla (Novus) a 550 °C de acordo com procedimentos descritos por IAL (1985);

b) Macronutrientes (Mg, Ca, Na, K, P) e micronutrientes (Mn, Fe, Zn, Cu.) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS (VarianSpectra AA-55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Mg, K, P, Na, Mn, Zn, Fe, e Cu, como

fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/ acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, K, Na, Cu, Mn, Zn e Fe foram realizados no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrões na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrões.

c) O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995);

d) O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680°C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH. As amostras foram diluídas 100 vezes em água ultrapura (Sistema Mili-Q®, Millipore), antes da leitura no equipamento.

e) Densidade ótica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 448 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Curva de crescimento do micro-organismo 04.05.08

Os fungos são de crescimento rápido e baixo custo de cultivo, o que possibilita uma análise do seu potencial biotecnológico de forma mais rápida, sendo que vários métodos tem sido descrito para aperfeiçoar os meios de cultivo utilizados para este fim (BOCHINI *et al.*, 2000).

O crescimento é definido como o aumento do número, ou da massa microbiana. A taxa de crescimento é a variação no número ou massa por unidade de tempo. O tempo de geração é o intervalo de tempo necessário para que uma célula se duplique. O tempo de geração é variável para os diferentes organismos, podendo ser de 10 a 20 minutos ou até dias, este tempo de geração não corresponde a um parâmetro absoluto, uma vez que é dependente de fatores genéticos e nutricionais, indicando o estado fisiológico da cultura.

Neste estudo foi traçada uma curva de crescimento para determinar o perfil do crescimento do micro-organismo utilizado, para posteriormente definir o início do processo de biotransformação, como pode ser visualizada na Figura 17.

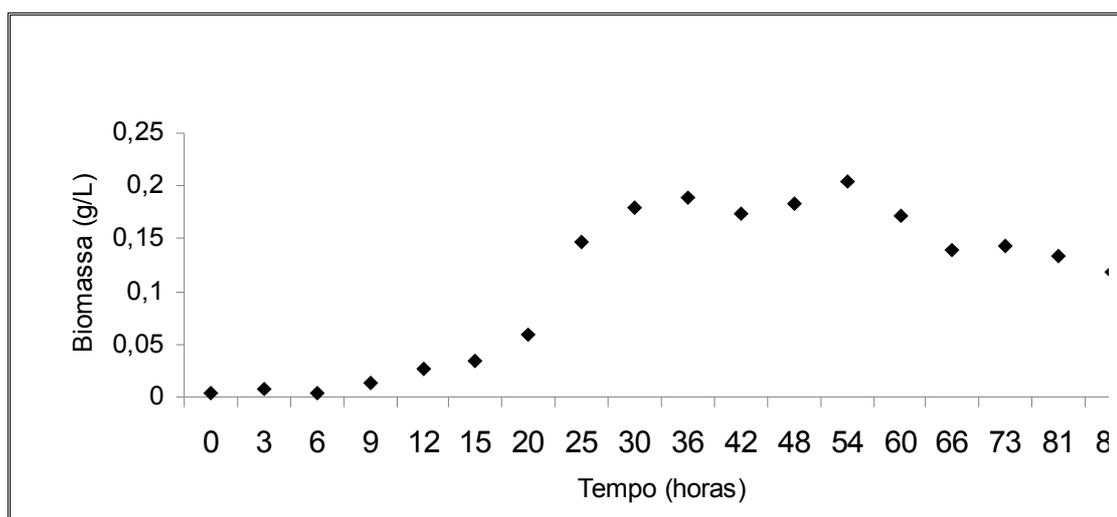


Figura 17 – Curva de crescimento do *Aspergillus sp.* codificado como 04.05.08.

Observa-se que o final da fase exponencial aconteceu após 36 horas de crescimento do micro-organismo, tempo este que será utilizado para início das reações de biotransformação, após preparo do inóculo.

## 4.2 Reações de biotransformação

A Tabela 7 apresenta as concentrações do produto  $\alpha$ -terpineol (mg/L) obtidas nas reações de transformação de (-)- $\beta$ -pineno pelo fungo filamentoso 04.05.08.

**Tabela 7** - Resultados da biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno pelo fungo filamentoso 04.05.08 ( $\alpha$ -terpeniol).

Reação	$\alpha$ -terpineol (mg/L)	Meio de crescimento	Meio Reacional	Forma de adição substrato	Quantidade de substrato adicionado (%)
R01	219,19 $\pm$ 8,89	Caldo PD	Caldo PD	Única	1,5
R02	1670,30 $\pm$ 8,36	Caldo PD	Meio Mineral	Única	1,5
R03	157,10 $\pm$ 1,76	Caldo PD	Caldo PD	Sequencia I	3 x 0,5
R04	627,06 $\pm$ 6,00	Caldo PD	Caldo PD	Sequencia I	3 x 0,5
R05	944,74 $\pm$ 2,22	Caldo PD	Meio Mineral	Sequencia I	3 x 0,5

O  $\alpha$ -terpineol é um importante produto comercial. Pequenas quantidades do terpenóide são encontradas em muitos óleos essenciais (por exemplo, em coníferas e óleos de lavanda); enquanto  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -terpineol não ocorrem largamente na natureza. S-(-)- $\alpha$ -terpineol ocorre na espécie *Pinus palustris* Mill., apresentando-se em concentração menor de 60% em seu óleo essencial. (S)-(-)- $\alpha$ -terpineol possui um odor caracteristicamente conífero enquanto R-(+)- $\alpha$ -terpineol tem aroma floral intenso, com ponto inicial de odor (*threshold*) de 350 ppb. Apesar do  $\alpha$ -terpineol ocorrer em muitos óleos essenciais, apenas pequenas quantidades são isoladas, por exemplo, por destilação fracionada de óleos de pinho. Tem aplicações importantes, como estabilizante, sendo utilizado em sabonetes e cosméticos. Está presente nos óleos essenciais de laranja (grapefruit), bergamota e lima em concentrações variáveis (BAUER *et al.*, 2001; ROTTAVA, 2010). É usado como perfume, repelente

de insetos, antifúngico, desinfetante e agente para flotação de metais (TAN & DAY, 1998A; MARÓSTICA JR. & PASTORE, 2007).

Também é um interessante produto final da bioconversão de limoneno. O  $\alpha$ -terpineol é o álcool terpênico monocíclico comercialmente mais importante.

A biotransformação de  $\beta$ -pineno para  $\alpha$ -terpineol foi escassamente descrita na literatura. Van Dyk *et al.* (1998) usando *Hormonema* sp., obtiveram pinocanfona de (-)- $\beta$ -pineno. Yoo e Day (2002) e Yoo *et al.* (2001), usando *Pseudomonas* sp., obtiveram limoneno,  $p$ -cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, cânfora, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, endo-borneol, e  $p$ -cimeno-8-ol. *Aspergillus niger* ATCC 9642 (TONIAZZO *et al.*, 2005) também foi usado como catalisador para esta biotransformação, e o composto obtido foi  $\alpha$ -terpineol com baixa conversão (até 4 %).

Esse processo tem sido descrito utilizando-se uma grande variedade de micro-organismos como catalisadores. O primeiro relato da obtenção de  $R$ -(+)- $\alpha$ -terpineol por meio da biotransformação de  $R$ -(+)-limoneno foi realizado em 1969. A transformação foi catalisada por uma linhagem de *Cladosporium* sp. (KRAIDMAN *et al.*, 1969). Desde 1985, vários autores têm relatado o relevante potencial de linhagens de *Penicillium* sp. ao converter  $R$ -(+)-limoneno em  $R$ -(+)- $\alpha$ -terpineol (ABRAHAM *et al.*, 1985; TAN *et al.*, 1998; TAN & DAY, 1998a; TAN & DAY, 1998b; DEMYTTENAERE *et al.*, 2001; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Rottava (2010) mostrou que a partir dos 110 fungos filamentosos pré-selecionados em seu trabalho, seis biotransformaram o substrato  $\beta$ -pineno para  $\alpha$ -terpineol. Acredita-se que este fato pode ser explicado pela grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas no crescimento da célula, fazendo os micro-organismos capazes de degradar uma variedade de moléculas orgânicas complexas (DE CONTI *et al.*, 2001). Os resultados obtidos ao usar (-)- $\beta$ -pineno como substrato e *Aspergillus* sp. (04.05.08), foi a mais alta produção de  $\alpha$ -terpineol que foi obtida após 7 dias de reação. A esta condição experimental, uma concentração de produto de 726 e 707 mg/L, para células induzidas e não-induzidas, respectivamente, foi observado. Neste estudo foi verificado que, a indução de célula parece não favorecer a formação de produto.

A maior produção obtida foi na reação R02 com 1670,30 mg/L, sendo que nesta condição, após 36 horas de crescimento das células em caldo PD, houve

centrifugação das células e transferência para meio mineral para a realização da reação, e ainda, adição única de substrato.

A literatura mostra que um problema comum em biotransformação de monoterpenos é a toxicidade destas combinações para os micro-organismos (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 1998). Rottava (2005) realizou a adição do substrato antes do crescimento microbiano, este apresentou um efeito prejudicial para o micélio de *A. Níger* ATCC 16404, confirmando a toxicidade dos monoterpenos para os microrganismos. À adição do substrato após a fase de crescimento exponencial, como no experimento R02 teve um efeito positivo na produção de  $\alpha$ -terpineol, mostrando que não houve efeito da toxicidade.

Na reação R05 houve a segunda maior transformação de  $(-)\beta$ -pineno a  $\alpha$ -terpineol com 944,74 mg/L, nesta reação, após 36 horas de crescimento as células foram transferidas para meio mineral e realizadas três adições sequenciais de 0,5 % (v/v) de  $(-)\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto.

A adição sequencial do substrato, estudado por Toniazzo (2005) apresenta resultado positivo sobre a biotransformação de  $(-)\beta$ -pineno a  $\alpha$ -terpineol com *A. niger* ATCC 9642, obtiveram mais alta produção adicionando o substrato em cinco passos sem indução de célula e usando etanol como co-solvente.

Pode-se observar um outro produto obtido nas reações realizadas, este produto já foi relatado anteriormente (LINDEMARK-HENRIKMAN *et al.*, 2004), houve a produção do mirtenol, produto da oxidação de pinenos, que preserva a estrutura bicíclica.

Na Tabela 8 observa-se que outro produto obtido na biotransformação do substrato  $(-)\beta$ -pineno pelo micro-organismo codificado como 04.05.08 foi o mirtenol. As maiores conversões para o produto mirtenol foram na condição da reação R04, 48,45%. Nas reações R03, R04 e R05 o substrato foi adicionado de forma sequencial, ou seja, três adições de 0,5% (v/v) de  $(-)\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto, com um total de 1,5% (v/v) de  $(-)\beta$ -pineno diluído e 1,5% (v/v) de etanol absoluto e foram alcançadas as maiores conversões de  $(-)\beta$ -pineno a mirtenol.

**Tabela 8** - Resultados da biotransformação de (-)- $\beta$ -pineno pelo fungo filamentososo 04.05.08 (Mirtenol).

Reação	Mirtenol (%) <sup>*</sup>	Meio de crescimento	Meio Reacional	Forma de adição substrato	Quantidade de substrato adicionado (%)
R01	4,35	Caldo PD	Caldo PD	Única	1,5
R02	4,46	Caldo PD	Meio Mineral	Única	1,5
R03	38,57	Caldo PD	Caldo PD	Sequencia I	3 x 0,5
R04	48,45	Caldo PD	Caldo PD	Sequencia I	3 x 0,5
R05	36,08	Caldo PD	Meio Mineral	Sequencia I	3 x 0,5

(\*) A conversão foi obtida em relação às áreas dos picos normalizados, pela falta de padrão.

A biotransformação de  $\beta$ -pineno foi realizada por basidiomicetos, conforme relatado por Busmann e Berger (1994), produzindo como produto minoritário o mirtenol. Mais recentemente, Lindmark-Henriksson (2003) relatou algumas rotas metabólicas para sua biotransformação, onde obteve também o mirtenol como produto. Na literatura não existe estudos específicos para a produção deste composto, não dando condições de comparação dos experimentos realizados.

Nas reações R03, R04 e R05 realizadas neste trabalho foram obtidas as maiores conversões do produto mirtenol, o substrato foi adicionado de forma sequencial. Entretanto, nas reações R01 e R02, as conversões para o produto mirtenol foram comparativamente baixas, sendo que o substrato teve uma única adição.

### 4.3 Maximização da produção de $\alpha$ -terpineol

Na Tabela 9 é apresentada a matriz do DCCR 2<sup>3</sup> e respectivas respostas em termos de produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno como substrato. Foram avaliados os efeitos das variáveis temperatura, pH e massa de inóculo. Nestes experimentos foram mantidas constantes a concentração de substrato (1,5%), a razão entre substrato e volume de etanol (1:1), a agitação (175 rpm) e o tempo de reação (7

dias), foram mantidas as condições do experimento R02, como melhor condição de produção de  $\alpha$ -terpineol. Pode-se observar na tabela que, usando *Aspergillus* sp. 04.05.08, concentração de cerca de 1600 mg/L de  $\alpha$ -terpineol foi alcançada no experimento 6 do planejamento experimental correspondendo a uma temperatura de 36°C, massa de inóculo de 5g e pH do meio reacional de 4,5.

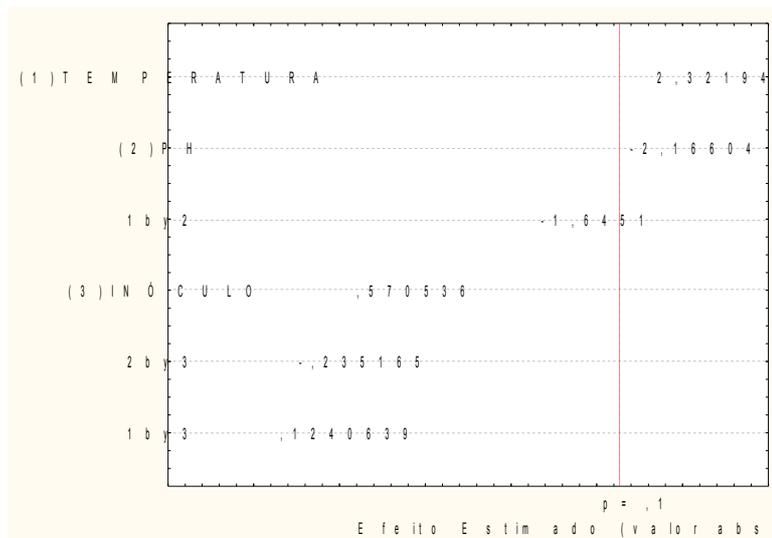
**Tabela 9** - Matriz experimental do DCC 23 (valores reais e codificados) para produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno como substrato.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Inóculo (g)	$\alpha$ -terpineol (mg/L)
1	20 (-1)	4,5 (-1)	1 (-1)	358,60
2	36 (+1)	4,5 (-1)	1 (-1)	1220,81
3	20 (-1)	7,5 (+1)	1 (-1)	161,88
4	36 (+1)	7,5 (+1)	1 (-1)	427,08
5	20 (-1)	4,5 (-1)	5 (+1)	410,00
6	36 (+1)	4,5 (-1)	5 (+1)	1582,70
7	20 (-1)	7,5 (+1)	5 (+1)	339,50
8	36 (+1)	7,5 (+1)	5 (+1)	421,46
9	28 (0)	6,0 (0)	3 (0)	157,46
10	28 (0)	6,0 (0)	3 (0)	112,31
11	28 (0)	6,0 (0)	3 (0)	147,56

Rottava *et al.*, (2011), mostraram que a estratégia adotada para o projeto experimental provou ser útil na avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a conversão do produto. Conversão de cerca de 770 mg / L foi obtida quando (-)- $\beta$ -pineno foi usado como substrato e as linhagens codificadas como 04.05.08 e 01.04.03 como micro-organismos no ponto central do delineamento experimental, correspondendo a uma concentração de substrato de 1,75%, em massa de inóculo de 2 g e substrato à relação de volume de etanol de 1:1.

Os efeitos referentes à temperatura, pH e massa do inóculo na produção de  $\alpha$ -terpineol utilizando como substrato (-)- $\beta$ -pineno são apresentados na Figura 18. O diagrama de Pareto apresenta o efeito de cada variável independente na produção de  $\alpha$ -terpineol, em um nível de confiança de 90%.

De acordo com a Figura 18, podemos observar que a temperatura apresentou efeito significativamente positivo e o pH efeito significativamente negativo ( $p < 0,1$ ) na produção de  $\alpha$ -terpineol com (-)- $\beta$ -pineno nas reações de biotransformação com fungo filamentosos *Aspergillus* sp. 04.05.08.



**Figura 18** - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no DCC 2<sup>3</sup> para a produção de α-terpineol

Visando avaliar o efeito da temperatura na biotransformação do (-)-β-pineno, foram feitos novos experimentos, onde a massa do inóculo foi mantida no nível superior da matriz de planejamento experimental e o pH no nível inferior, pois os efeitos de ambas as variáveis não foram estatisticamente significativos e aumentou-se a temperatura de incubação. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Dentro da faixa avaliada, a temperatura de 36°C conduziu a maior conversão a α-terpineol.

**Tabela 10** - Avaliação da temperatura para produção de α-terpineol usando (-)-β-pineno e o micro-organismo 04.05.08.



\*Média e desvio padrão das triplicatas. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

# Experimento

Na Tabela 11 é apresentado um estudo com diferentes pH, uma vez que este também mostrou-se significativo (Figura 18). As demais variáveis também foram mantidas constantes, como no experimento anterior.

**Tabela 11** - Avaliação do pH para produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Inóculo (g)	$\alpha$ -terpineol (mg/L)
1	36	7,5	5	421,63 <sup>b</sup> ± 115,23
2	36	4,5	5	1582,70 <sup>a</sup> ± 4,52
3	36	3,5	5	1577,03 <sup>a</sup> ± 147,21

Os resultados confirmam o efeito negativo do aumento do pH na bioconversão de (-)- $\beta$ -pineno a  $\alpha$ -terpineol, entretanto, a redução do pH para 3,5 não resultou em aumento da bioconversão, considerando-se o pH de 4,5 como maximizado.

#### 4.4 Avaliação da produção de $\alpha$ -terpineol utilizando meios de cultivo agroindustriais para produção do inóculo

As condições das reações de biotransformação para a avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol utilizando meios de cultivo agroindustriais água de maceração de milho (AMM), água de parboilização de arroz (APA) e glicerol, para a produção do inóculo, foram determinadas no planejamento experimental completo 2<sup>3</sup> (experimento 6), sendo a melhor produção de 1582,70 mg/L.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados da caracterização dos meios de cultivo utilizados nesta etapa da pesquisa.

De acordo com a análise da composição dos meios de cultivo, os mesmos apresentam diferenças consideráveis quanto aos teores de carbono orgânico total e nitrogênio total, sendo que o glicerol apresentou maior concentração de carbono e a AMM de nitrogênio.

**Tabela 12** - Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (N<sub>2</sub>) dos meios de cultivo agroindustriais sem pré-tratamento (RIBEIRO, 2011).

Substratos agroindustriais	D.O	Carbono (mg/L)	N <sub>2</sub> (mg/L)
<b>AMM</b>	0,238 ± 0,00015	21648,20 ± 115,00	4371,29 ± 42,79
<b>APA</b>	0,125 ± 0,0002	743,2 ± 68,50	124,85 ± 0,919
<b>Glicerol</b>	0,0087 ± 0,00015	434669,0 ± 500,00	261,41 ± 21,98

Os resultados dos minerais (micro e macro nutrientes) dos meios de cultivo encontram-se descritos na Tabela 13.

**Tabela 13** - Componentes minerais dos meios de cultivo agroindustriais sem pré-tratamento (RIBEIRO, 2011).

Minerais	Meios de cultivo agroindustriais		
	AMM	Glicerol	APA
<b>Al (mg/L)</b>	2770,50 ± 142,95	0,00 ± 0,00	1345,23 ± 31,37
<b>Ca (mg/L)</b>	316,52 ± 45,44	255,74 ± 8,74	452,38 ± 8,71
<b>Cu (mg/L)</b>	1,52 ± 0,162	0,864 ± 0,006	1,13 ± 0,057
<b>Mg (mg/L)</b>	739,18 ± 3,02	33,38 ± 0,91	211,83 ± 4,86
<b>Mn (mg/L)</b>	5,73 ± 0,02	0,733 ± 0,007	40,01 ± 0,84
<b>Zn (mg/L)</b>	20,39 ± 0,14	6,76 ± 0,23	12,58 ± 0,239
<b>Na (mg/L)</b>	2849,10 ± 40,43	210,14 ± 5,72	372,81 ± 11,32
<b>Fe (mg/L)</b>	13,96 ± 0,27	2,3 ± 0,05	8,28 ± 0,208

Na Tabela 14 é apresentada a avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de AMM (água de maceração de milho) e glicerol para cultivo do inóculo.

Maróstica Jr. *et al.* (2007) estudaram a biotransformação de óleo de turpentina, contendo aproximadamente 16% de  $\beta$ -pineno. Foram isoladas mais de 40 cepas de fungos e selecionadas para biotransformação de substratos de resíduos. A concentração de  $\alpha$ -terpineol após 72 horas da primeira adição de óleo de turpentina foi de 12,9, e 6,9mg/L, produzido por *Penicillium* sp. 2319 e *Penicillium* sp. 2327, respectivamente.

**Tabela 14** - Avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de AMM e glicerol para cultivo do inóculo.

---

\*Média e desvio padrão das triplicatas. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 15 é apresentada a avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de APA (água de parbolização de arroz) e glicerol para cultivo do inóculo.

**AMM (g/L)**

**Tabela 15** - Avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol usando (-)- $\beta$ -pineno e o micro-organismo 04.05.08, com utilização de APA e glicerol para cultivo do inóculo.

---

**40**

\*Média e desvio padrão das triplicatas. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 14 observa-se que, utilizando 40g/L de AMM e 40g/L de glicerol para produção do inóculo, as concentrações de  $\alpha$ -terpineol são similares às obtidas utilizando meio sintético para produção do inóculo, portanto pode-se utilizar como alternativa de aproveitamento de resíduos agroindustriais. Já os resultados usando APA apresentaram concentrações baixas se comparados aos usando AMM, conforme apresentado na Tabela 15.

**APA (g/L)**

Maróstica Jr e Pastore (2007) investigaram os micro-organismos *Penicillium* sp. 2025, *Aspergillus* sp. 2038, e *Fusarium oxysporum* 152B para a biotransformação de R-(+)-limoneno usando dois resíduos agroindustriais (água residual do processamento da farinha de mandioca e óleo essencial de laranja). O melhor

**40**

rendimento de *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol foi alcançado quando as cepas foram crescidas em meio de resíduo da água do processamento de farinha mandioca e o micélio transferido então para outro frasco que continha meio mineral e óleo essencial de laranja como fonte de carbono e de energia exclusiva. Uma das cepas testadas, *F. oxysporum* 152B, converteu *R*-(+)-limoneno para *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol, rendendo quase 450 mg/L depois de 3 dias de reação.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudada a utilização de Meio Mineral e caldo PD para reações de biotransformação de  $\beta$ -pineno com o fungo filamentoso, *Aspergillus* sp. 04.05.08. Foram empregadas cinco condições experimentais diferentes para a adição do substrato e o meio reacional utilizado, sendo estas identificadas por R01, R02, R03, R04, R05.

A maior concentração do produto  $\alpha$ -terpineol foi obtida na reação R02 com 1670mg/L, sendo a condição de após 36 horas de crescimento do micro-organismo em caldo PD, foi realizada a centrifugação das células, e após estas transferidas para outro frasco com meio mineral e realizada adição única de 1,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 1,5% (v/v) de etanol absoluto, este resultado foi seguido pela obtida na reação R05, 944mg/L, sendo que após 36 horas de crescimento do micro-organismo em caldo PD, foi realizada centrifugação das células, e após transferidas para outro frasco com meio mineral. Nesta reação foram realizadas três adições de 0,5% (v/v) de (-)- $\beta$ -pineno diluído em 0,5% (v/v) de etanol absoluto, após 24, 48 e 72 horas de reação. Ambas as reações foram realizadas em meio mineral, após crescimento das células (04.05.08) em caldo PD.

Foram avaliados os efeitos das variáveis temperatura, pH e massa de inóculo. Nestes experimentos foram mantidas constantes a concentração de substrato (1,5%), a razão entre substrato e volume de etanol (1:1), a agitação (175rpm) e o tempo de reação (7 dias). Pode-se observar que usando *Aspergillus* sp. 04.05.08 foi alcançada uma concentração de cerca de 1600 mg/L de  $\alpha$ -terpineol no experimento 6 do planejamento experimental correspondendo a uma temperatura de 36°C, massa de inóculo de 5g e pH do meio reacional de 4,5. A temperatura apresentou efeito significativamente positivo e o pH efeito significativamente negativo ( $p < 0,1$ ) na produção de  $\alpha$ -terpineol com (-)- $\beta$ -pineno nas reações de biotransformação com fungo filamentoso *Aspergillus* sp. 04.05.08.

No estudo com diferentes temperaturas e demais variáveis constantes, dentro da faixa avaliada, a temperatura de 36°C conduziu a maior conversão a  $\alpha$ -terpineol.

No estudo com diferentes pH e demais variáveis constantes, dentro da faixa avaliada, o pH 4,5 e 3,5 produziram concentrações estatisticamente iguais de  $\alpha$ -terpineol. Já com o pH 7,5 houve um decréscimo na produção, provavelmente por este não ser uma faixa de pH ideal para o crescimento de fungos filamentosos.

Foi realizada uma avaliação da produção de  $\alpha$ -terpineol utilizando meios de cultivo agroindustriais água de maceração de milho (AMM), água de parboilização de arroz (APA) e glicerol para a produção do inóculo e os resultados foram:

- De acordo com a análise da composição dos meios de cultivo, os mesmos apresentam diferenças consideráveis quanto aos teores de carbono orgânico total e nitrogênio total, sendo que o glicerol apresentou  $434669,0 \pm 500,00$  mg/L, maior concentração de carbono e a AMM apresentou  $4371,29 \pm 42,79$  mg/L maior concentração de nitrogênio.

- Observou-se que o água de maceração de milho apresenta concentrações consideráveis de alumínio (2770 mg/L), cálcio (316 mg/L), magnésio (739 mg/L), zinco (20 mg/L) e sódio (2849 mg/L); a água de parbolização de arroz apresenta concentrações consideráveis de alumínio (1345 mg/L), cálcio (452 mg/L), manganês (40 mg/L) e sódio (372 mg/L). Para o glicerol foram observados valores consideráveis de cálcio (255 mg/L), sódio (210 mg/L) e magnésio (33 mg/L).

- Também observou-se que, utilizando 40g/L de AMM e 40g/L de glicerol para produção do inóculo, as concentrações de  $\alpha$ -terpineol são similares às obtidas utilizando meio sintético para produção do inóculo, a produção foi de  $1502,35 \pm 126,56$  mg/L, portanto pode ser utilizado como alternativa de aproveitamento de resíduos agroindustriais. Já os resultados usando APA apresentaram concentrações baixas como  $508,88 \pm 30,74$  mg/L, não apresentando-se como alternativa.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Conhecer mais sobre o fungo filamentoso utilizado no processo de biotransformação, realizando identificação taxonômica;
- Utilizar diferentes concentrações de potássio (K) no meio como nutriente e verificar se ocorre maior ativação enzimática em todas as fases;
- Estudar a rota da biossíntese do  $\beta$ -pineno a  $\alpha$ -terpeniol utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus* sp. 04.05.08;
- Utilizar a batelada alimentada como forma de prover o substrato ao meio de cultivo em concentrações baixas, reduzindo o efeito da toxicidade e permitindo a aclimação do micro-organismo;
- Submeter as células imobilizadas a altas pressões para verificar o comportamento do micro-organismo e realizar reações com este imobilizado, em meio supercrítico;
- Estudar outros micro-organismos capazes de efetuar a biotransformação desejada utilizando como meio de cultivo o resíduo agro-industrial (AMM);
- Estudar outros meios de cultivo denominados como resíduo agro-industrial, buscando alternativas baratas para a biotransformação;
- Buscar novos substratos para a realização das bioconversões em resíduos agroindustriais como, por exemplo, o óleo de terebentina que apresenta uma grande quantidade de  $\beta$ -pineno em sua composição.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R.; HOFFMAN, H. M. R.; KIESLICH, K.; RENG, H.; STUMPF, B. *Microbial transformation of some monoterpenoids and sesquiterpenoids*. **Ciba Found Symposium**, v. 111, p. 146-160, 1985.
- AGER, D. J. **Handbook of Chiral Chemicals**. Marcel Dekker, New York, 1999.
- AGRAWAL, R.; JOSEPH, R. *Bioconversion of alpha-pinene to verbenone by resting cells of Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 335-337, 2000.
- AGRAWAL, S. C.; BASU, S. K.; VORA, V. C.; MASON, J. R.; PIRT, S. J. *Studies on production of L-acetylphenylcarbinol by yeast employing benzaldehyde as a precursor*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 183-185, 1987.
- ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a indústria. **Química Nova**, v. 28, p. S64-S75, 2005.
- AOAC - Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**, 16 ed. Washington, 1995.
- BANTHORPE, D. V. *Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations*. **Natural Product Reports**, pp 303-328, 1994.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. *Common Fragrance and Flavors Materials: Preparation and Uses*. **Fourth, Completely Revised Edition**. Wiley-VCH Verlag GmbH, p. 48-74, 2001.
- BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. *Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of Lactobacillus rhamnosus RW-9595M*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 272-284, 2005.
- BICAS J. L.; FONTANILLE P.; PASTORE, G. M.; LARROCHE C. *A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)- $\alpha$ -terpineol from R-(+)-limonene*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 481-486, 2010.
- BICAS, J. L.; QUADROS, C.P.; NÉRI-NUMA, I.A.; PASTORE, M.G.; *Integrated process for co-production of alkaline lipase and R-(+)- $\alpha$ -terpineol by Fusarium oxysporum*. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 452-456, 2010.
- BICAS, J. L.; Estudos de obtenção de bioaromas pela biotransformação de compostos terpênicos**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas: 2009.
- BLUEMKE, W.; SCHRADERB, J. *Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by Ceratocystis moniliformis*. **Biomolecular Engineering**, v. 17, n. 4-5, p. 137-142, 2001.
- BOYD, D. R. *Aromatics dioxygenases: molecularbiocatalysis and applications*. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.12, p. 564-573, 2001.
- BRUNERIE, P.; BENDA, I.; BOCK, G.; SCHREIER, P. *Bioconversion of citronellol by Botrytis cinerea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 6-10, 1987.
- BURTON, S.G. *Oxidizing enzymes as biocatalysts*. **Trends in biotechnology**, v.21, p. 543-549, 2003.

- CADWALLADER K. R.; BRADDOCK R. J. *Enzymatic hydration of (4R)-(+)-limonene to (4R)-(+)- $\alpha$ -terpineol*. **Developments in Food Science**, v. 29, p. 571-584, 1992.
- CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 541-546, 2001.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. *Methods of cell immobilization*. In : DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 217-229, 1986.
- CIRINO, P. C.; ARNOLD, F.H. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 130-135, 2002.
- COLLINS, R. P.; HALIM, A. F. *Essential oil composition of Ceratocystis virescens*. **Mycologia**, v. 69, n. 6, p. 1129-1136, 1977.
- CROTEAU, R. *Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids*. **Chemical Review**, v. 87, p. 929-954, 1987.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. *Biotransformation of terpenes*. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 134-142, 2006.
- DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, p. 672-675, 2001.
- DEMYTTENAERE, J. C. R.; VAN BELLEGHEM, K.; DE KIMPE N. *Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 199-208, 2001.
- DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. *Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved*. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 11, p. 265-570, 2001.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons, 3 ed., Cap. 5: The Mevalonate Pathway: Terpenoids and Steroids, 1997.
- DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K.; GAIKAR, V. G. *Biotransformations and Bioprocesses*. **CRC Press**, USA, 2004.
- DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. *Amelioration of ligninolytic enzyme production by Phanerochaete chrysosporium in airlift bioreactors*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 6, p. 451-455, 2001.
- DRUAUX, D.; MANGEOT, G. ENDRIZZI, A. and BELIN, J. M., *Bacterial bioconversion of primary aliphatic and aromatic alcohols into acids: effects of molecular structure and physico-chemical conditions*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.6, p. 214 – 216, 1987.
- DUDAREVA, N., ANDERSSON, S., ORLOVA, I., GATTO, N., REICHEL, M., RHODES, D., BOLAND, W., and GERSHENZON, J. *The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **102**: 933-938, 2005.
- DUETZ, W. A.; VAN BEILEN, J. B.; WITHOLT, B. *Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis*. **Current Opinion Biotechnology**, v. 12, p. 419-425, 2001.

FABER, K. Biocatalytic Applications. In: ***Biotransformations in Organic Chemistry***. Springer-Verlag, 2<sup>a</sup> ed., Berlin, p. 145-175, 1995.

FAUCONNIER, M. L.; MPAMBARA, A.; DELCARTE, J.; JACQUES, P.; THONART, P. AND MARLIER, M. Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. ***Biotechnology Letters***, v. 21, p. 629-633, 1999.

FAROOQ. A.; TAHARA, S.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMANM ATTA-UR; AHMED, Z.; BASER, K. H. C. and DEMIRCI, F., *Biotransformation of (-)- $\alpha$ -pinene by Botrytis cinerea*. ***Verlag der Zeitschrift für Naturforschung***, p. 303 – 306, 2002.

**GERALDES, D.M.A.; Biotransformação de monoterpenos por raízes transgênicas de *Anethum graveolens***. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, 2010.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI. C. C.; SING, A.; WARD, O. P. AND NARASU, M. L. *Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current Trends and Future Prospects*. ***Biotechnology Advances***, v. 19, 175-199, 2001.

GUO, X-L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M-X. *Immobilization of Rhodococcus sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide*. ***Enzyme and Microbial Technology***, New York, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

HAGEDORN, S.; KAPHAMMER, B. *Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemical*. ***Annual Review of Microbiology***, v. 48, p. 773-800, 1994.

HANSON, J.R. ***An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry***. Oxford University Press, USA, 1998.

HARBORNE, J.B. ***Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis***. London: Chapman and Hall, 1989.

HEATH, C. M.; IMRIE, R. C.; JONES, J. J.; REES, M. J.; ROBINS, K. G.; VERRALL, M. S. *Whole cell biotransformation of 5-(4-(2-(2-pyridyl)methylamino) ethoxy) benzylidenethiazolidine- 2, 4-dione to its benzyl derivative using a yeast reductase*. ***Journal of Chemistry. Biotechnology***, v. 68, p. 324-330, 1997.

HUBBALL, J. A.; COLLINDS, R. P. A study of factor affecting the synthesis of terpenes by ceratocystis variospora. ***Mycologia***, v. 70, n. 1, p. 117-29, 1978.

IAL - **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, 1985.

IKAN, R. *Natural Products, A Laboratory Guide*. ***Academic Press***, INC, Cap. 3: Isoprenoides, 105-225, 1991.

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.

KATO, K.; GONG, Y. F.; TANAKA, S.; KATAYAMA, M.; KIMOTO, H. *Optimal resolution of 2-(3-indolyl)propionic acid with *Mucor javanicus* and  $\alpha$ -chymotrypsin*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 457- 461, 1999.

KING, A.J.; DICKINSON, J.R. *Biotransformation of aroma terpenóides by ale and larger yeasts*. **FEMS Yeast Research**, v.3, p. 53-62, 2003.

KODAMA, N.; MURAKAMI, S.; SHINKE, R.; AOKI, K. *Production of catechol by transpositional mutants of aniline – assimilating *Pseudomonas* species AW-2*. **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 480-483, 1996.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. *Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review*, **Food Microbiology**, v. 21, p. 377–397, 2004.

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

LANZA, E.; KO, K. H.; PALMER, J. K. *Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis**. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1247-1250, 1976.

LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H.M.; CABRAL, J.M.S. *Whole-cell biocatalysis in organic media*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n. 7-8, p. 483-500, 1998.

LEUENBERGER, H. G. W. Methodology. In: REHM, H. J.; REED, E. G. *Biotechnology Biotransformations*. **Weinheim: Verlag Chemie**, v. 6a, p. 5-29, 1984.

LILLY, M. D.; WOODLEY, J. M. *A structured approach to design and operation of biotransformation process*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 24-29, 1996.

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

MAKKAR, R.S; CAMEOTRA, S.S. *An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58: 428-434, 2002.

MANN, J. *Chemical Aspects of Biosynthesis*. New York: **Oxford Science**, 1994.

MAROSTICA JR, M. R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais** / Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.

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

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

MATTISON, J. E.; MCDOWELL, L. L.; BAUM, R. H. *Cometabolism of selected monoterpenoids by fungi associated with monoterpene containing plants*. **Bacteriological Proceedings**, v. 1971, p. 141-145, 1971.

MEDEIROS, S.F. **Biotransformação de derivados de artemisinina com ação antimalárica por *Mucor ramannianus***. 2002. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

MOLINA, F. E. C. **Biotransformación de limoneno,  $\alpha$ -pineno y Aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger***. Trabajo de Investigación y Tesis de Maestría en Química. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 2007.

MURAHASHI, S. I.; KOMIYA, N. *New types catalytic oxidations in organic synthesis*. **Catalysis Today**, v. 41, p. 339-349, 1998.

ONKEN, J.; BERGER, R. G. *Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in a aerated-membrane bioreactor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 158-163, 1999b.

ORZUA, M. C.; MUSSATTO, S. I.; CONTRERAS-EAQUIVEL, J.C; RODRIGUEZ; R.; GARZA, H.; TEIXEIRA, J.A.; AGUILAR, C.N.; *Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation*. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 24-27, 2009.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J.; *Terpenes: substances useful in human healthcare*. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis** 55, 1-13, 2007.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H. ; MORAES, I. O. . *Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução de impacto ambiental*. **Journal Of Technology Management And Innovation JCR**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, R. S. *The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and others compounds*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 25-83, 1998b.

PEREIRA, R. S. *The use of modeling on the understanding of conFigurationally specificity (R or S) in asymmetric reactions catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* or isolated dehydrogenases*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 178, p. 27-31, 1998a.

PETERSEN, R. Z.; **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J.M. *Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now*. **Trends Biotechnology**, v. 25, p. 66-73, 2006.

RABENHORST, R. *Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformations of eugenol with a new *Pseudomonas* sp.* **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 46, p. 470-474, 1996.

RIBEIRO, A. H. R. **Bioprodução de carotenoides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus* utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – URI, Campus Erechim, RS, 2011.

ROBERTSON, D. E.; STEER, B. A. 2004. *Recent progress in biocatalyst discovery and optimization*. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 141-149, 2004.

RODRIGUES M. I.; IEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª. Ed. Editora Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor. Campinas, SP, Brasil, 2009.

ROSENBAUM, H. F., **Produção de aromas e fragrâncias terpênicas por biotransformação**. Tese de Mestrado. Escola de Química. UFRJ. 146 fl, 2000.

ROTTAVA I., **Seleção de micro-organismos e otimização da biotransformação de monoterpenos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

ROURE, F.; DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. *Enantioselective esterification of racemic ibuprofen in solvent media under reduced pressure*. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 69, p. 266-270, 1997.

SCHANTZ, M. *Sonderabdruck aus der farmaseuttinen Aikakauslehti*. **Farmaceutiski Notisblad**. v 76, p. 265-286, 1967.

SCHLITING, I.; BERENDZEN, J.; STOCK, A. M.; MAVES, S. A.; BENSON, D. E.; SWEET, R. M.; RINGE, D.; PETSKO, G. A.; SLIGAR, S. G. *The Catalytic Pathway of Cytochrome P-450cam at Atomic Resolution*. **Science**, v. 287, p. 1615-1622, 2000.

SCHRADER, J., BERGER, R.G. *Biotechnological production of terpeoid flavor and fragrance compounds*. In: REHM, H.-J., REED, G., PÜHLER, A., STADLER, P. (Eds.), **Biotechnology**, vol. 10, Chapter 13. Wiley-VCH, Weinheim, p. 373–422, 2001.

SCHRADER, J.; BERGER, R. G. *Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and fragrance compounds*. In: REHM, H. J., REED, G. (2<sup>nd</sup> Ed), **Biotechnology**. Weinheim: Wiley-VHC, Chap. 3, p. 384-388, 2001.

SCHULZE, B.; WUBBOLTS, M. G., *Biocatalysis for industrial production of fine chemicals*. **Current Opinion Biotechnology**, v. 10, p. 609-615, 1999.

SEDARATI, M. R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY, A. A.; EVANS, C. S. *Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 104-114, 2003.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: Fundamentals and Applications**, Academic Press, London (1981).

SOUTO-BACHILLER, F.A; JESUS-ECHEVARRIA, M.; CÁRDENAZ-GONZÁLEZ, O.E.; ACUÑA-RODRIGUES, M.F; MELENDEZ, P.A; RONERO-RANSEY, L., *Terpenoid composition of *Lippia dulcis**. **Phytochemistry**, v.44, p.1077, 1997.

TAKAHASHI, J. A.; BARROSO, H. A.; OLIVEIRA, A. B. *Optimization of diterpenes bioconversion process by the fungus *Cephalosporium aphidicola**. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 83-86, 2000.

TAN, Q.; DAY, D. F. *Bioconversion of limonene to  $\alpha$ -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 96-101, 1998a.

TAN, Q.; DAY, D. F. *Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- $\alpha$ -terpineol*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 755-761, 1998b.

TAN, Q.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 29-37, 1998.

TONIAZZO, G. **Seleção de micro-organismos para oxidação de monoterpenos**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

TONIAZZO, G.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; PADILHA, F. F.; ANTUNES, O. A. C. *Microorganism Screening for Limonene Bioconversion and Correlation with RAPD Markers*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 132, p. 1023–1033, 2006.

TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C. Biotransformation of (-) $\beta$ -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 123, p. 837–844, 2005.

TYLER, V.E.; ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K. **Pharmacognosy and Pharmacobotechnology**. Willians e Wilkins, 1996.

URLACHER, V. B.; SCHMID, R. D. *Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations*. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 1-6, 2006.

VAN DER WERF, M. J.; de BONT, J. A. M.; LEAK, D. J. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. In T. Scheper (Ed.), **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 55. Springer-Verlag; Berlin: p. 147-176, 1997.

VAN DYK M. S.; VAN RESBURG E.; MOLELEKI N. *Hydroxylation of (+)limonene, (-) $\alpha$ -pinene and (-) $\beta$ -pinene by *Hormonema sp.** **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 431-436, 1998.

VAN KEULEN, F.; CORREIA, C.N; DA FONSECA, M.M.R. *Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida**. **Journal of molecular CatalysisB: Enzymatic**, v.5, p. 295-299, 1998.

VANEK, T.; VALTEROVÁ, I.; VAISAR, T. *Biotransformation of (S)-(-)- and (R)(+)-limonene using *Solanum aviculare* and *Discrea deltoidea* plant cells*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1347-1351, 1999.

Velankar, H. R.; Heble, M. R. *Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta**. **Electronic Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 90-103, 2003.

VERPOORTE, R., ALFERMANN, A.W (Eds.), *Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plants cell cultures*. **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolites**, New York Academic, p. 253-281, 2000.

VIAZZO, P.; ALPHAND, V.; FURSTOSS, R. *Microbial transformations 34: enantioselective hydrolysis of a key-lactone involved in the synthesis of the antidepressant Milnacipran®*. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 26, p. 4519-4522, 1996.

VILLENEUVE, P. et al. *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry, Second Edition**. New York: John Wiley & Sons, INC. 1359 p., 1995.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E. *Microbiological and Enzymatic Production of Flavour and Fragrance Chemicals. Critical Reviews in Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 105-169, 1989.

WHITTAKER, D. "The Monoterpenes". In ***Chemistry of Terpenes and Terpenoids***, ed. NEWMAN, A. A., ACADEMIC press, Londres, 1972.

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

YOO S. K.; DAY D. F.; CADWALLADER, K. R. *Bioconversion of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene by Pseudomonas sp. strain PIN. Process Biochemistry*, v. 36, p. 925-932, 2001.