



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

# **BIOTRANSFORMAÇÃO DA R- (+) E S-(-) CARVONA POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

BRUNA DE OLIVEIRA

ANAPOLIS  
OUTUBRO - 2009

**BRUNA DE OLIVEIRA**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DA R- (+) E S-(-) CARVONA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares do Programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares, Área de Concentração em Físico-Química, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás.

**Orientador:** Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Martins Didonet

ANAPOLIS  
OUTUBRO - 2009

# **BIOTRANSFORMAÇÃO DA R- (+) E S-(-) CARVONA POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Esta Dissertação foi julgada para a obtenção do título de mestre em Ciências Moleculares, área de concentração em Físico-Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares.

---

Prof. Caridad Noda Perez, Doutora  
Coordenador de Curso

## **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Gilberto Lucio Benedito de Aquino  
(UEG)

---

Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira  
(UFG)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Gracia Martin Didonet  
(UEG)

Anápolis, 5 de Novembro de 2009

*Dedico esse trabalho a aqueles que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la. A minha mãe Vilma e meu pai João.*

***"Algo só é impossível até que alguém  
duvide e acabe provando o contrário."  
(Albert Einstein)***

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, João e Vilma, meu irmão, Renato, e minha avó, Mariana, por tudo que fizeram por mim.

A professora Claudia por toda paciência, sabedoria e pela amizade.

A tia Cleide, tio Bosco, tia Cora e todos os demais familiares, obrigada pelo apoio.

Aos amigos do laboratório de bioquímica por tantas alegrias e dificuldades passadas juntos, Junior, Cesar, Marco Aurélio, Geovani, Celso, Carol, Kellita, e demais.

Os técnicos do laboratório, por toda paciência. Ao Paulo, Valter pelas ajudas no laboratório.

As amigas Déia, Andréia, Flavia, Rosa, Marcela, Graci, Fabrine, Moema, Izabella, Gyzelle, Luiza, por todos os momentos de apoio e por tantos conselhos.

A amiga Déia de novo pelas piadas nos momentos de desespero.

A dona Sueli e o Iron por todos os conselhos.

Aos vizinhos e ex-vizinhos Fabrine, Junior pelos momentos de descontração.

As amigas Marcela, Rosa e Gracielle por estarem ao meu lado torcendo por mim, e me salvando nos momentos de sufoco.

A Maria Fernandes pelos conselhos e ao Rubem pelo apoio.

Ao professor Antonio, Pedro Ferri, Caridad, Edson pela colaboração para melhoramento do trabalho.

A todos os amigos que sempre torceram por mim durante essa caminhada, aos colegas do mestrado que compartilharam além de matérias, grandes momentos juntos.

A todos aqueles que me apoiaram de uma forma ou de outra.

BRUNA OLIVEIRA, **BIOTRANSFORMAÇÃO DA R- (+) E S-(-) CARVONA POR FUNGOS FILAMENTOSOS**, 2009, Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares)- Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, 2009.

## RESUMO

Os estudos da biotransformação têm-se mostrado um método eficiente para reações que envolvam a obtenção de compostos com interesse comercial. Dentre estes produtos utilizados podemos destacar monoterpenos por constituírem uma variedade de compostos com grande aplicação tanto no âmbito farmacêutico, como em perfumes, cosméticos e alimentos. As suspensões de fungos filamentosos tem sido largamente utilizadas em reações de biotransformação terpenos. A habilidade de fungos filamentosos em transformar estes compostos vem sendo direcionados principalmente para obtenção de derivados oxigenados de maior valor agregado, principalmente visando à produção de flavorizantes, aromatizantes e fragrâncias. Esses microorganismos são seres simples e tem crescimento rápido, por isso geralmente promovem rapta metabolização dos substratos. Neste contexto, este trabalho descreve a investigação do potencial dos microorganismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.* Produzir metabolitos através bioconversão dos monoterpenos (R)-(-)-Carvona e (S)-(+)-carvona. Todos os sistemas estudados mostraram habilidade na bioconversão dos substratos testados. Pode se notar que durante a bioconversão dos substratos as reações que ocorreram foram reações de redução, através das enzimas enoato redutase e carbonil redutase. O principal produto para a (R)-(-)-Carvona foi o neo-diidrocarveol e para a (S)-(+)-carvona foram os compostos iso-dihidrocarveol, neo-dihidrocarveol, neoiso-dihidrocarveol, trans-dihidrocarvona.

**Palavras-chave:** Biotransformação, carvona, suspensão de fungos filamentosos.

BRUNA OLIVEIRA, **BIOTRANSFORMAÇÃO DA R- (+) E S-(-) CARVONA POR FUNGOS FILAMENTOSOS**, 2009, Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares)- Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, 2009.

## ABSTRACT

Biotransformation studies have proven an efficient method for reactions involving the procurement of compounds with commercial interests. Among these products used can highlight monoterpenes as providing a variety of compounds with wide application both in the pharmaceutical sector, such as perfumes, cosmetics and foods. The suspensions of filamentous fungi has been widely used in biotransformation reactions of terpenes. The ability of filamentous fungi to transform these compounds has been directed primarily to obtaining oxygenated derivatives of higher added value, primarily for the production of flavors, aromas and fragrances. These microorganisms are simple beings and grows fast, so usually kidnaps promote metabolism of substrates. In this context, this paper describes the investigation of the potential of microorganisms *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, and *Trichoderma* sp. Produce metabolites through bioconversion of monoterpenes (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone. All systems studied showed skill in the bioconversion of substrates. It may be noted that during the bioconversion of substrates the reactions that occurred were reduction reactions by enzyme enoate reductase and carbonyl reductase. The main product for the (R)-(-)-Carvone was the neo-dihidrocarveol and for the (S)-(+)-carvone compounds were iso-dihidrocarveol, neo-dihidrocarveol, neoiso-dihidrocarveol, trans-dihidrocarvona.

**Keywords:** Biotransformation, carvone, suspension of filamentous fungi.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 BIOSSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	3
2.2 TERPENOS .....	4
2.3 MONOTERPENOS .....	8
2.4 CARVONA .....	12
2.5 MICROORGANISMOS .....	16
2.6 BIOTRANSFORMAÇÃO .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1 FUNGOS UTILIZADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO .....	28
4.2 MEIOS DE CULTURA .....	28
4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL .....	29
4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO .....	29
4.4.1 Substrato .....	29
4.4.2 Identificação dos produtos biotransformados .....	31
4.4.2.1 Preparo das amostras .....	31
4.4.2.2 Análise por CCD .....	32
4.4.2.3 Análise por cromatografia gasosa .....	32
4.4.2.4 Identificação dos espectros de massa obtidos por CG-MS. ....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL .....	34

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS BIOTRANSFORMADOS .....	37
5.2.1 <b>Análise por CCD</b> .....	37
5.2.2 <b>Análise por CG-MS</b> .....	37
5.2.2.1 (-)-(R)-carvona.....	37
5.2.2.2 (+)-(S)-carvona.....	41
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	46
6.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	46
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS BIOTRANSFORMADOS .....	46
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	51
<b>ANEXO - ESPECTROS DE MASSA DOS METABOLITOS</b> .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidade isoprênica e isopreno .....	5
Figura 2: Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP e IPP.....	6
Figura 3: Estruturas de alguns terpenóides .....	7
Figura 4: Monoterpenóides alcoóis cíclicos.....	9
Figura 5: Monoterpenóides cetonas .....	10
Figura 6: Monoterpenóides aromáticos .....	9
Figura 7: Formula estrutural da (-)-(R)-Carvona e (+)-(S)-carvona .....	12
Figura 8: <i>Mentha spicata</i> (hortelã) cujo principal constituinte do óleo essencial é a (R)-carvona e a <i>Carum carvi</i> (alcaravia) principal constituinte do óleo essencial é a (S)-carvona .....	13
Figura 9: Síntese da carvona .....	14
Figura 10: Estruturas do fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> vistas através de microscópio óptico .....	17
Figura 11: Curva de Crescimento de microorganismos Padrão, em um sistema fechado .....	18
Figura 12: Progesterona (20a) e Cortisol (21) .....	22
Figura 13: Setores industriais que mais utilizam processo de biotransformações nos últimos anos .....	24
Figura 14: Produtos utilizados nas reações de biotransformações .....	30
Figura 15: Frascos contendo as culturas crescidas por 96h em meio MGYP líquido contendo o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
Figura 16: Gráfico da curva de crescimento dos fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , e <i>Trichoderma sp.</i> , em meio solido na fase log e estacionária de crescimento .....	35
Figura 17: Fungos <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Penicillium citrinum</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C), <i>Trichoderma sp.</i> (D), <i>Aspergillus ochraceus</i> (E) crescidos em meio solido BDA.....	36
Figura 18: Produtos da biotransformação da (-)-(R)-carvona.....	39
Figura 19: Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo <i>Penicillium citrinum</i> .....	39

Figura 20: Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	40
Figura 21: Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	40
Figura 22: Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	41
Figura 23: Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo <i>Trichoderma sp</i> .....	41
Figura 24: Produtos da biotransformação da (+)-(S)-carvona .....	43
Figura 25: Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo <i>Penicillium citrinum</i> .....	43
Figura 26: Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .....	44
Figura 27: Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	44
Figura 28: Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	45
Figura 29: Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo <i>Trichoderma sp</i> .....	45
Figura 30: Enoato redutase .....	45
Figura 31: Estereoespecífico ataque do Hidrogênio na redução da dupla C-C e ao grupo carbonila da carvona.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.: Escala de Fabricação dos primeiros produtos de fermentação em comparação com os primeiros países de produção, ano e quantidade produzida anualmente nos anos de 1910 a 1930 .....	21
Tabela 2.: Classificação das enzimas utilizadas em reações de biocatálise e percentagem de utilização.....	26
Tabela 3.: Descrição das cepas de fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Trichoderma sp</i> , número de registro na coleção FIOCRUZ e meios de cultivo específicos.....	28
Tabela 4.: Enumeração dos erlenmeyers.....	30
Tabela 5.: Medida do raio de crescimento de colônias dos fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , e <i>Trichoderma sp.</i> , crescidos de 0 a 168 horas.....	34
Tabela 6.: Compostos de maior relevância da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelos fungos <i>Penicillium citrinum</i> (2), <i>Fusarium oxysporum</i> (5), <i>Aspergillus ochraceus</i> (8), <i>Aspergillus niger</i> (11), <i>Trichoderma sp.</i> (14) .....	38
Tabela 7.: Compostos de maior relevância da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelos fungos <i>Penicillium citrinum</i> (1), <i>Fusarium oxysporum</i> (6), <i>Aspergillus ochraceus</i> (9), <i>Aspergillus niger</i> (12), <i>Trichoderma sp.</i> (15) .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

ATCC – American Type Culture Collection

BA - Bloco de Agar

CCD – Cromatografia por Camada Delgada

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa

EUA – Estados Unidos da America

FDA – Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPC – Carbamato de Isopropilfenila

IPP – difosfato Isopentila

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IR – Índice de Retenção

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCTC – National Collection of Type Culture

NIST – National Institute of Standards and Technology

NRRL – Northern Utilization Research Branch

OM – Oleo Mineral

UEG – Universidade Estadual de Goiás

TIC – Cromatograma Total de Íons

## 1 INTRODUÇÃO

A biocatálise é um processo de transformação química mediado por organismos vivos e encontra-se em amplo desenvolvimento. Pesquisas realizadas em vários ramos da química e da biologia têm como principal objetivo o desenvolvimento de novos catalisadores biológicos para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, estão sendo desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com alta especificidade para melhor explorar a biodiversidade (CONTI *et al* , 2001). Entre as aplicações e estudos de fontes alternativas de bioprodutos observa-se um aumento no emprego de produtos naturais utilizados em estudos biotecnológicos, como os derivados de plantas.

Nas plantas os compostos secundários têm sido explorados pela sua grande diversidade estrutural entre estes estão os terpenos, os alcalóides entre outros. Os terpenos constituem a classe de produtos naturais com maior número de substâncias descritas (DEWICK, 2009). Esta classe de substância ainda tem sido utilizada como fonte de matéria prima em processos biotecnológicos, como em reações de biotransformações. As reações de biotransformação são geralmente estereoespecíficas, sendo capazes de realizar transformações não acessíveis por processos químicos clássicos além de ter custos de baixo custo (HARBONE, 1984). O processo de biotransformação de compostos orgânicos pode ser uma alternativa para gerar modificações estruturais com obtenção de grande diversidade de moléculas que poderão ser utilizadas como material para prospecção de novos fármacos (HARBONE, 1984).

Os fungos tem sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, pois é de fácil manejo, crescimento rápido e utiliza meios de cultivo bem caracterizados quimicamente (TRABULSI, 1996). Estes organismos são muito utilizados em estudos de biotransformação de vários compostos inclusive de terpenos (DUETZ *et al.*, 2001)

Assim, este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias utilizando fungos filamentosos em reações de biotransformação, utilizando como substratos exógenos monoterpênicos. O trabalho apresenta uma breve revisão do

tema e os resultados obtidos e esperados no processo de biotransformações de (R)-(+)-carvona e (S)-(-)-carvona utilizando culturas de fungos filamentosos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 BIOSÍNTESE

Conceitua-se como metabolismo o conjunto de reações químicas que estão ocorrendo continuamente em cada célula (SANTOS, 2007).

O metabolismo pode ser dividido em primário e secundário, mas, na realidade, não existe uma divisão exata entre estes dois tipos de metabolismos. Admite-se, porém, que os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, como originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas e derivadas dos produtos do metabolismo primário, são produtos do metabolismo secundário (WINK, 1990 apud SANTOS, 2007, VICKERY & VICKERY, 1981).

De acordo com Vickery & Vickery (1981) e Santos (2007) todo o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos. Destes resultam todas as substâncias do metabolismo primário, as quais por sua vez irão originar os metabólitos secundários. As reações fotossintéticas podem ser agrupadas em duas categorias: reações de claro, nas quais a energia solar será absorvida por moléculas de clorofila e transferida destas para moléculas armazenadoras de energia (ATP e NADPH), e reações de escuro, nas quais as moléculas de ATP e NADPH servirão, respectivamente, como fonte de energia e força redutora no processo de fixação do  $\text{CO}_2$ , o qual será convertido principalmente em glicose.

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários direta ou indiretamente. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). A partir deste composto poderá seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato. Entrando no ciclo do ácido cítrico,

serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenos e os esteróis, enquanto as acetogeninas resultam da condensação do acetato. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (OLIVEIRA, 1998; SANTOS, 2007; HABERMEHL, FLIEGNER, 1998).

Os compostos secundários são importantes para diversas funções metabólicas e fisiológicas das plantas, além de serem utilizados com finalidades terapêuticas (SANTOS, 2007; HABERMEHL, FLIEGNER, 1998).

## 2.2 TERPENOS

A maioria dos terpenos podem se apresentar como óleos vegetais. De acordo com Simões (2007) as regras internacionais de padronização ISO (International Standard Organization), definem óleos voláteis como produtos que foram obtidos de partes de plantas ou de pericarpos de frutos cítricos, por meio de destilação. Esses óleos são substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, lactonas, cumarinas, ácidos orgânicos, e até compostos de enxofre.

Esses óleos são classificados quimicamente na sua grande maioria como derivados de fenilpropanóides ou de terpenos. Fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico. Os terpenos são todas substâncias cuja origem biossintética deriva do isopreno. A unidade isoprênica deriva-se do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenos são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas. Nos compostos de óleos voláteis predominam a condensação cabeça-cauda (SIMÕES, 2007; WANG, TANG, BIDIGARE, 2005).

Os terpenos compreendem o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35.000 substâncias conhecidas e constituem uma classe de produtos naturais com grande diversidade estrutural (DEMYTTENAERE, 2001; DEWICK,

2009). Os terpenos são baratos, disponível facilmente e precursores naturalmente renováveis (DEMYTTENAERE, KIMPE, 2000)

Estes compostos têm como base as de unidades isoprênicas  $C_5$  (Figura 1), e são sintetizados por reações de condensação (cabeça-cauda).

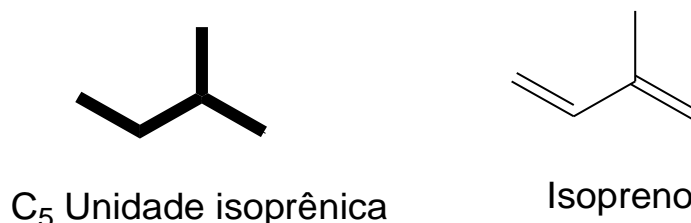


Figura 1: Unidade isoprênica e isopreno (DEWICK, 2009).

Seus esqueletos carbônicos são sintetizados a partir de somente dois compostos isoméricos de 5 carbonos: difosfato de isopentenila (IPP,  $C_5$ ) e outro isômero mais eletrofílico, o difosfato dimetilalila (DMAPP,  $C_5$ ) (BRUNETON, 2001) (Figura 2). A variação do número de repetições de unidades de isoprenos, e as reações de ciclização e rearranjos são responsáveis pela incrível diversidade de estruturas observadas na natureza para estes compostos (ROHMER, 1999; WANG. TANG, BIDIGARE, 2005).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidade isoprênica no seu esqueleto carbônico, como hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (WANG. TANG, BIDIGARE, 2005; DEWICK, 2009).

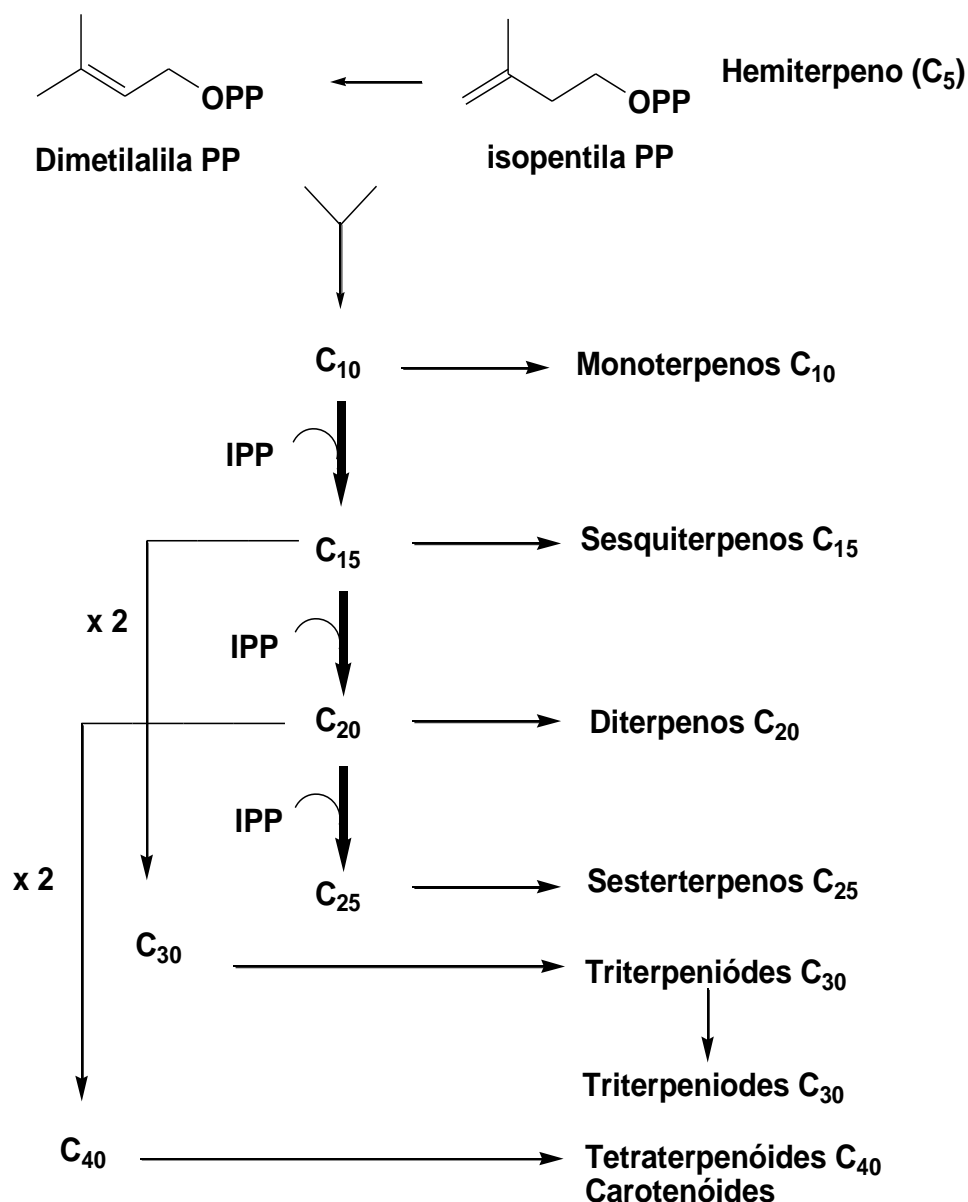


Figura 2. Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP e IPP. (DEWICK, 2009)

Os produtos de origem terpênica possuem vasta aplicação farmacêutica, sendo mono e sesquiterpenóides, devido à sua alta qualidade sensorial, os principais compostos utilizados como flavorizantes na indústria de alimentos e medicamentos (BAUER et al, 1990). Fragrâncias florais, frutadas, amadeiradas e cítricas destacam-se dentre os aromas apresentados por terpenos isolados. Esta variedade de fragrâncias e aromas são pontos de grande relevância gerando um alto interesse comercial por estes produtos, o que pode ser atribuída à

ocorrência de um grande número de isômeros para esta classe de metabólitos secundários (Figura 3).

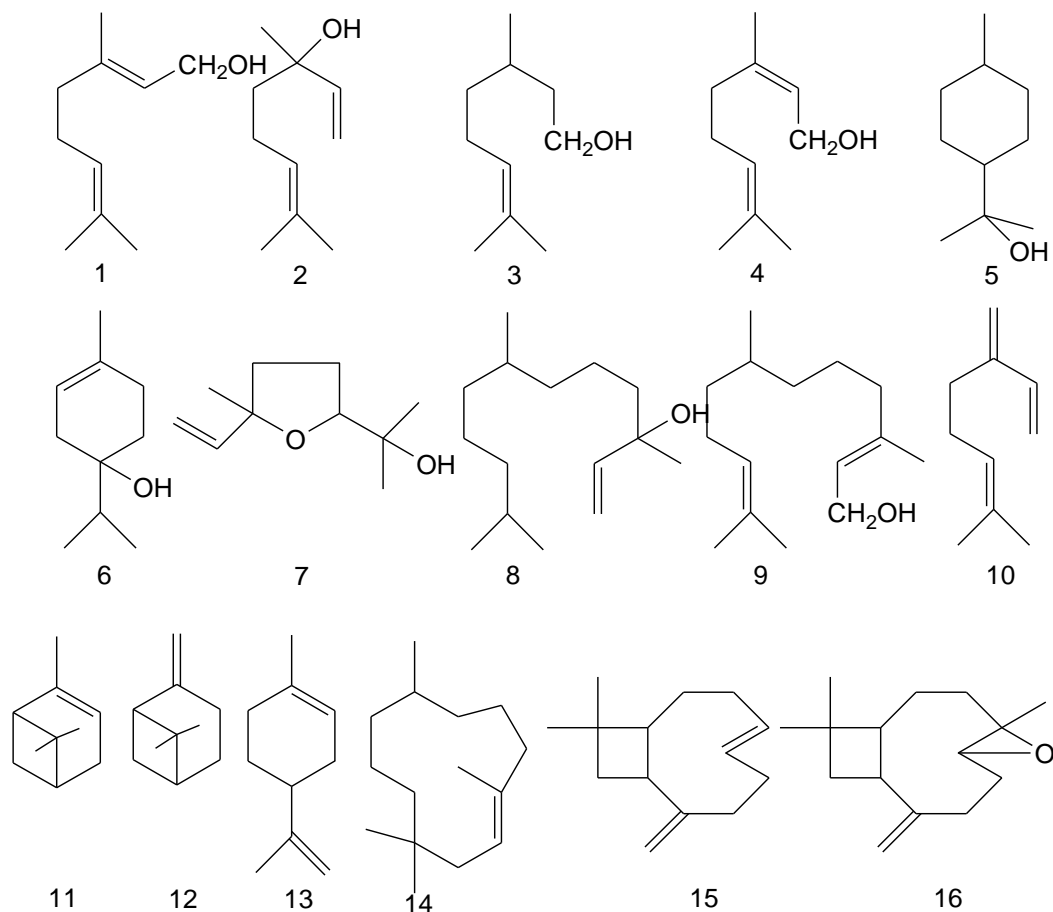


Figura 3: Estruturas de alguns terpenóides. 1. Geraniol (floral, cítrico); 2. Linalol (floral); 3. Citronelol (doce, cítrico); 4. Nerol (floral); 5.  $\alpha$ -Terpineol; 6. Terpinen-4-ol (medicinal); 7. Óxido linalol (herbáceo); 8. Nerolidol (floral); 9. Farnesol (floral); 10.  $\beta$ -mirceno (medicinal); 11.  $\alpha$ -pineno (pinos); 12.  $\beta$ -pineno (pinos); 13. Limoneno (cítrico, doce); 14. Humuleno (medicinal); 15.  $\beta$ -cariofileno (herbáceo); 16. Óxido  $\beta$ -cariofileno (herbáceo).

Muitos terpenos são precursores de um grande número de substâncias sintéticas, produzidas em processos puramente químicos (JANSSENS *et al.*, 1992). Parte destes compostos apresenta atividade antiinflamatória e expectorante (DUKE, 1985).

Os produtos naturais derivados de plantas têm um significativo uso nas terapias de doenças humanas e prevenção e alguns derivados de organismos marinhos são promissores para aplicações medicinais (WANG, TANG, BIDIGARE, 2005). Mais do que 60% de drogas quimioterápicas para câncer e doenças infecciosas, são de origem natural. Entre estes grupos, muitos compostos de

interesse são extensamente aplicados na indústria nos setores de fragrâncias, flavonóides, e temperos, e são também usados em produtos como perfumes, cosméticos e aditivos alimentares. Muitos terpenos têm atividade biológica e são usados com propósito médico. Ainda os produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de compostos protótipos para indústria farmacêutica (WANG, TANG, BIDIGARE, 2005; DEWICK, 2009).

Além deste, alguns outros terpenos como limoneno **13** (Figura 3) e terpinoleno **6** (Figura 3), apresentam atividade antimicrobiana, sendo largamente utilizados como material de partida para a síntese de produtos também comercialmente importantes, como mentol e carvona (CARVALHO E FONSECA, 2006).

### 2.3 MONOTERPENOS

Monoterpenos são os constituintes mais conhecidos dos óleos essenciais, cerca de 90% dos óleos voláteis, essências florais, resinas defensivas e plantas aromáticas (LOZA, 1999; LITTLE, CROTEAU, 1999). Os monoterpenos são uma grande família de compostos naturais de plantas e suas ações biológicas são cruciais, como no processo de polinização, interações alelopáticas e de defesa contra herbívoros e patógenos. Alguns destes compostos possuem importância comercial na alimentação humana como aromatizante, fragrâncias e também podem servir como agentes terapêuticos na medicina (ZÁRATE et. al., 2008). Alguns monoterpenos têm atividade antitumoral, não somente prevenindo a formação ou progresso de câncer, mas também possuem a habilidade de regredir tumores malignos existentes (CROWELL, 1999).

Os monoterpenos podem ser divididos em acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, e esses grupos podem ainda ser subdivididos em hidrocarbonetos saturados e insaturados, alcoóis, aldeídos, cetonas, lactonas e tropolonas (SIMÕES, 2007).

Os monoterpenos podem ser isolados diretamente de amostras de óleos essenciais e apresentam como principais características estruturais a presença de de diferentes grupos funcionais tais como hidroxilas e carbonilas nas mais variadas posições, a presença ou não de insaturações, gerando efeitos significativos nas atividades biológicas destes compostos (ALEIXO, 1999). Vários monoterpenos são bem estudados e utilizados comercialmente como os apresentados na Figura 4.

O  $\beta$ -mirceno **10** (Figura 3), um monoterpeneo acíclico insaturado é um exemplo de terpenos voláteis e que ocupa posição de destaque por apresentar comprovada atividade analgésica e, portanto, grande interesse comercial

O limoneno **13** é o monoterpeneo monocíclico mais abundante na natureza, e ocorre em uma grande variedade de espécies de árvores e ervas, sendo o principal constituinte de óleo de casca de laranja, citrus e limão. O limoneno é um quimioprotetor e agente terapêutico contra muitos tipos de células tumorais (DUETZ *et al.*, 2001; CROWELL, 1999).

Monoterpenos álcool acíclicos tais como geraniol **1** (Figura 3), nerol **4** (Figura 3) e linalol **2** (Figura 3) possuem importantes propriedades aromáticas, podendo ser obtidos a partir do  $\beta$ -mirceno (DERFER & DERFER, 1981). O geraniol **1** citronelol **3**, nerol **4** e, que exibem também atividade contra *Micobacterium tuberculosis* com valores de MIC (Concentração Mínima Inibitória) de 64, 128, e 64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (SOTOKAWA, NODA, HIRAMA, 2000).

O álcool perílico **17**, o análogo hidroxilado do limoneno, exibe atividade quimiopreventiva contra câncer de fígado induzido quimicamente em ratos e tumores recorrentes em animais. Além disso, o álcool perílico possui atividade contra tumor mamário em rato e câncer de pâncreas em hamster transplantado, com regressão completa na maioria dos tumores tratados inclusive os de cérebro (MILLS *et al.*, 1995; HAAG, GOULD, 1994; MIRANDA, QUEIROS, 2007). Outros monoterpeneos importantes na indústria dos aromas são o carveol **18**, encontrado na espécie de planta *Buddleia asiática*, e o dihidrocarveol **19** encontrado em vários óleos essenciais como da hortelã, alcaravia e alecrim. O pulegol **23** é um dos constituintes do *Eucalypto citriodora*

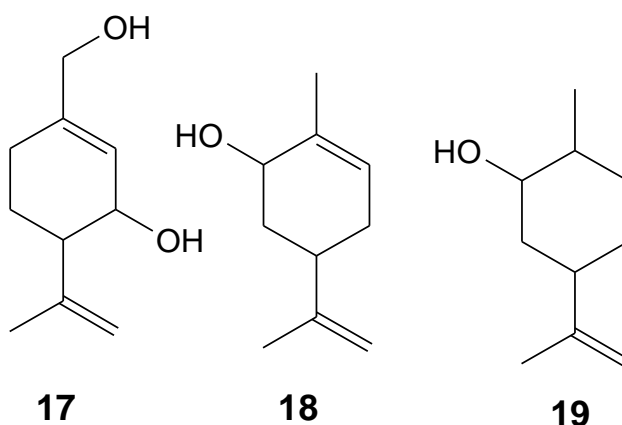


Figura 4: Monoterpenoides alcoóis cíclicos

A carvona **20** é o principal monoterpeneo do óleo de alcaravia, previne o desenvolvimento de carcinoma de pulmão e estômago induzido quimicamente (WATTENBERG et al, 1989). A isopulegona **21** esta presente no óleo da folha de buchu (*Agathosma crenulata*). Na classe das Piperitona, a isopiperitona **22** é encontrada na erva-cidreira (*Melissa officinalis*) (SELL, 2003).

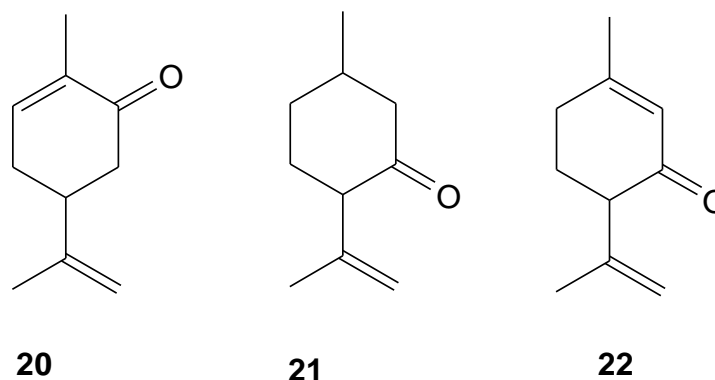


Figura 5: monoterpeneos cetonas

O fenol, carvacrol **23**, é um dos componentes do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) e do tomilho (*Thymus vulgaris*), o timol **24** é um dos constituintes do *Thymus vulgaris*,

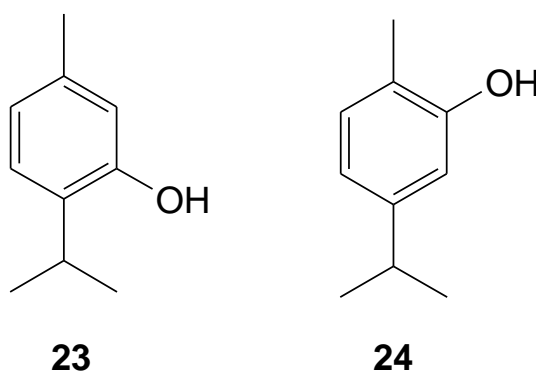


Figura 6: Monoterpeneos aromáticos

Dentre os monoterpenos podemos ainda citar as piretrinas, que são monoterpenos ésteres, e apresentam atividade inseticida (VIEGAS, 2003). Monoterpenos acíclicos halogenados como a halomin, isolado da espécie de alga vermelha *Portieria hornemanni*, utilizado no tratamento de câncer renal, colo, cérebro, e pulmão (FULLER, et al, 1994).



Vários esforços biotecnológicos têm sido feitos para aumentar o rendimento dos monoterpenos em plantas para atender a crescente procura mundial de aromas, perfumes e produtos farmacêuticos. De acordo com Demyttenaere (2001) e Zárate (2008) aromas produzidos biotecnologicamente possuem algumas vantagens tais como: o composto pode possuir o estatuto legal de um composto natural; o substrato e alta especificidade de reações enzimáticas garantem a estereoquímica; múltiplas reações que não ocorrem em solução aquosa por meios químicos, podem ocorrer em condições naturais; problemas ambientais como clima desfavorável, influência externas negativas, desvantagens econômicas podem ser ignoradas.

Existem muitas maneiras de produzir bioflavonoides, podem ser utilizados tecidos vegetais, culturas de células, microorganismos como fungos, bactérias, leveduras e algas que podem produzir novos aromas através de bioconversões (DEMYTTENAERE, 2001; FARNET, ZAZOPOULOS, 2005; ZÁRATE et. al. 2008).

Uma maneira muito eficiente de obter bioflavonóides é por processos biotecnológicos utilizando microorganismos. A produção microbiana de aromas oferece muitas vantagens, como as circunstâncias em que as reações ocorrem são geralmente brandas, como pH neutro e temperatura ambiente. Há duas maneiras de produzir sabores, por bioconversão de microorganismo ou síntese com produção de novos aromas através de precursores naturais (DEMYTTENAERE, 2001; PINHEIRO, MARSAIOLI, 2007; SERRA, FUGANTI, BRENNNA, 2005).

## 2.4 CARVONA

A carvona possui um carbono assimétrico, carbono 4 do anel ligado ao isopropenil. Possui 2 enantiômeros (Figura 7), o isômero destrogeno ((+)-(S)-

carvona) esta presente na alcaravia e o isômero levogeno ((-)-(R)-carvona) esta presente na hortelã (SELL, 2003).

O termo carvona deriva do nome *Carum carvi*, nome científico da alcaravia (SELL, 2003), cujo principal constituinte do seu óleo essencial é a (+)-(4S)-carvona, cerca de 85% do óleo (Figura 6). A (-)-(4R)-carvona é o principal constituinte do óleo essencial *Mentha spicata*, nome científico da hortelã, cerca de 75% desse óleo é carvona (CUNHA, SILVA, ROQUE, 2006).

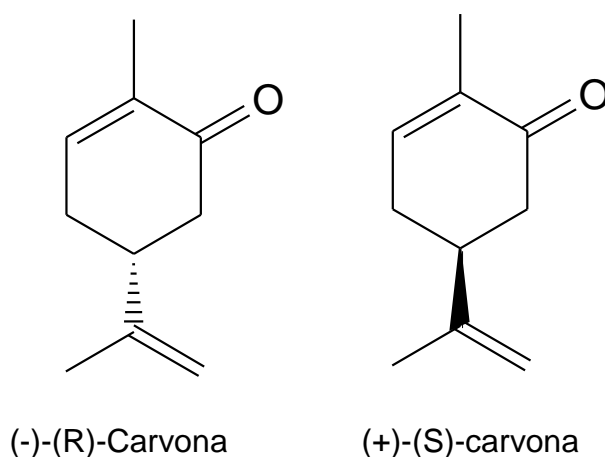


Figura 7. Formula estrutural da (-)-(R)-Carvona e (+)-(S)-carvona.



*Mentha spicata* (hortelã)



*Carum carvi* (alcaravia)

Figura 8. *Mentha spicata* (hortelã) cujo principal constituinte do óleo essencial é a (R)-carvona e a *Carum carvi* (alcaravia) principal constituinte do óleo essencial é a (S)-carvona.

Estes aromatizantes são de grande importância comercial e a síntese da carvona tem recebido uma atenção considerável. Hoje em dia a maioria dos aromatizantes vem de fontes naturais, por exemplo, para se obter a (-)-(R)-Carvona é necessário toneladas do vegetal alcaravia. A síntese apresentada da Figura 9 foi desenvolvida no século dezenove e ainda é o processo mais eficiente em amplo uso comercial (SELL, 2003; PINHEIRO, MARSAIOLI, 2007).

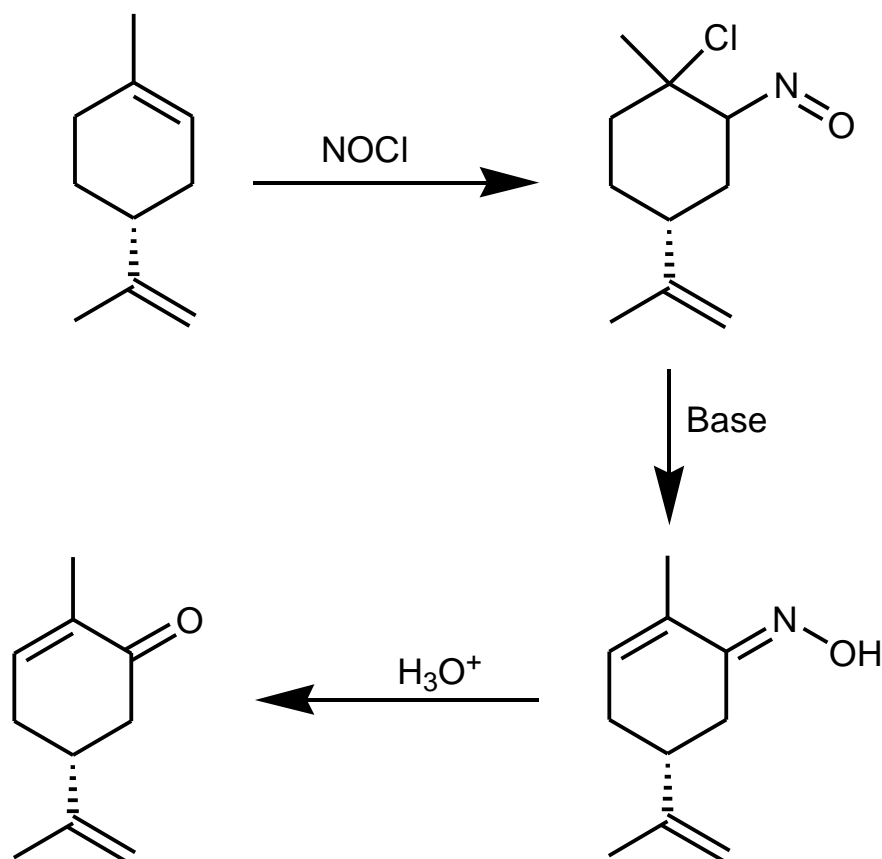


Figura 9. Síntese da carvona

Este processo sintético utiliza o d-limoneno, um componente principal do óleo da laranja, de fácil acesso por ser subproduto da indústria de sucos cítricos, como precursor. Toda a reação química acontece no anel, assim o centro quiral não é afetado. Para garantir a quiralidade usa cloreto de nitrosila que é altamente regioseletivo. A reação é completada adicionando um éster de nitrito e ácido clorídrico (SELL, 2003).

A carvona possui uma ampla aceitação no mercado, sendo usada como aromatizante, inibidor de brotação, antimicrobiano, antifúngico, na indústria alimentícia, na indústria farmacêutica e de cosméticos (FONSECA & CARVALHO, 2006).

Normalmente durante o armazenamento ocorre um brotamento prematuro nas batatas, esse brotamento é responsável pela redução do número de batatas comercializáveis. E normalmente esse brotamento prematuro é inibido com inibidores de brotamento químico e controle da temperatura entre 2-4° C. Entretanto a temperatura nesta faixa provoca degradação do amido e o uso de produtos sintéticos para o uso da inibição do brotamento não é aprovado pelos consumidores.

Com isso a busca por inibidores de brotamento naturais é uma alternativa, pois além de satisfazer os consumidores esses produtos são menos prejudiciais para o meio ambiente. Com essa busca por produtos naturais como inibidor de brotamento descobriu-se que a (+)-(S)-carvona é um bom inibidor de brotamento. Comparando os inibidores químicos convencionais como isopropilfenilcarbamato (IPC) com a (+)-(S)-carvona, a carvona apresentou os melhores resultados e para armazenamento em longo prazo, apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium sulphureum*, *Phorma exígua* e *Helminthosporium solani* (HARTMANS et al., 1995).

Aggarwal e colaboradores (2002) testou atividade antimicrobiana dos óleos essenciais da *Mentha spicata* cujos principais constituintes são a (-)-(R)-Carvona e o (4S)-(-)-limoneno. Estudos mostram que os isômeros da carvona foram eficazes contra um amplo espectro de bactérias e fungos patogênicos humanos. A (R)-(+)-carvona foi ativa contra *Campylobacter jejuni*, enquanto a (+)-(S)-carvona foi eficaz contra *Listeria monocytogenes*. Em outro estudo feito por Naigre et al. (1996), mostra significativa atividade da (-)-(R)-Carvona sobre *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Aspergillus Níger*, em concentração acima de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. A citotoxicidade e genotoxicidade destes compostos, em vários ensaios microbianos de curto prazo em mamíferos, mostraram que todos eles inibiram a proliferação de células Hep-2 (linhas de células epiteliais de carcinoma humano), de forma dose-dependente (STAMMATI et al., 1999).

Ainda estudos na área médica, a carvona tem sido utilizada como inibidor na transformação da forma cocos para a filamentosa do fungo *Candida albicans*. Esse é o mais comum dos fungos causadores de doenças em humanos, como a candidíase (MCGEADY, WANSLEY, LOGAN, 2002). Possui também atividade tanto na prevenção quanto no tratamento de câncer (CROWELL, 1999). A carvona tem sido usada também na melhora da função gastrointestinal (KLINE et al., 2001). A carvona tem sido usada também como matéria-prima de muitos medicamentos de alta relevância.

A carvona também pode ser usada como inseticida contra a *Drosophila melanogaster* (FRANZIOS et al., 1997), como repelente da fêmea do *Aedes aegypti* (VARTAK, SHARMA, 1993) e como inseticida para a larva. Neste estudo a carvona juntamente com outros monoterpenos, na concentração de até 100ppm obteve um percentual de morte das larvas de até 100% (COSTA et al., 2005).

## 2.5 MICROORGANISMOS

Tem se observado um grande interesse na área de microbiologia principalmente dos fungos quando se trata de biotecnologia. Isso se deve principalmente devido a seu rápido crescimento e metabolismo (TRABULSI *et al.*, 1996; FARNET, ZAZOPOULOS, 1998; HUTCHINSON, 1998).

O reino fungi é um dos mais numerosos, com cerca de 1 milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhados pelo mundo. E apenas 5% já foram catalogadas, dentre estes já existem muitas espécies de grande importância. Dentre estes podemos destacar os utilizados na fabricação de alimentos, bebidas, ácido orgânicos, fármacos e inúmeros outros. Com pesquisas na descoberta de novas espécies espera-se o surgimento de propriedades com potencial e valor biotecnológico (TRABULSI *et al.*, 1996; FARNET, ZAZOPOULOS, 1998 ).

Os fungos se reproduzem em ciclos assexuais, sexuais e parassexuais. A reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de conídios. A reprodução sexuada culmina na produção de basidiósporos, no caso de basidiomicetos. A reprodução parassexuada consiste na fusão de hifas e formação de um heterocarion que contém núcleos haplóides. Apesar de ser raro, o ciclo parassexual é importante na evolução de alguns fungos (PELCZAR *et al.*, 1996).

Os esporos assexuados às vezes são chamados de conídios; mais freqüentemente, contudo, esse termo é reservado para os esporos assexuados que se formam nos terminais ou nos lados das hifas (Figura 10).

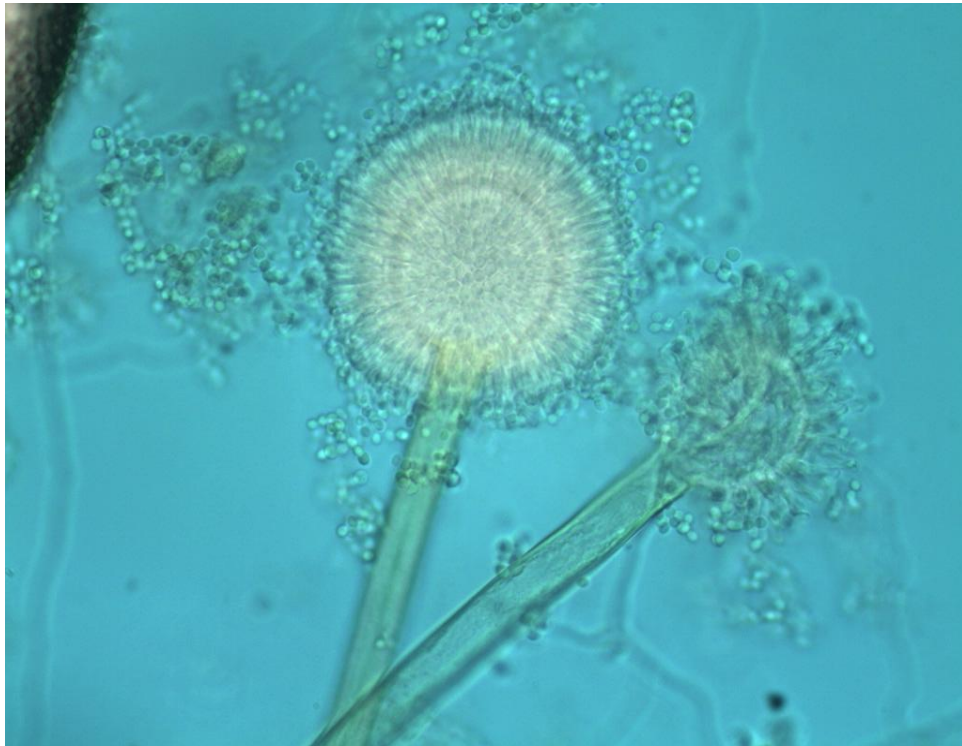


Figura 10. Estruturas do fungo *Aspergillus ochraceus* vistas através de microscópio óptico (40X).

Os fungos crescem como células únicas, as leveduras, ou como colônias filamentosas multicelulares, os fungos filamentosos, bolores e cogumelos. Os fungos não possuem pigmentos fotossintéticos e, assim, estão restritos a uma existência saprofítica ou parasita (TRABULSI *et al.*, 1996).

O termo crescimento se refere ao aumento no número de células não ao aumento das dimensões celulares. O crescimento populacional é definido como o aumento do número, ou da massa microbiana. Quando uma cultura microbiana desenvolve-se em um sistema fechado, pode se confeccionar uma curva de crescimento. Esta pode ser dividida em diferentes etapas (Figura 11): lag, log, estacionária e de declínio:

- Fase de latência ou lag é o período variável, onde não há um aumento significativo da população, nesta fase a célula procura se adaptar ao novo meio;
- Fase logarítmica ou fase log é a etapa as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando.
- Fase estacionária, nesta etapa os nutrientes estão escasseando e os produtos tóxicos estão se tornando mais abundantes. Nesta etapa não há um

crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Nesta fase que são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem as enzimas;

- Fase de declínio a maioria das células está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. A contagem total permanece relativamente constante, enquanto as variáveis caem lentamente (GAMA, 2007; MADIGAN, 1999).

Em processos industriais que visa à obtenção de produtos microbiológicos, usa-se o método de crescimento em células contínuas. Nestes casos, tem-se o interesse em manter as células em fase log ou estacionária (GAMA, 2007; MADIGAN, 1999).

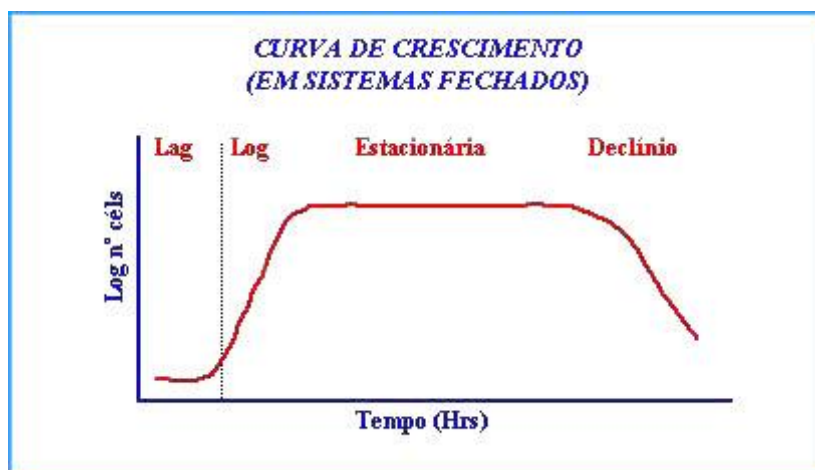


Figura 11. Curva de Crescimento de microorganismos Padrão, em um sistema fechado (MADIGAN, 1999).

Os fungos têm sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, pois é de fácil manejo, crescimento rápido e utiliza meios bem caracterizados quimicamente. Podem produzir enzimas como lipases, invertases, lacases, proteíases, amilases etc., que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Outros elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas, como tiamina,



etc. Os fungos necessitam de água para o seu desenvolvimento, sendo alguns halofílicos, crescendo em ambientes com elevada concentração de sal (TRABULSI, 1996; FARNET, ZAZOPOULOS, 1998).

Algumas espécies de fungos são patogênicos, mas a grande maioria participa de processos biotecnológicos importantes para os seres humanos.

O gênero *Aspergillus* é a causa mais freqüente em infecções invasivas em pacientes imunodeprimidos. Mais de 180 espécies são encontradas no gênero, e as 3 espécies mais comuns causadoras de aspergilose invasiva (AI), são: *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. terreus*. Ainda *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ustus* podem causar AI raramente (HENRY, IWEN, HINRICHS, 2000).

O gênero *Fusarium* está comumente associado a doenças de plantas, como um fitopatôgeno, associados como parasitas virulentos e outros como saprófitas. Fungos pertencentes a este gênero são distribuídos mundialmente em plantas economicamente importantes, como arroz, milho, sorgo, manga, pinho, aspargo e cana de açúcar. Algumas cepas produzem quantidade significativa de metabólitos secundários como as giberelinas. O grau de virulência do fungo está associada à quantidade de giberelinas (VOIGT, SCHLEIER, BRUCKNER, 1995).

O gênero *Trichoderma* tem sido empregado como fungo de acolhimento através da penetração direta de hifas de acolhimento ou produção de enzimas extracelulares. Algumas espécies produzem antibióticos, antifúngicos. Algumas espécies também podem ser degradadores de matéria orgânica e agem como concorrentes para fungos em fase saprófitas, especialmente quando os nutrientes forem limitantes (MONTE, 2001). Uma característica do gênero *Trichoderma* é a capacidade de degradar de forma eficaz uma série de polímeros naturais, principalmente celulose e hemicelulose, que também fornece as bases para o uso comercial do fungo *Trichoderma* no controle de fungos fitopatógenos. Também é utilizado em grande escala na produção de enzimas em muitas empresas a nível mundial (PENTTILÄ, LIMÓN, NEVALAINEN, 2004).

O gênero *Penicillium* é reconhecido por ser amplamente dispersos no ambiente, com mais de 225 espécies. As espécies deste gênero, em geral, são consideradas principalmente fungos do solo, cuja função principal é a decomposição. Suas espécies são de grande importância para os ecossistemas, a agricultura e a biotecnologia. A descoberta dos antibióticos de uso clínico começou com a descoberta da eficácia da penicilina, um composto  $\beta$ -lactâmico. Muitos outros

metabolitos biológicos como antibióticos, antifúngicos e imunossupressores, têm sido descobertos a partir de metabolitos de cepas de *Penicillium*. Além disso, várias espécies de *Penicillium* são importantes agentes causadores de infecção por causa da produção de micotoxinas (NAKASHIMA, 2008).

## 2.6 BIOTRANSFORMAÇÃO

Biotransformações são conversões químicas catalisadas por enzimas sobre substratos não naturais. O desenvolvimento da biotransformação como ferramenta em sínteses orgânicas é apenas uma das muitas utilizações da catalise biológica. Que incluem aplicações na fabricação e conservação de bebidas, na fabricação de têxteis, aplicações de diagnóstico de tecnologia, na síntese de ácidos nucleicos, cosmético, dentre outros (SCRAGG, 2006; SHAW, KAREM, KIENER, 2003; STRAATHOLF, PANKE, SCHIMID, 2003; LUNA, 2004).

O estudo da biotransformação teve início por volta do século XIX, com estudos de Frankland, por volta de 1897. Na década seguinte HILL (1897), KASTLE e LOEVENHAR (1900) e POTTEVIN (1906), mostraram que a catálise de enzimas hidrolíticas eram reversíveis. Pottevin (1906) demonstrou que a lipase pancreática poderia sintetizar oleato de metila a partir do mentol e do ácido oléico.

O primeiro benefício da evolução microbiológica para a indústria foi a fermentação em larga escala. O processo de fermentação teve uma grande expansão nesse período como pode ser observado na tabela abaixo (TURNER, 1998).

TABELA 1. Escala de Fabricação dos primeiros produtos de fermentação em comparação com os primeiros países de produção, ano e quantidade produzida anualmente nos anos de 1910 a 1930.

Fermentação Produto	Base para comparação da manufatura		
	País	Ano	Tonelada anual
Etanol	Manufatura EUA	1917	0,17 x 10 <sup>6</sup> (BEDFORD, 1921)
Glicerol	Manufatura alemã	1917	25000 (CHAPMAN, 1921; HABER, 1971)
Acetona	Manufatura inglesa e canadense	1918	Aprox. 3000 (CHAPMAN, 1921; HABER, 1971)
Butanol			Produção de butanol deve ser o dobro da acetona
D- e L- Lactato	Consumo Inglês	1909	1500
	Importação inglesa	1916	720 (CHAPMAN, 1921)
Ácido cítrico	Manufatura EUA	1929	3200 (PRESCOTT and DUNN, 1949)

FONTE: TURNER, 1998.

Nas décadas de 30 a 50 o processo de biocatálise teve uma estagnação, devido a diminuição da demanda por produtos e também teve um distanciamento entre o químico, microbiologista e o bioquímico, com isso o interesse pela biocatálise diminuiu. Já nas décadas de 60 e 80 foi um período de desenvolvimento, principalmente pelo início da fabricação de esteróides pela indústria farmacêutica a partir da transformação de substâncias de plantas. Embora alguns químicos duvidassem da catálise microbiana, bons controles confirmaram a biotransformação (TURNER, 1998; ISHIHARA, 2003).

A primeira biotransformação comunicada foi a transformação do esteróide 11- $\alpha$ -hidroxila de progesterona (Figura 9) em comparação com o cortisol, embora tenha uma orientação do grupo hidroxila errada, este é facilmente invertido (TURNER, 1998; SHAW, KAREM, KIENER, 2003).

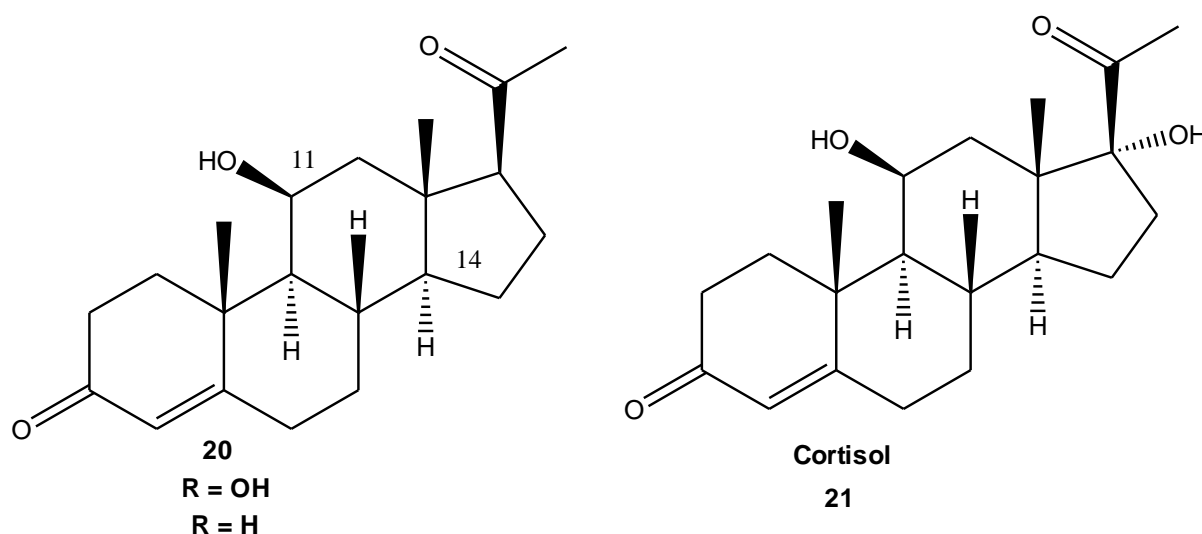


Figura 12. Progesterona (**20**) e Cortisol (**21**) (TURNER, 1998).

Em geral, nos processos industriais, a biotransformação ou biocatálise é obtida por caminhos tradicionais, que consistem desde a identificação de fontes dos microorganismos, seleção de eficientes biocatalisadores, desenvolvimento e otimização de processos da escala laboratorial à planta piloto. Uma pesquisa prévia em bibliotecas de compostos orgânicos, enzimas e microorganismos, também têm sido empregados pela denominada, química combinatória quimioenzimática (chemoenzymatic combinatorial chemistry). Esta tecnologia tem como base a integração de processos enzimáticos interfaciais, transformações microbianas e reações químicas, desta forma interconectando a catálise química com a biocatálise (CONTI *et al.*, 2001).

Os procedimentos de avaliação e seleção de microorganismos, de plantas ou de células animais, representam o método tradicional de descoberta de novos biocatalisadores. Os microorganismos são de particular interesse devido o curto período de geração, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e há uma infinidade de microorganismos na natureza que podem ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Estes modificam e degradam uma gama de moléculas orgânicas complexas e então, é de se esperar que pelo menos um deles, catálise uma dada reação de interesse (CONTI, 2001; FARNET, ZAZOPOULOS, 2005; HUTCHINSON, 2005).

Nos últimos anos, a produção biotecnológica de aromas naturais tem sido estimulada por consumidores de produtos naturais e produtos saudáveis

(SCHILLING, HÄUSLER, 1997). Com isso o interesse em aromas naturais em vez de aromas sintéticos, levou ao aumento na pesquisa de alternativas para produção destes compostos baseados na produção microbiana de bioaromas (SCHREIER et al, 1992; BERGER, DRAWERT, TIEFEL, 1992)

Alguns desses processos atualmente estão ou serão explorados comercialmente. Quase 80% dos aromas e fragrâncias usadas mundialmente são produzidas quimicamente. De acordo com FDA, aromas naturais devem ser produzidos a partir de matérias naturais. O produto final deve ser idêntico a algo já existente na natureza. Deste modo, biocataliticamente e não quimicamente, transformações de substâncias naturais e aromas produzidos microbiologicamente podem ser rotulados legalmente como produtos naturais (ARMSTRONG, et al, 1989).

Nos últimos anos uma serie de fatores estão conduzindo a um aumento na utilização de biocatálise. Um deles é a gama de processos catalíticos comercializados atualmente. Enzimas e organismos que antes eram inacessíveis são utilizados hoje graças a revolução na genética molecular (SCRAGG, 2006). A influência dominante para a inovação continua na indústria farmacêutica e na agroquímica, indústrias onde a forma e a quiralidade molecular tem um efeito crítico sobre o valor final do produto. Outras indústrias que também fazem desta biocatálise é a têxtil, de polímeros e detergentes entre outras (TURNER, 1998; SCRAGG, 2006).

Segundo Straathof *et. al.* (2002), os processos de biotransformação em nível industrial têm apresentado um grande avanço no decorrer dos anos, tendo dado um grande salto em número de processos utilizados. E o setor industrial que mais utilizou processos de biotransformação foi o farmacêutico (Figura 13).

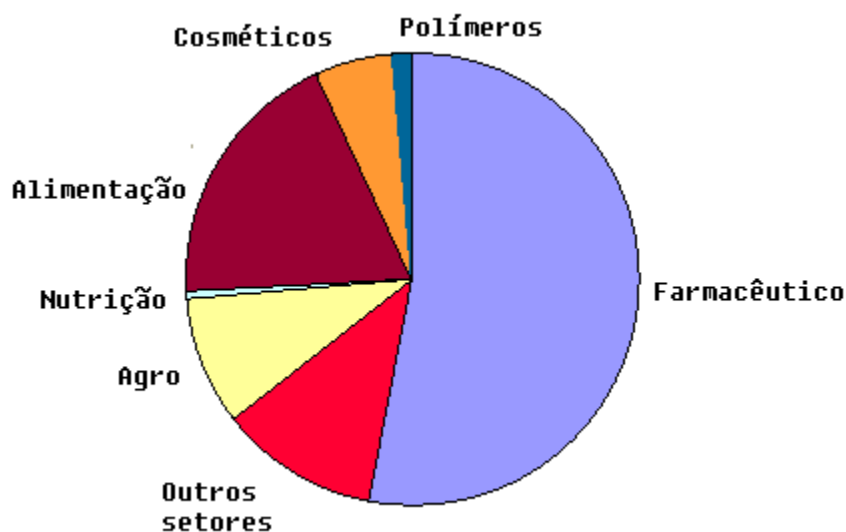


Figura 13. Setores industriais que mais utilizam processo de biotransformações nos últimos anos (STRAATHOF et al., 2002).

Novos métodos de síntese assimétrica, e cromatografia em suporte quirais poderão ser utilizados no processo da biocatálise. Segundo Turner (1998) biotransformação é uma ferramenta da tecnologia quiral.

Existem duas classes principais de biotransformação: de células inteiras e enzimas:

- Células inteiras: são biotransformações geralmente baratas, mas e necessária experiência em técnicas microbiológicas. O isolamento do produto é complicado pela presença da biomassa e reações colaterais, incluindo o metabolismo do substrato. Além disso, são necessários grandes volumes na reação para biotransformar pequenas quantidades de material.
- Enzimas: devido às enzimas serem mais seletivas, essa biotransformação exige aparelhos mais simples, podem ser executado em soluções mais concentradas ou solventes orgânicos.

As novidades para área de biotransformação pode ser assustadoras pelas dificuldades aparentes colocadas por técnicas desconhecidas. Mas são técnicas muito simples na maioria das vezes (RODAK, 2002; STRAATHOF, PANKE, SCHIMID, 2002).

A principal vantagem da biotransformação abiótica sobre catalisadores assimétricos é que o processo pode aproveitar os vastos recursos disponíveis em

biotecnologia. Estes incluem a otimização da atividade enzimática por sites seletivos, a transferência de genes de alta produtividade em organismos, superexpressão e pela incorporação de um promotor para o gene. Um exemplo de expressão heteróloga é a transferência do gene do patógeno *Acinetobacteria sp* para a ciclohexanona mono-oxigenase, que permitiu a enzima tornar-se comercialmente disponível (KELLY, 1998; SHAW, KAREM, KIENER, 2003).

Organismos para biotransformação podem ser conseguidos facilmente, por exemplo, leveduras são vendidas em supermercado. Amostras de microorganismos podem ser adquiridas em Agar inclinado a baixos custos ou doação a partir de coleções de culturas de microbiologistas. Deve-se ter cuidado ao manusear esses microorganismos, pois alguns são patogênicos. As técnicas de cultura são bastante simples, e estágios com microbiologista pode ajudar os químicos nesta área (KELLY, 1998; GIRI, 2001; SHAW, KAREM, KIENER, 2003; HUTCHINSON, 2005).

Enzimas degradam com o tempo e a forma de armazenamento e muito importante. A reatividade da enzima é profundamente influenciada pelas condições de reação, o controle do pH é muito importante para atividade máxima da enzima. Um dos problemas da biotransformação de substratos naturais é que o substrato freqüentemente é apenas ligeiramente solúvel em água, e a maioria das enzimas tolera baixa concentração de etanol ou isopropanol como co-solvente, sem efeito sensível na reatividade (KELLY, 1998; HIROSE, 2002; BISELLI, KRAGL, WANDREY, 2002).

Microorganismos contem enzimas com diferentes estruturas, responsáveis por catalisar diversas reações. As enzimas podem ser classificadas dentro de seis categorias principais de acordo com os tipos de reações que catalisam, conforme pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2: Classificação das enzimas utilizadas em reações de biocatálise e percentagem de utilização.

Classe	Número	Tipo de Reação	Utilização
Oxidoreduases	650	Oxidação-redução: oxigenação de C-H, C-C, C=C	25 %
Transferases	720	Transferência de grupos aldeídos, cetônicos, acil, metil	5 %
Hidrolases	636	Hidrólises com formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, anidridos, glicosídeos, nitrilas	65%
Liasas	255	Adição-eliminação de moléculas C=C, C=N, C=O	5%
Isomerases	120	Isomerização, racemização, epimerização	1%
Ligases	80	Formação-clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C	1%

Fonte: FABER (2000)

Monoterpenos estão amplamente distribuídos na natureza, constituem precursores adequados de substratos, matérias-primas que são ideais para produção biotecnológica dos produtos aromáticos naturais. Na verdade, muitos dados sobre biotransformação de terpenos por ambos os fungos e bactérias são publicados. No entanto, a maioria dos estudos descritos sobre biotransformação de monoterpenos tem sido mais acadêmica, e ainda tem descrito processos de biotransformação comercializados (DEMYTTENAERE, KIMPE, 2001).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as potencialidades da biotransformação do monoterpeno, (R)-(+)-carvona e (S)-(-)-carvona utilizando como biocatalisadores os fungos filamentosos *Penicillium citrinum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* e *Fusarium oxysporum* com vistas a prospecção de transformações de moléculas de interesse farmacêutico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar a bioconversão da (-)-(R)-carvona e (+)-(S)-carvona por fungos filamentosos: *Penicillium citrinum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* e *Fusarium oxysporum*;
- Caracterizar os produtos de metabolização da reação de biotransformação por 96h por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 FUNGOS UTILIZADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO

As cepas dos fungos utilizados na biotransformação foram obtidas a partir do Laboratório de Coleção de Culturas de Fungos, por doação da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição das cepas de fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma sp*, número de registro na coleção FIOCRUZ e meios de cultivo específicos.

Fungo	Descrição	Meios de cultivo específico
<i>Aspergillus niger</i>	2011 – NCTC 779 OM Type Cultures	Sabouraud, MGYP
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Isolado de plantas de milho *	Sabouraud, MGYP
<i>Fusarium oxysporum</i>	4251- IOC vegetal OM BA	BDA, MGYP
<i>Penicillium citrinum</i>	4150 – NRRL 5927 ATCC 28752 INCQS 40011 vegetal OM	BDA, MGYP
<i>Trichoderma sp</i>	Isolado da areia em São Conrado, RJ *	MYG, MGYP

Fonte: BRASIL (2005). \* da coleção FIOCRUZ sem número registro na coleção.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

Para o cultivo dos fungos filamentosos analisados foram utilizados os meios de cultivo Sabouraud sólido (40g glicose, 10g peptona, 10mg sulfato de cobre, 15g Agar, água destilada q.s.p 1L); BDA sólido (20g glicose, 20g Agar, caldo de 200g batata água destilada q.s.p 1L); MYG sólido (5g extrato de malte, 2,5g extrato de levedura, 10g glicose, 20g Agar, água destilada q.s.p 1L); MGYP líquido (3g extrato de malte, 10g glicose, 3g extrato de levedura, 5g peptona, água destilada q.s.p 1L) e meio Agar/água (18 gramas de Agar para cada 1 L ). Estes meios foram utilizados

para a manutenção dos fungos seletivamente (Tabela 4) e o meio MGYP líquido utilizado para os ensaios de biotransformação.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

Para a manutenção e verificação de pureza os fungos foram repicados em meio BDA, e incubados por 7 dias a 27°C (FRANCINE et al, 2005, CIRILO et al, 2005, 48-51). Após o repique inoculou-se os fungos sob temperatura de 27°C por 7 dias em meio Aguar/Água, afim de se eliminar qualquer contaminante. Após o crescimento foram feitos repiques nos meio específico para cada fungo (Tabela 3) a temperatura de 27°C por 7 dias.

Durante os 7 dias o crescimento radial de cada fungo foi observado e medido com régua milimetrada para posterior avaliação do tempo de crescimento médio das culturas em cada meio específico. Com base nesses resultados convencionou-se o tempo adequado de crescimento para cada fungo para ser utilizado em meio líquido. Após esse período de crescimento os fungos foram conservados em meio BDA sólido em geladeira a 4-5° C.

### 4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 4.4.1 Substrato

Para o estudo das reações de biotransformação foram utilizados a enantiômeros da carvona dos da marca Firmenich, a (R)-Carvona (Lote: BR1005648, Ref.: B10), e a (S)-carvona (Lote: 7J0042, Ref.: G06) (Figura 14).

O substrato foi preparado para ser adicionado ao meio de cultura MGYP na concentração de 30 mg/mL, sendo utilizado o álcool etílico P.A como solvente.

No ensaio de biotransformação foram utilizados cultivos frescos dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.* Cada fungo foi inoculado em erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido MGYP e crescido por 96 horas em agitador tipo “shaker” 180 rpm,

mantidos sob temperatura entre 26°-30°C. Foram inoculados 3 erlenmeyer para cada fungo.

Após as 96 horas de crescimento foi adicionado 1 mL do substrato, preparado como descrito acima. Foram utilizados 3 tratamentos sendo que T1 fungo crescido por 96h + (-)-(R)-carvona (frascos, T2 fungo crescido por 96h + (+)-(S)-carvona e Tc o controle contendo somente o fungo crescido sem substrato, para cada fungo estudado perfazendo 15 tratamentos (Figura 15). Esse sistema foi mantido por mais 96h nas mesmas condições acima citadas

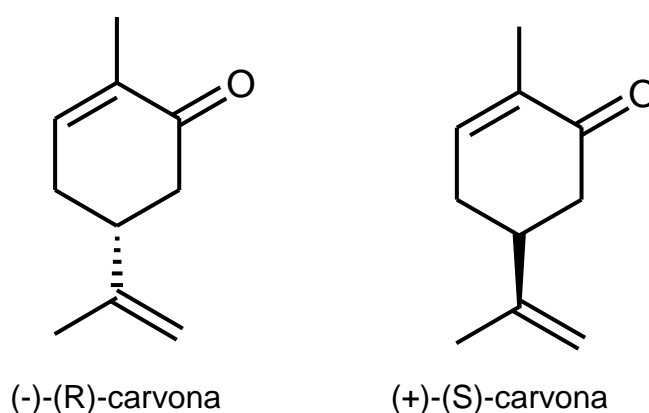


Figura 14. Produtos utilizados nas reações de biotransformações.

Tabela 4. Enumeração dos erlenmeyers

Numeração utilizada	Fungos
1	<i>Penicillium citrinum</i> + (S)-carvona- (T2)
2	<i>Penicillium citrinum</i> + (R)-carvona (T1)
3	<i>Penicillium citrinum</i> controle (Tc)
4	<i>Fusarium oxysporum</i> controle
5	<i>Fusarium oxysporum</i> + (R)-carvona
6	<i>Fusarium oxysporum</i> + (S)-carvona
7	<i>Aspergillus ocharacheus</i> controle
8	<i>Aspergillus ocharacheus</i> + (R)-carvona
9	<i>Aspergillus ocharacheus</i> + (S)-carvona
10	<i>Aspergillus niger</i> controle
11	<i>Aspergillus niger</i> + (R)-carvona

---

12	<i>Aspergillus niger</i> + (S)-carvona
13	<i>Trichoderma sp</i> controle
14	<i>Trichoderma sp</i> + (R)-carvona
15	<i>Trichoderma sp</i> + (S)-carvona

---

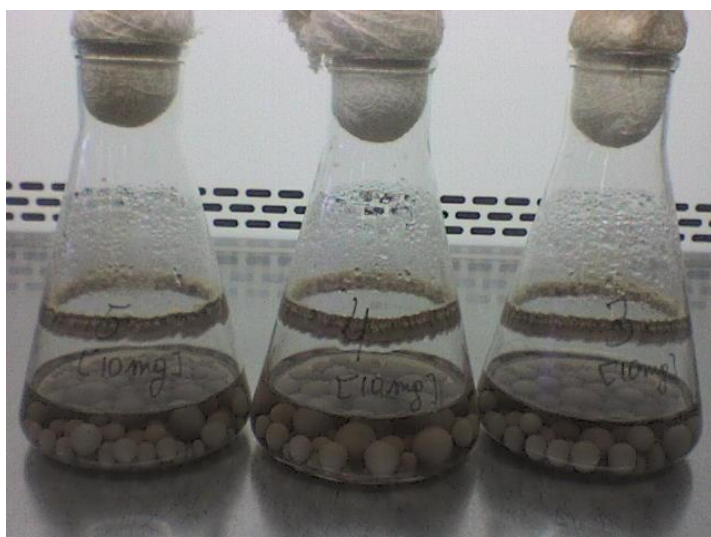


Figura 15. Frascos contendo as culturas crescidas por 96h em meio MGYP líquido contendo o fungo *Fusarium oxysporum*.

Depois da adição dos substratos foram coletadas amostras de 2 mL de cada frasco na zero hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. A coleta foi realizada com auxílio de micropipeta volumétrica de 1000 $\mu$ L em tubos de microcentrífuga, em câmara de fluxo laminar e armazenados em freezer (4°C) para posterior análise.

#### 4.4.2 Identificação dos produtos biotransformados

##### 4.4.2.1 Preparo das amostras

As alíquotas retiradas dos ensaios da biotransformação da carvona juntamente com a amostra do ultimo dia de crescimento micelial (192h), estas foram utilizadas para as análises cromatográficas. Estas forma extraídas com acetato de

etila, em três frações, usando 2 mL da alíquota na proporção (1:2) constituindo a amostra a ser analisada. A parte orgânica foi armazenada para posteriores análises e a parte aquosa foi autoclavado e posteriormente desprezado.

#### 4.4.2.2 Análise por CCD

Antes de submeter às amostras a análise por cromatografia gasosa, as amostras extraídas com acetato de etila (descrito acima) foram analisadas por cromatografia CCD (Cromatografia por Camada Delgada), usando como eluente na proporção de 1:10 (metanol:hexano) e revelado com iodo.

#### 4.4.2.3 Análise por cromatografia gasosa

As amostras extraídas com acetato de etila foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria quadrupolar de massas. O equipamento utilizado foi o CG-EM, modelo QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (30m × 0,25 mm × 0,25 µm; filme de 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu, Kyoto, Japão), mantendo-se um fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup> de hélio, como gás de arraste, e aquecimento com temperatura programada (60°C até 246°C com um gradiente de 3°C.min<sup>-1</sup> e, em seguida, até 270°C com um gradiente de 10°C.min<sup>-1</sup>, mantendo-se uma isoterma de 5 min). A energia ionização do detector foi mantida em 70 eV, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 µL diluída em acetato de etila. A análise foi conduzida no modo varredura com 1 scan.s<sup>-1</sup>, com um intervalo de massas de 40-600 *m/z* e uma razão de split de 1:20. A análise quantitativa foi obtida pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC).

#### 4.4.2.4 Identificação dos espectros de massa obtidos por CG-MS

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por comparação (automática e manual) dos espectros de massas com os da biblioteca digital NIST (1998), além da comparação dos espectros de massas e Índices de Retenção (IR) com os da literatura (ADAMS, 2007). Os Índices de Retenção foram calculados

através da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos lineares C<sub>8</sub>–C<sub>32</sub> (Sigma, USA) e com aplicação da equação de van Den Dool e Kratz (1963).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

Para se determinar o período adequado para manter os fungos em crescimento até se obter uma quantidade significativa de massa micelial para biotransformação. Esse estudo buscou observar a fase estacionária de crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.*. Foi realizado em meio sólido para posterior extrapolação para o meio líquido.

Durante o crescimento dos fungos em meio sólido (Tabela3) o crescimento foi avaliado pela medida do raio do crescimento das colônias (Tabela5).

Tabela 5: Medida do raio de crescimento de colônias dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.*, crescidos de 0 a 168 horas.

Tempo (h)	Raio das colônias em mm				
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
0	0	0	0	0	0
24	1,25	3	6	1,25	1
48	3,75	9,5	28,5	6,25	3,75
72	5	15	38,5	13	7,25
96	5,5	24,75	A	22,25	10,75
120	6	27,25	A	31,5	14,5
144	6	29,5	A	37	17,25
168	6	30,75	A	38,5	20,25

<sup>a</sup>crescimento em toda a placa;

Com esses dados pode se calcular o gráfico do crescimento dos fungos em função do tempo (Figura 16).



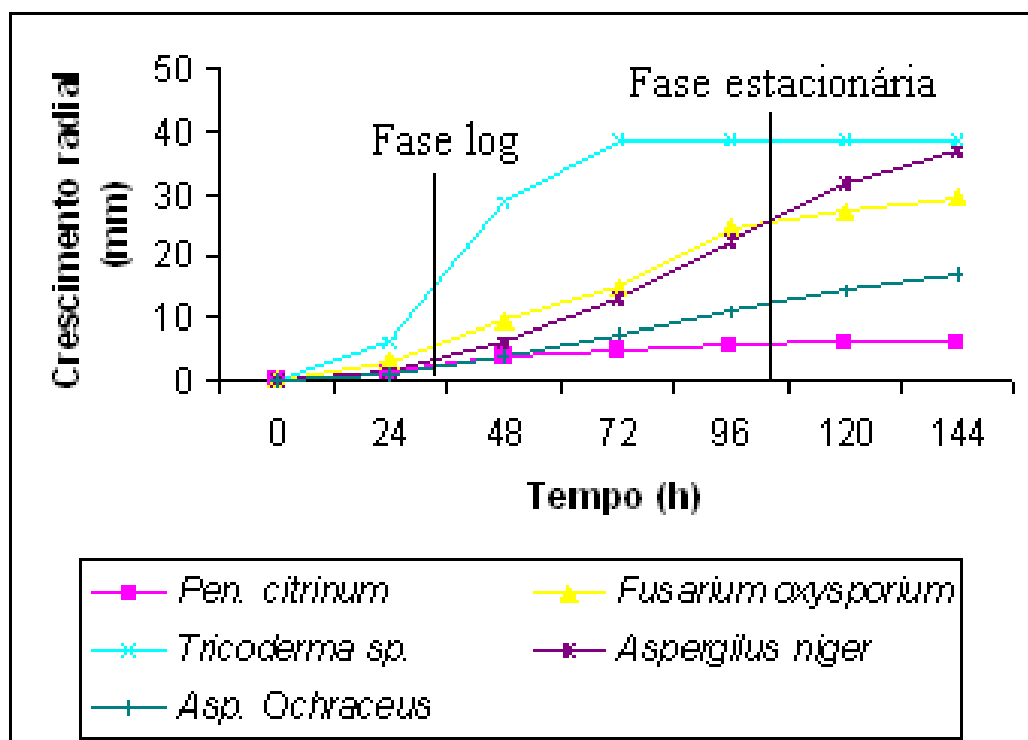


Figura 16. Gráfico da curva de crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.*, em meio solido na fase log e estacionária de crescimento.

A partir desse ensaio exploratório foi possível concluir que a fase log se inicia em media 24 horas após a inoculação, para os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.*. E que a fase estacionária se inicia com 72 horas para o fungo *Trichoderma sp* e *Penicillium citrinum*, e para os demais fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* se inicia após as 96 horas de crescimento. Com base nestes dados definiu se 96 horas para o crescimento micelial, ou seja, após a inoculação espera se 96 horas para adicionar o substrato.

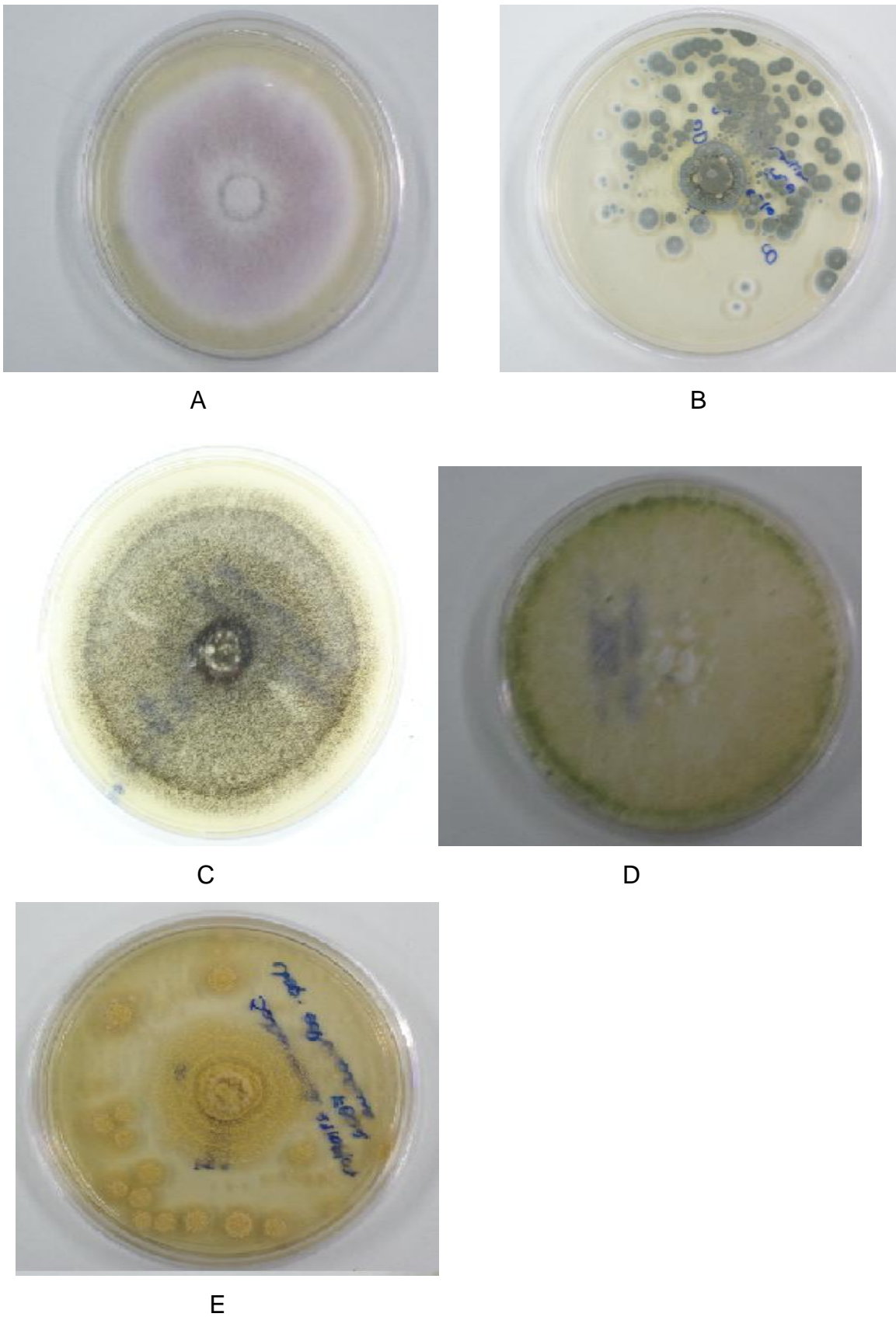


Figura 17. Fungos *Fusarium oxysporum* (A), *Penicillium citrinum* (B), *Aspergillus niger* (C), *Trichoderma* sp. (D), *Aspergillus ochraceus* (E) crescidos em meio sólido BDA.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS BIOTRANSFORMADOS

### 5.2.1 Análise por CCD

As análises das amostras coletadas do ensaio da biotransformação dos enantiômeros da carvona apresentaram uma grande variação de resultados quanto aos tipos de produtos.

Foi possível observar que houve formação de diferentes produtos nas amostras analisadas, dependendo dos substratos e do fungo utilizado (dados não mostrados). Foi possível também constatar que houve uma variação qualitativa de produtos para cada fungo dependendo da estereoquímica do substrato, sendo estes resultados inconclusivos e sem resolução.

Por este motivo foi realizada a análise das mesmas amostras por CG-MS.

### 5.2.2 Análise por CG-MS

Todas as amostras foram analisadas por CG-MS como descrito, sendo observada uma melhor resolução dos compostos formados. Nos espectros de massa obtidos para cada substrato submetido a biotransformação, em cada fungo, foram comparados (automática e manual) com dos espectros de massas da biblioteca digital NIST (1998). Além da comparação dos espectros e os Índices de Retenção (IR) com os da literatura (ADAMS, 2007). Os Índices de Retenção foram calculados através da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos lineares C<sub>8</sub>–C<sub>32</sub> (Sigma, USA) e com aplicação da equação de van Den Dool e Kratz (1963).

Esses dados serão discutidos de acordo com a biotransformação de cada carvona especificamente.

#### 5.2.2.1 (-)-(R)-carvona

Os produtos da biotransformação da (-)-(R)-carvona são majoritariamente compostos resultantes de redução da ligação dupla C=C do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, e da carbonila cetônica (produtos **24**, **25**, **27** e **28**) e um produto de

mecanismo desconhecido (composto **26**). Conforme esquematizado na tabela 6 e na figura 17.

Nenhum metabolito da carvona foi obtido na ausência de biomassa.

Tabela 6. Compostos de maior relevância da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelos fungos *Penicillium citrinum* (2), *Fusarium oxysporum* (5), *Aspergillus ochraceus* (8), *Aspergillus niger* (11), *Trichoderma sp.* (14).

Constituinte	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Amostras com seus respectivos produtos (em %)				
			2	5	8	11	14
Álcool fenetílico <sup>c</sup>	1111	-	-	-	-	-	2.1
neo-dihidrocarveol	1193	1193	97.5	97.0	99.0	96.8	78.9
trans-dihidrocarvona	1202	1200	-	-	-	2.4	-
2,4-dimetilbenzaldeído <sup>c</sup>	1212	-	-	1.1	-	0.8	-
iso-dihidrocarveol	1214	1212	2.5	1.1	1.0	-	-
Neoiso-dihidrocarveol	1227	1226	-	0.8	-	-	-
Carvona	1241	1239	-	-	-	-	19.0

<sup>a</sup> Índice de retenção calculado (van Den Dool & Kratz, 1963). <sup>b</sup> Índice de retenção da literatura (Adams, 2007). <sup>c</sup> Biblioteca digital NIST (2008). <sup>d</sup> 168(5), 140(5), 127(11), 111(16), 97(27), 83(36), 73(41), 55(100) 43(45), 41(30).

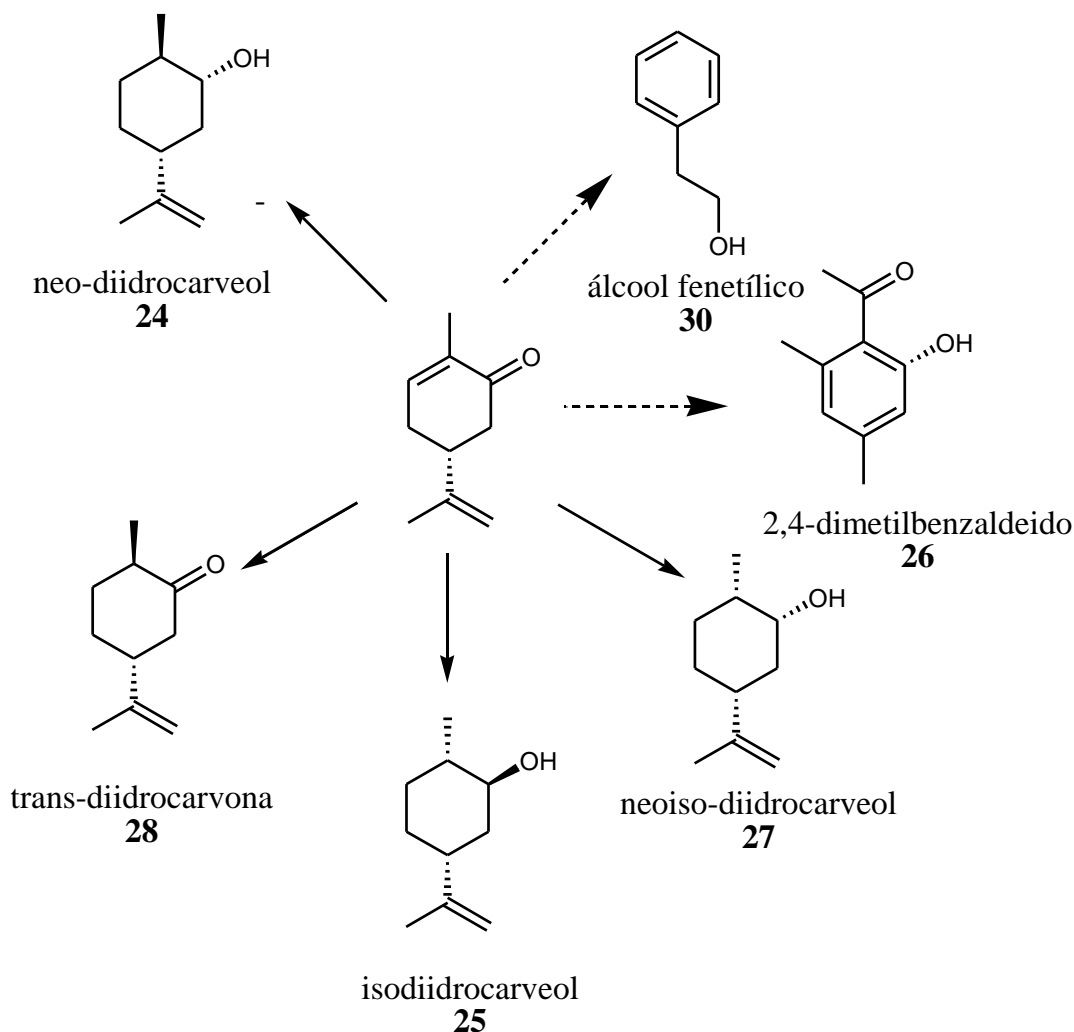


Figura 18. Produtos da biotransformação da (-)-(R)-carvona

O fungo *Penicillium citrinum* biotransformou (-)-(R)-carvona, consumindo todo substrato, obtendo 2 produtos, identificados como **24** e **25**, na proporção de 97,5% do produto **24** e 2,5% do produto **25** (Tabela 6, figura 19).

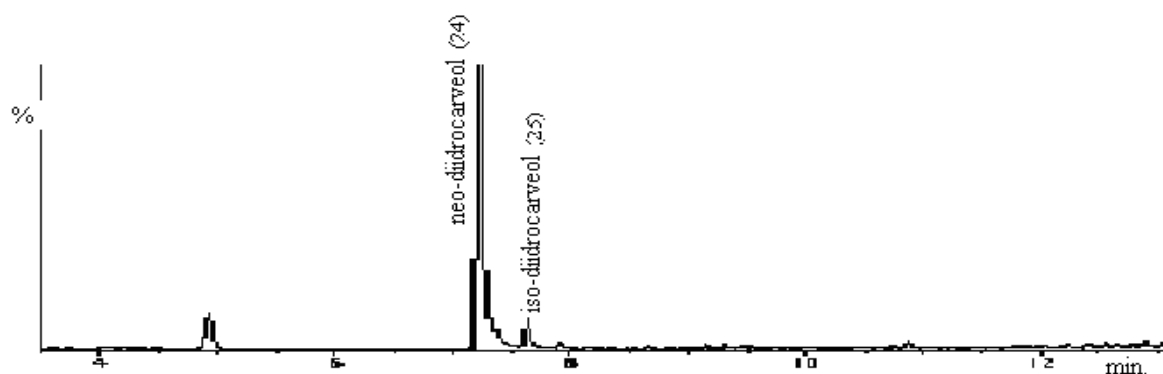


Figura 19. Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Penicillium citrinum*.

O fungo *Fusarium oxysporum* biotransformou (-)-(R)-carvona, consumindo todo substrato, obtendo os produtos **24**, **25**, **27** e **26**. Na proporção de 97,0% para o produto **24**, 1,1% para o produto **25**, 0,8% para o produto **27** e 1,1% para o produto **26** (Tabela 6, figura 20).

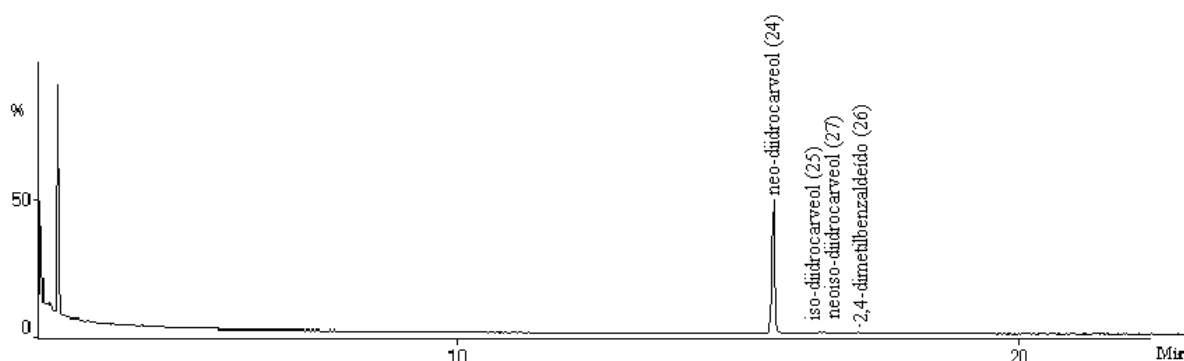


Figura 20. Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

O fungo *Aspergillus ochraceus* biotransformou (-)-(R)-carvona, consumindo todo substrato, obtendo os produtos **24** e **27**. Na proporção 99,0% para o produto **24** e 1,0% para o produto **27** (Tabela 6, figura 21).

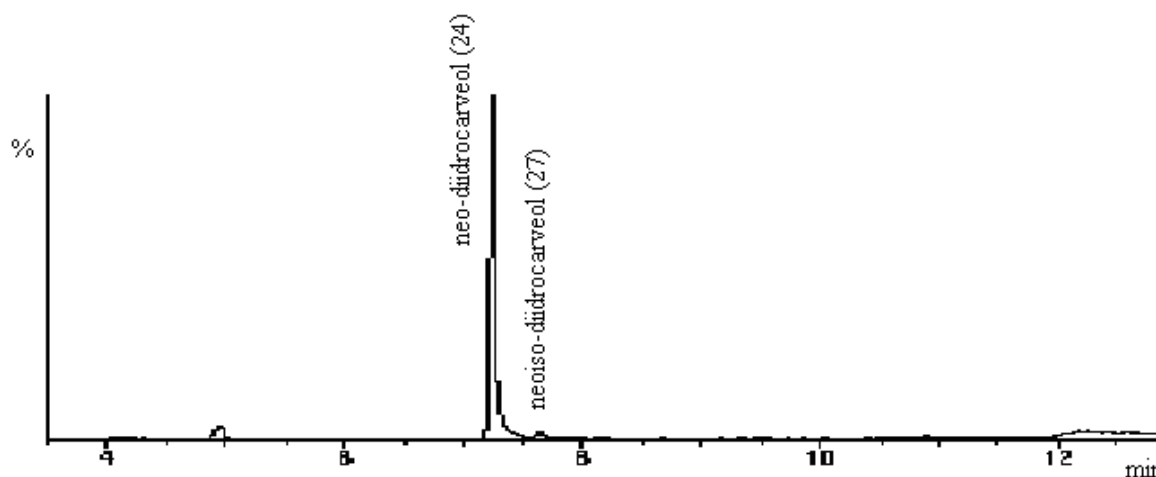


Figura 21. Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Aspergillus ochraceus*.

O fungo *Aspergillus niger* biotransformou (-)-(R)-carvona, consumindo todo substrato, obtendo os produtos **24**, **28** e **26**, na proporção de 96,8% para o produto **24**, 2,4% para o produto **28** e 0,8% para o produto **26** (Tabela 6, figura 22).

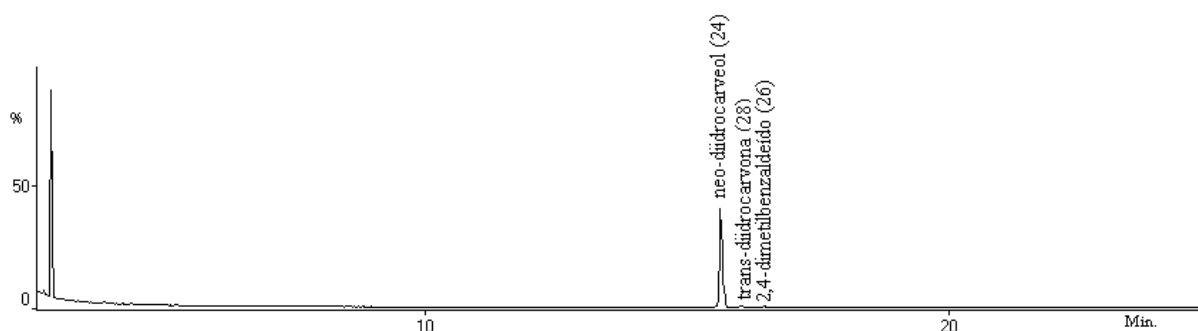


Figura 22. Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Aspergillus niger*.

A biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Trichoderma sp* não foi quantitativa. Obtendo ainda 19,0% do substrato inalterado. O composto **24** (rendimento 78,9%) foi o principal metabolito obtido, e como metabolito minoritário o álcool fenetílico **30** (2,1%) (Tabela 6, figura 23).

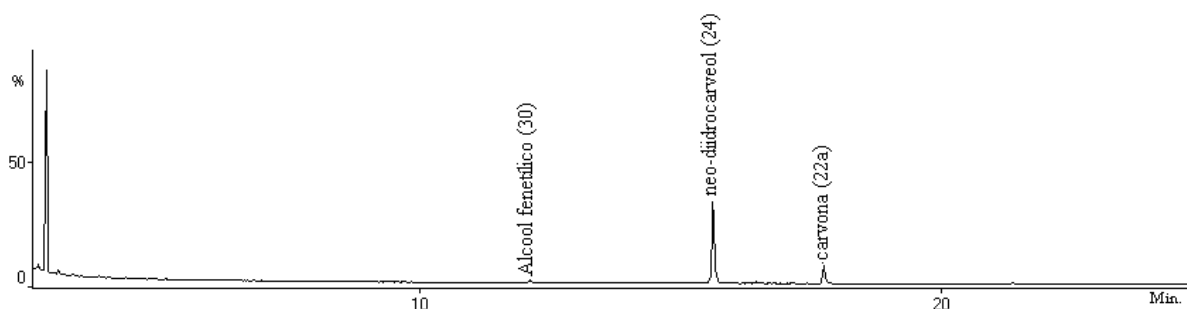


Figura 23. Cromatograma da biotransformação da (-)-(R)-carvona pelo fungo *Trichoderma sp*.

#### 5.2.2.2 (+)-(S)-carvona

Os produtos da biotransformação da (+)-(S)-carvona são compostos resultantes de redução da ligação dupla C=C do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado e da carbonila cetônica (produtos **24**, **25**, **27**, **28** e **29**). Conforme esquematizado na tabela 7 e na figura 24.

Nenhum metabolito da carvona foi obtido na ausência de biomassa.

Tabela 7. Compostos de maior relevância da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelos fungos *Penicillium citrinum* (1), *Fusarium oxysporum* (6), *Aspergillus ochraceus* (9), *Aspergillus niger* (12), *Trichoderma sp.* (15).

Constituinte	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Amostras com seus respectivos produtos (em %)				
			1	6	9	12	15
álcool fenetílico <sup>c</sup>	1111	-	-	-	-	-	4.4
neo-dihidrocarveol	1193	1193	25.9	18.0	15.0	24.3	17.2
trans-dihidrocarvona	1202	1200	12.5	-	11.8	10.5	27.8
2,4-dimetilbenzaldeído <sup>c</sup>	1212	-	-	-	-	-	-
iso-dihidrocarveol	1214	1212	40.8	59.3	33.5	60.2	5.3
neois-dihidrocarveol	1227	1226	20.8	15.9	28.9	5.0	16.0
Carvona	1241	1239	-	-	10.8	-	29.3
acetato de neoiso-dihidrocarveol	1356	1356	-	2.5	-	-	-
desconhecido <sup>d</sup>	1692		-	4.3	-	-	-

<sup>a</sup> Índice de retenção calculado (van Den Dool & Kratz, 1963). <sup>b</sup> Índice de retenção da literatura (Adams, 2007). <sup>c</sup> Biblioteca digital NIST (2008). <sup>d</sup> 168(5), 140(5), 127(11), 111(16), 97(27), 83(36), 73(41), 55(100) 43(45), 41(30).



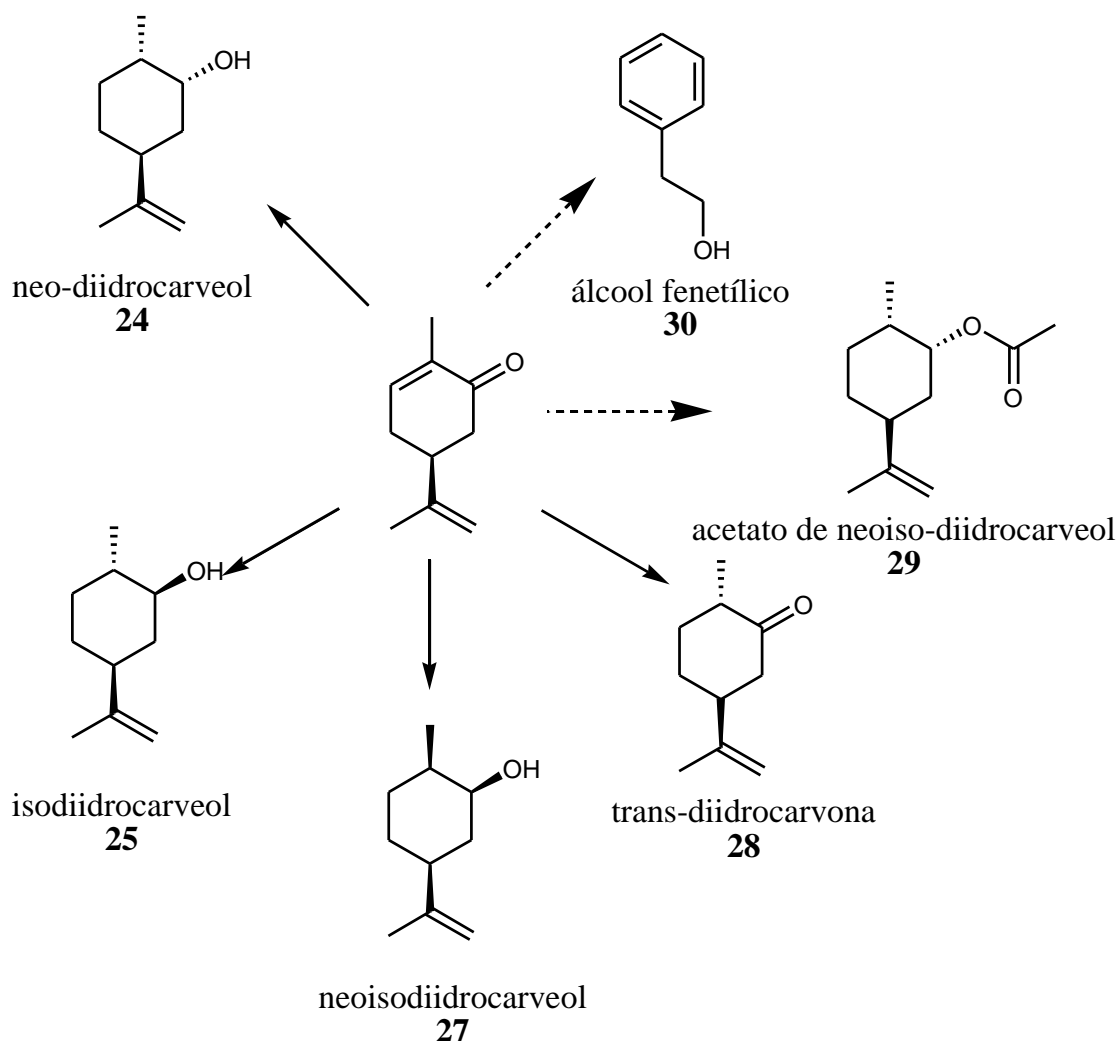


Figura 24. Produtos da biotransformação da (+)-(S)-carvona.

O fungo *Penicillium citrinum* biotransformou (+)-(S)-carvona, consumindo todo substrato, obtendo os produtos **24**, **25**, **27** e **28**. Nas proporções, 25,9% do produto **24**, 12,5% do produto **28**, 40,8% para o produto **25** e 20,8% para o produto **27** (Tabela 6, figura 25).

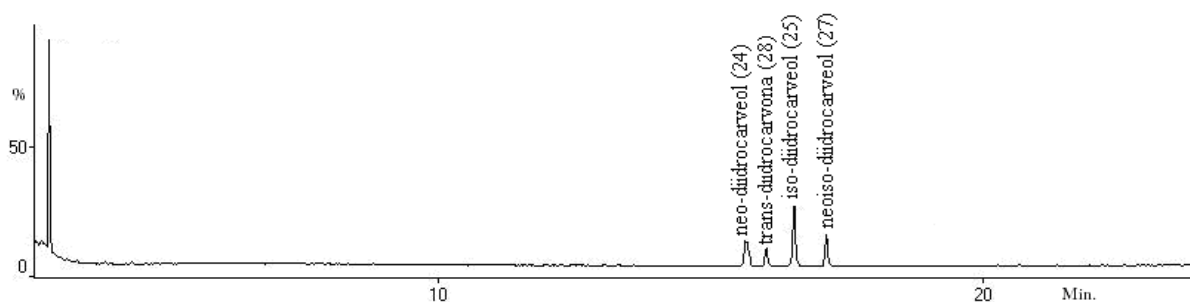


Figura 25. Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo *Penicillium citrinum*.

O fungo *Fusarium oxysporum*, consumindo todo substrato, obtendo os produtos **24**, **25**, **26** e **29**. Na proporção de 18,0% para o produto **24**, 59,3% para o produto **25**, 15,9% para o produto **27** e 2,5% (Tabela 6, figura 26).

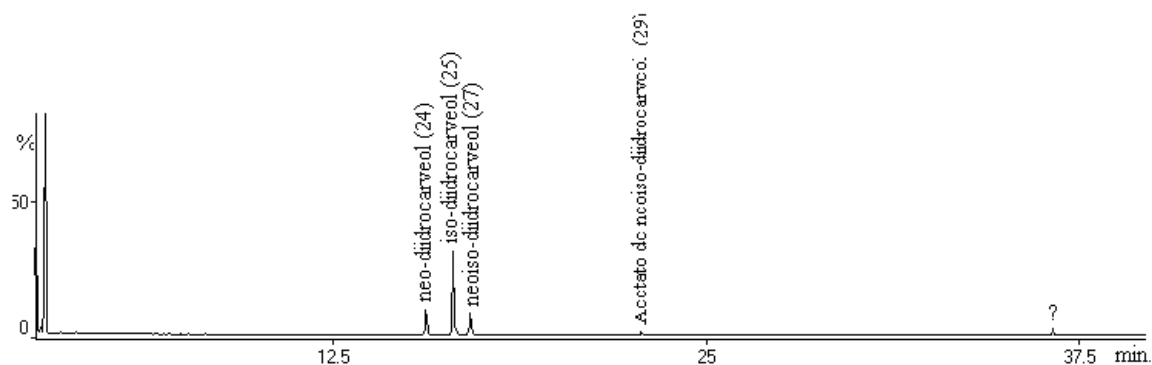


Figura 26. Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

O fungo *Aspergillus ochraceus*, não consumiu todo substrato, obtendo os produtos **24**, **25**, **27** e **28**. Na proporção 15,0% para o produto **24**, 33,5% para o produto **25**, 28,9% para o produto **27** e 11,8% para o produto **28** (Tabela 6, figura 27).

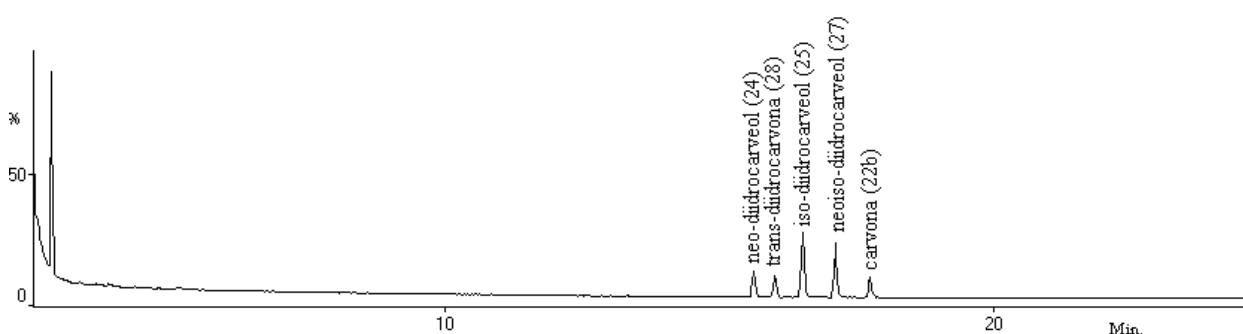


Figura 27. Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo *Aspergillus ochraceus*.

O fungo *Aspergillus niger*, consumiu todo o substrato e obteve se os produtos **24**, **25**, **27** e **28**. Na proporção de 24,3% para o produto **24**, 10,5% para o produto **25**, 60,2% para o produto **27** e 5,0% para o produto **28** (Tabela 6, figura 28).

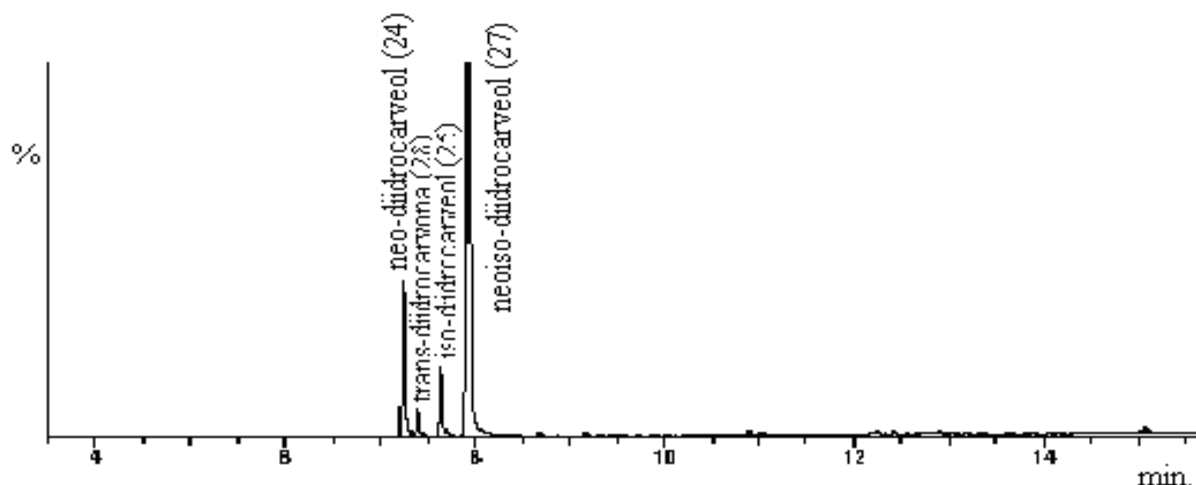


Figura 28. Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo *Aspergillus niger*.

O fungo *Trichoderma sp* obteve se os produtos **24**, **25**, **27**, **28** e **30**. Com rendimento na proporção de 17,2% para o produto **24**, 5,3% para o produto **25**, 16,0% para o produto **27**, 27,8% para o produto **28** e 4,4% para o produto **30**. Observou se também que 29,3% do substrato não foram consumidos. Temos ainda a produção de um possível metabolito secundário o álcool fenético (30) (Tabela 6, figura 29).

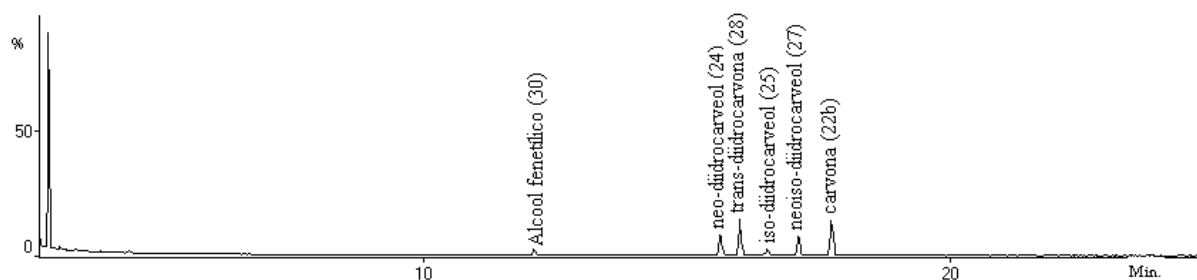


Figura 29. Cromatograma da biotransformação da (+)-(S)-carvona pelo fungo *Trichoderma sp*.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

Com base no estudo feito sobre o crescimento radial dos fungos filamentosos em meio sólido foi possível concluir que a fase log se inicia em média 24 horas após a inoculação, para os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.*. De acordo com Madigan (1999) os processos industriais onde se tem interesse nos produtos produzidos pelos fungos, deve-se manter os fungos na fase log ou estacionária, como é na fase estacionária que se tem a produção de enzimas, que são importantes na biotransformação optou-se por deixar os fungos em crescimento sem o substrato até o início da fase estacionária que para os fungos analisados acontece com 96 horas.

Com isso adotou-se 96 horas de crescimento para os fungos em meio líquido sem adição do substrato, pois com 96 horas de crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, e *Trichoderma sp.* em meio líquido, possui quantidade de micélio suficiente para a biotransformação, onde os fungos estão no início da fase estacionária, ou seja, já possuem enzimas que são essenciais no processo de biotransformação.

### 6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS BIOTRANSFORMADOS

A biotransformação via redução assimétrica de alcenos ativados usando cultura de células de microorganismos ricas em enoato redutase é um processo intrigante. A enoato redutase é uma enzima Flavina Mononucleotídeo (FMN)-dependente pertencente a família OYE (“old yellow enzyme”) a qual cataliza a redução assimétrica de duplas ligação eletronicamente ativada. Possuindo substituintes retiradores de elétrons, como a carbonila. A reação procede de acordo com a adição anti do hidreto do cofator flavina para o carbono  $\beta$  e o próton do resíduo tirosina é derivado do solvente para o carbono  $\alpha$ . O ciclo catalítico das

enonas redutase é completado pela redução da flavina oxidada pelo NADPH, o qual é derivado de um doador externo de próton via outra reação redox.

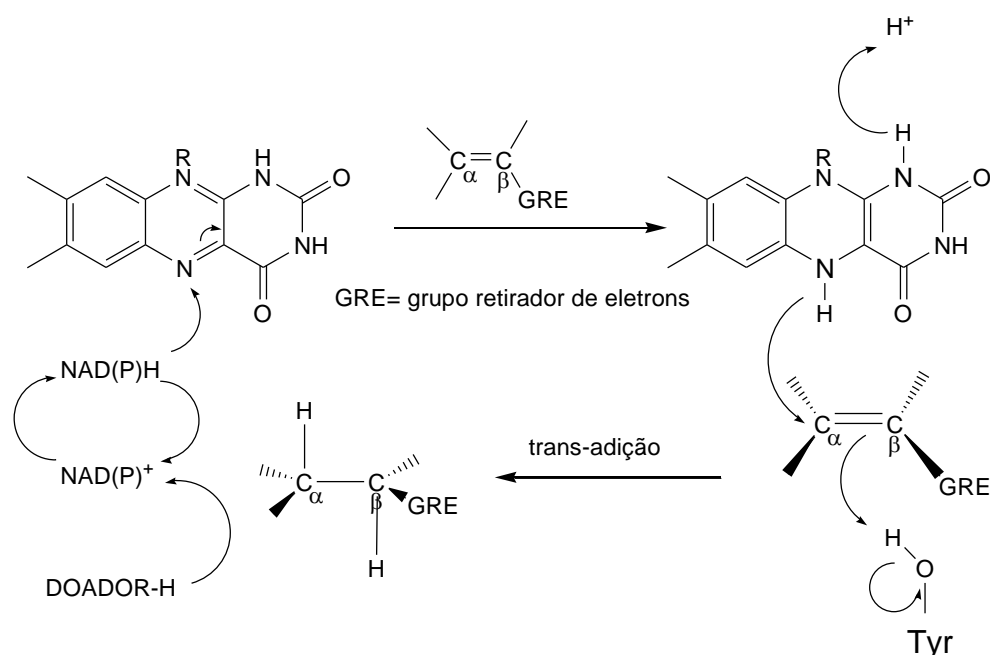


Figura 30. Enoato redutase.

Essa redução é estritamente trans específica. E se assemelha a uma adição de Michael assimétrica do hidreto para a enona, como consequência, dupla ligação não ativada como a ligação dupla do radical isopropilideno da carvona, são não reativas.

Dados da literatura reportam que grande parte de substratos podem ser reduzidos por enonas redutases de microorganismos. Aldeídos e cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturados, como da carvona, são exemplos destes substratos.

A variabilidade do substrato depende do tamanho e forma do sítio ativo. A especificidade enantiomérica da enona redutase varia de acordo com o tipo de enzima, e é influenciada pela posição  $\alpha$  e  $\beta$  do carbono do centro quiral presente no substrato.

A capacidade de catalisar a redução da (-)-(R)-carvona e da (+)-(S)-carvona foi alta para os fungos *Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp* utilizados neste estudo.

Na biotransformação da (-)-(R)-carvona obteve o produto neo-diidrocarveol com rendimento superior a 95% para todos os fungos filamentosos estudados e ainda a produção do produto iso-diidrocarveol com rendimento inferior a 5% e

neiso-diidrocarveol com rendimento inferior a 2%. Para a (+)-(S)-carvona obteve-se como produto o neo-diicarveol, iso-diidrocarveol, neiso-diidrocarveol e trans-diidrocarvona, com rendimento equivalente. Obteve se ainda com rendimento não significativo o acetato de neiso-diidrocarveol.

A redução da carvona, provavelmente pela ação de uma enoato redutase seguida da ação de uma carbonil redutase mostrou se altamente estereoseletiva para a (-)-(R)-carvona, o que não foi observado para a (+)-(S)-carvona. Esses dados podem ser comparados com dados da literatura como na biotransformação da carvona por microalgas, e por microalgas marinhas onde obteve se produtos oxidados e reduzidos, pode se notar uma prevalência dos produtos de redução com a inserção estereosseletiva do hidrogênio a ligação C=C adjacente a carbonila (HOOK, RYAN, SHERIDAN, 2003; PINHEIRO & MARSAIOLI, 2007; GHASEMI, 2004); Na biotransformação da carvona por culturas de células de *Catharanthus roseus* pode se observar produtos de redução, após a redução da ligação  $\alpha,\beta$ -insaturada a carbonila e da redução da carbonila, alguns compostos foram hidroxilados, com hidroxilação régio- e estereosseletiva (HAMADA, 1997); Outra biotransformação com culturas de células de plantas foi com cultura de *Mentha piperita* onde também se obteve produtos de redução estereoespecificas (KIM, 2002); A biotransformação da carvona por microorganismo tem se também produtos de redução, e no estudo com leveduras *R. mucilaginosa* observou se a conversão da (S)-carvona em exclusivamente neisodiidrocarveol, com rendimentos notáveis. E para bactérias observou se novamente reduções das ligações C=C de compostos  $\alpha,\beta$ -insaturada de compostos carbonílicos, enantio e diastereoseletivas.

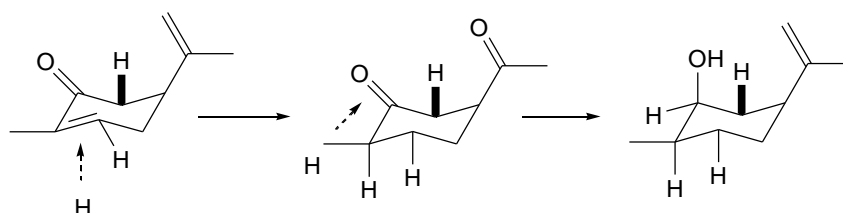


Figura 31. Estereoespecífico ataque do Hidrogênio na redução da dupla C-C e ao grupo carbonila da carvona.

Vale salientar ainda a especificidade dos fungos estudados para a produção de neo-diidrocarveol, visto que em estudos anteriores com culturas de células de plantas, microorganismos e microalgas, e ate mesmo fungos do tipo levedura, em

nenhum destes trabalhos pode se observar um rendimento superior a 95%, como obtido neste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

- A realização da curva de crescimento dos fungos possibilitou a definição do período de 96 horas de crescimento para os fungos antes da adição do substrato.
- Os experimentos de (R)-(-)-Carvona e (S)-(+)-carvona com os fungos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* consumiram todo o substrato em 96 horas, enquanto os fungos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus ochraceus* não consumiram todo substrato restando ainda concentração que variam de 10 a 29%.
- O produto principal obtido na biotransformação da ( R)-(-)-Carvona foi neo-dihidrocarveol com rendimento superior a 95% para os fungos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma sp.* e *Aspergillus ochraceus*, e em menor concentração o iso-dihidrocarveol.
- Os produtos principais obtidos na biotransformação da (S)-(+)-Carvona foram iso-dihidrocarveol, neo-dihidrocarveol, neoiso-dihidrocarveol, trans-dihidrocarvona com rendimento equivalente para os fungos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma sp.* e *Aspergillus ochraceus*.
- Pode se notar ainda a formação em menor concentração de produtos que acredita não se tratar da biotransformação da carvona, tais como álcool fenílico, 2,4-dimetilbenzaldeído. E de um possível composto relacionado a biotransformação da carvona o acetato de neoiso-diidrocarveol.
- As reações de biocatalise que pode se observar foram todas reações de redução. As enzimas responsáveis por essa redução é a enoato redutase responsável pela redução da ligação C=C, e a carbonil redutase, responsável pela redução da carbonila.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, W. et al. Biocatalytic Asymmetric Hydroxylation of Hydrocarbons with the Topsoil-Microorganism *Bacillus megaterium*, *J. Org. Chem.*, v.65, n.3, p. 878-882, 2000.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois. 2007.

AGGARWAL, K. K. et al. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 17.p.59–63.2002

ARMSTRONG, D.W. et al. Flavor Chemistry. Trends and Developments. American Chemical Society. Washington. DC. 1989. pag.105.

BERGER, R. G. (Ed.). **Aroma biotechnology**. Springer-verlag. Berlin. p.240.1995.

BERGER, R.G., DRAWERT, F., TIEFEL, P. in: PATTERSON, R.L.S. et al. Biotransformation of Flavours. Royal Society of Chemistry. Cambridge.1992.pag.21.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Oswaldo Cruz. *Catálogo de linhagens Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos*. Rio de Janeiro, 2005.

CARVALHO, C.C.C.R., FONSECA, M.M.R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**. V. 95. Pag.413-422. 2006.

CIRILO, H.N.C. et al. Bioconversão de 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-N-[(1E,Z)-fenilmetileno]-acetoidrazona (LAssBio939), um potencial agente antiinflamatório sintetizado a partir do safrol. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, n.2, p.48-51, 2005. Disponível em: <[www.farmacia.ug.br](http://www.farmacia.ug.br)> acesso em: 20/09/2006.

CONTI, R., RODRIGUES, J.A.R., MORAN, P.J.S., Biocatálise: avanços recentes. *Química Nova*, v. 24, n.5, p. 672-675, 2001.

COSTA, et al.. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr* 1999;129(3): 775S–778S.

CRAMAROSSA, M. R. et al. Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria. **C. R. chimie**. Vol.8. p.849-852. 2005.

CUNHA, A. P., SILVA, A. P., ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Fundação Claouste Gul Benkian. 2ª Edição. P.386-533. 2006.

DEMIRCI, F. et al. Microbial transformation of (-)-carvone. 2001. Disponível em: <<http://www.znaturforsch.com/ac/v59c/s59c0389.pdf>>.

DEMYTTENAERE, J. C. R., KIMPE, N.D. Biotransformation of terpenes by fungi study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 11. pag.265-170.

DEMYTTENAERE, J.C.R. Biotransformation by microorganisms. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). *Studies in natural products chemistry*. Elsevier Science. Vol.25. p. 125. 2001.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products**. A biosynthetic approach. 3 Edition. Englan: John Wiley & Sons. 2009.

DUETZ, W. A.; FJALLMAN, A. H. M.; REN, S. Y.; JOURDAT, C., WITHOLT, B.. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. **Appl. Environ. Microbiol.**;vol.67, p.2829–2832, 2001.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Boca Raton: CRC. 1985.

FARNET, C.M., ZAZOPOULOS, E. Improving drug discovery from microorganisms. In: ZANG, L., DEMAIN, A.L.. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Huma press. Totowa. P.95-106. 2005.

FRANCINE, et al. Preparação de metabólitos fase I e II do derivado Nfenilpiperazínico (LASSBio 581 via bioconversão por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757, **Revista Eletrônica Farmácia**, v.2, n.2, p.157-160, 2005. Disponível em: <www.farmacia.ug.br > acesso em: 20/09/2006.

FRANZIOS, G. et al. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 45. p.2690–2694.1997

FULLER, R.W. et al. Isolation and structure activity features of halomonrelated antitumor monoterpenes from the red alga *Portieria hornemannii*. **J Med Chem**. Vol. 37.p.4407–4411. 1994.

FURA, A. et. al. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery, **J. Med. Chem.**, V.47, n.18, 2004, 4339-4350.

GHASEMI, Y. et al. Biotransformation of monoterpenos by *Oocystis pusilla*. **World j. microbial. Biotechnol**. Vol. 25. p.1301-1304. 2004.

GIRI, A., et al. Biotransformation using plant cells, organ culture and enzymes systems: current trends and future prospects. **Biotechnology advances**. Vol.19. p.175-199. 2001.

HAAG, J.D., GOULD, M.N. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. **Cancer Chem Pharm** . vol.34. p.477–483. 1994.

HABERMEHL, G.G., FIEGNER, W. Terpenes and their biological relevance. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. Elsevier Science. Vol.20. p.2-24. 1998.

HAMADA, H. et al. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-)-carvone by suspension cultured cell of *Cataranthus roseus*. **Phytochemistry**. Vol. 44.p.615-621. 1997.

HARBONE, J.B. **Phytochemical Methods**. A guide modern techniques of plants analysis. 2 Edition. London: Chapman and Hall. 1984.

HENRY, T., IWEN, P.C., HINRICHS, S.H.. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of clinical microbiology**. Vol. 38, n.4. 2000. pag.1510-1515.

HIROSE, Y. Production and isolation of enzymes. In: DRAUZ. K., WALDMANM, H. (Ed.). **Enzymes catalyses in organic synthesis: a comprehensive hand book**. 2<sup>th</sup> Edition. Wiley-VCH. P. 41-67. 2002.

HOLLAND, H.L. Organic synthesis with oxidativ enzymes. Weinheim:VCH. 1992.

HUTCHINSON, C. R. . Manipulating microbial metabolites for drug Discovery and production. In: ZANG, L., DEMAINE, A.L.. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Huma press. Totowa. P.77-95. 2005.

HOOK, S. L., RYAN, S., SHERIDAN, H. Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Phytochemistry**. Vol.63. p.31-36. 2003.

HUTCHINSON, C.R. . Manipulation microbial metabolites for drug discovery and production. In: ZANG, L., DEMAINE, A.L.. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Huma press. Totowa. P.77-93. 2005.

ISHIHARA, K. et al. Biotransformation using plant cultured cells. **Journal of molecular catalysis B: Enzimatic**. Vol. 23. p.145-170. 2003.

JANSSENS, L., PORTER, H.L., SCHAMP, N.M., VANDAMME, E.J. Production of flavour by microorganisms. **Process Biochemistry**. V. 27. pag.195-215. 1992.

KELLY, D. R.. Biotransformations – Pratical aspects. In: REHM, J.H., REED, G., KELLY, D.R. (Ed.). **Biotechnology: second completely revised edition**. Biotransformation I. vol. 8a. Wiley-VCH.p. 26-33.1998.

KIM, G.S. et al. Transformation of menthane monoterpenos by *Mentha piperita* cell culture. **Biotechnology letters**. Vol.24. p.1553-1556. 2002.

Kline, R. M., Kline, J. J., Di Palma, J., & Barbero, G. J. (2001). Enteric-coated, pH-dependent peppermint oil capsules for the treatment of irritable bowel syndrome in children. *The Journal of Pediatrics*, 138, 125–128.

*Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.15.p. 304-309. 2005.

LITTLE D.B, Croteau R. Biochemistry of essential oil plants: a thirty year overview. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (eds), *Flavor Chemistry: Thirty years of Progress*: Kluwer Academic/ Plenum, 1999.

LIU, S. Y., SHOKEN, M., ROSAZZA, J.P.N., Microbial Transformations of Clomazone, **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.313-319, 1996.

LOZA, T. H., Monoterpenes in essential oils-biosynthesis and properties. **Adv Exp Med Biol**. Volume 62. 1999.

LUNA, H. Biocalysis application for preparing intermediates for drug synthesis. **Rev. Soc. Quim. Mex.**. vol. 48. p.211-219.2004.

MADIGAN, M.T., et al. **Brock biology of microorganisms**. 9<sup>th</sup> Edition. Prrentice Hall. USA. 1999.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGDE, A. O. & BECKER, K. (1998). Comparative composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food chemistry** **62 (2)**: 207-215. evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical

MANDAL, D, AHMAD, A., KHAN, M.I., KUMAR, R. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium sp.* Disponível em: [www.elsevier.com/locate/molcata](http://www.elsevier.com/locate/molcata) acesso em: 13/10/2008.

McGEADY, P., WANSLEY, D. L., LOGAN, D. A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. **Journal of Natural Products**, 65, 953–955.2002.

MILLS, J.J. et al.. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Res.** Vol.55.p.979–983. 1995.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **Int. Microbiol.**, Vol. 4, 2001, pag. 1-4.

NAKASHIMA, T., et. al.. Production of bioactive compounds based on phylogeny in the genus *Penicillium* preserved at NBRC. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, Vol. 72, n.11, 2008, pag. 3051-3054.

National Institute of Standards and Technology *PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Data Base*. U. S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD.1998.

OLIVEIRA, F., AKISVE, M.K., AKISUE, G. Farmacognosia. Atheneu. 1998.

PAMDA, A.K. et al. Plant cell reactors - a perspective. **Enzyme micr. Technol.** vol.11. p.386-397. 1989.

PELCZAR, M. J., CHANG, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Volume II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PENTTILÄ, M., LIMÓN, C., NEVALAINEN, H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In: ARORA, D. K. (ed.). **Handbook of fungal biotechnology**. Second Edition, Marcel Dekker, New York, 2004.

PINHEIRO, L., MARSAIOLI, A. J.. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. Vol.44. p.78-86. 2007.

POTHULURI, J.V. et al. Biotransformation of Vinclozolin by the Fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.6138-6148, 2000.

RODAK, M.B., et al.. Application of fungi as biocatalysts for the reduction of diethyl 1-oxoalkylphosphonates in anhydrous hexane. **Biotechnol. Prog.** vol. 18. p.1287-1291. 2002.

ROHMER, M.. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Nat Prod Rep**. Vol.16. p.565–574. 1999.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. *et al*, **Farmacognosia**. Da planta ao medicamento. 6ª Edição. SC: editora da UFSC. 2007.

SCHILLING, B., HÄUSLER, A. Biotechnology in the food chain, VTT Symp. 125-177, 1997.

SCHREIER, P. in: WILLIAMS, A.A. et al. Biotransformation of Flavours. Royal Society of Chemistry. Cambridge.1992.pag.1.

SCRAGG, A. **Environmental biotechnology**. Second edition. Oxford. New York. P.230-266. 2006.

SELL, C. S. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Royal Society of Chemistry. 2003. pag. 65-96.

SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNER, E.. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in biotechnology**. Vol.23. p.193-198. 2005.

SHAW, N.M., KAREM, T.R., KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformation. **Advanced synthesis catalysis**. Vol. 345. p.425-435. 2003.

SIMÕES, C.M.O. *et al*, **Farmacognosia**. Da planta ao medicamento. 6ª Edição. SC: editora UFSC. 2007.

SOTOKAWA, T., NODA, T., PI, S., HIRAMA. M.. A three-step synthesis of halomon. **Angew Chem**. vol.39.p.3430–3432. 2000.

STAMMATI, A. *et al*. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food and Chemical Toxicology**. vol 37. p.813–823. 1999.

STRAATHOF, A.J.J., PANKE, S., SCHIMID, A. The production of fine chemical by biotransformation. **Current opinion in biotechnology**. Vol.13. p.548-556. 2002.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A. **Microbiologia**, 3ª Ed. São Paulo: Ateneu, 1996.

TURNER, M. K., Perspectives in biotransformation. In: REHM, J.H., REED, G., KELLY, D.R. (Ed.). **Biotechnology: second completely revised edition**. Biotransformation I. vol. 8a. Wiley-VCH. P.6-21.1998.

TURNER, M.K. Perspectives in biotransformations. In: KELLY, D. R. (Ed.). **Biotechnology second completely revised edition**. Volume 8a: biotransformação I. Alemanha. 1998. p. 6-21.



VAN DEN DOOL, V.D.H., KRATZ, P.D.J.A. (1963) Generalization of the Retention Index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography** **11**, 463-471.

VAN DYK, M. S. et al. Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeasts – like fungi. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**. Vol.5. p.149-154. 1998.

VARTAK, P. H., SHARMA, R. N.. Vapor toxicity and repellence of some essential oils and terpenoids to adults of *Aedes aegypti* (L) (Diptera, Culicidae). **Indian Journal of Medical Research Section Infectious Diseases**. Vol.97.p. 122–127. 1993.

VICKERY, M. L. & VICKERY, B. (1981). **Secondary Plant Metabolism**. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, Vol. 26, 390-400, 2003

VOIGT, K., SCHLEIR, S., BRUCKNER, B. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Cun. Genet.**, Vol. 27, 1995, pag.528-535.

WANG. G., TANG, W., BIDIGARE, R.R.. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. In: ZANG, L., DEMAIN, A.L.. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Huma press. Totowa. P.197-227. 2005.

WATTENBERG, L.W., SPARNINS, V.L., BARANI, G. Inhibition of N nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer Res**. Vol.49. p.2689–2692. 1989.

WILLIAMS, D. A., FOYE, W. O. & LEMKE, T. L. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

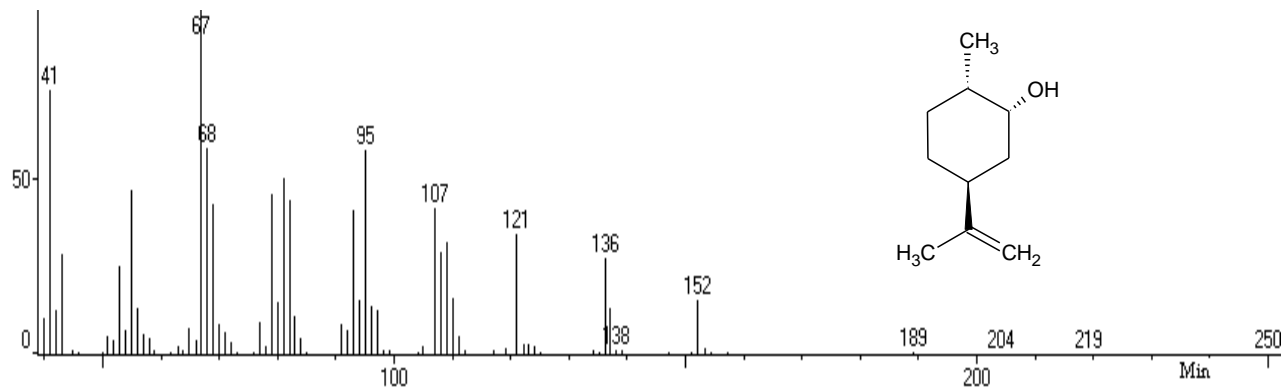
ZARATE, R. et al. Biotechnology for the production of plant natural products. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Bioactive natural products**. Elsevier Science. Vol.34. p.309-390. 2008.

ZHAN, J. et al., Microbiologica Metabolism of Artemisinin by *Mucor polymorphorus* and *Aspergillus niger*, *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1693-1695.

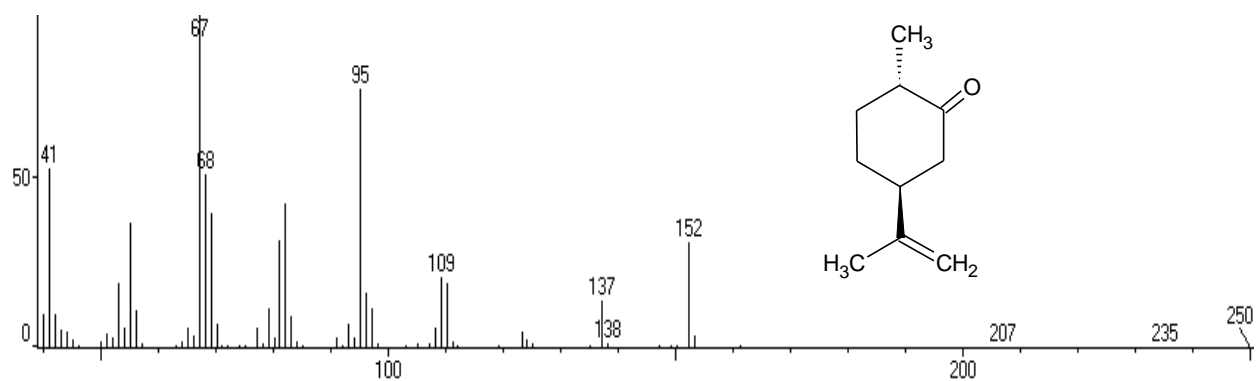
ZHANG, L., DEMAIN, A. L. **Natural Products: Drug discovery and therapeutic medicine**. Humana Press Inc. Totowa. 2005.

## ANEXO 1

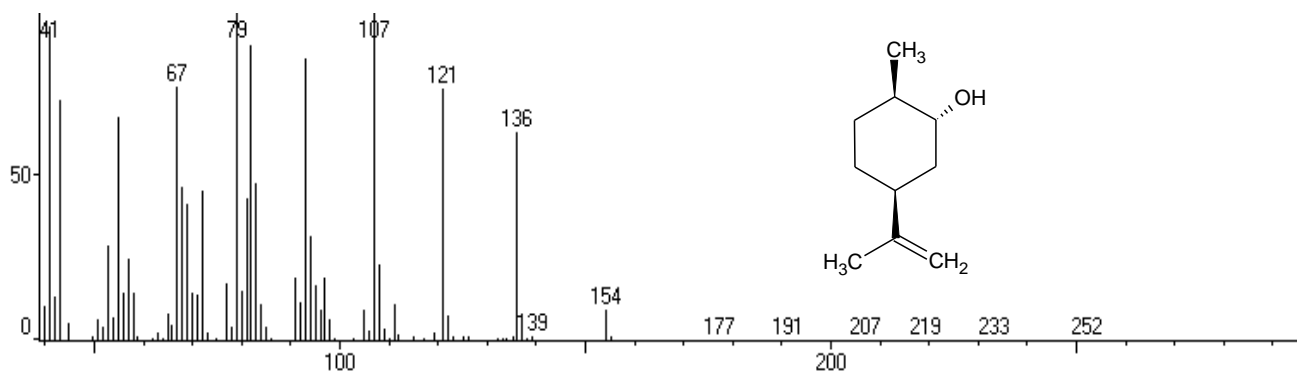
Segue em anexo os espectros de massa dos produtos biotransformados.



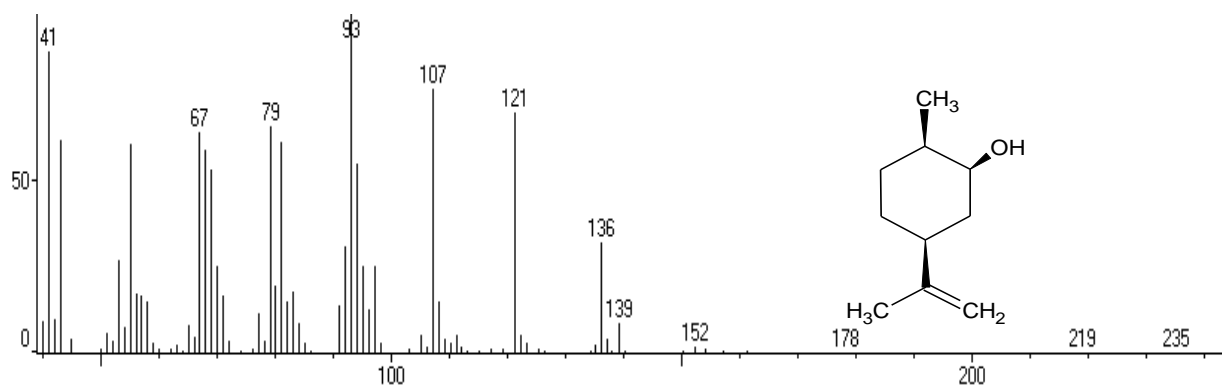
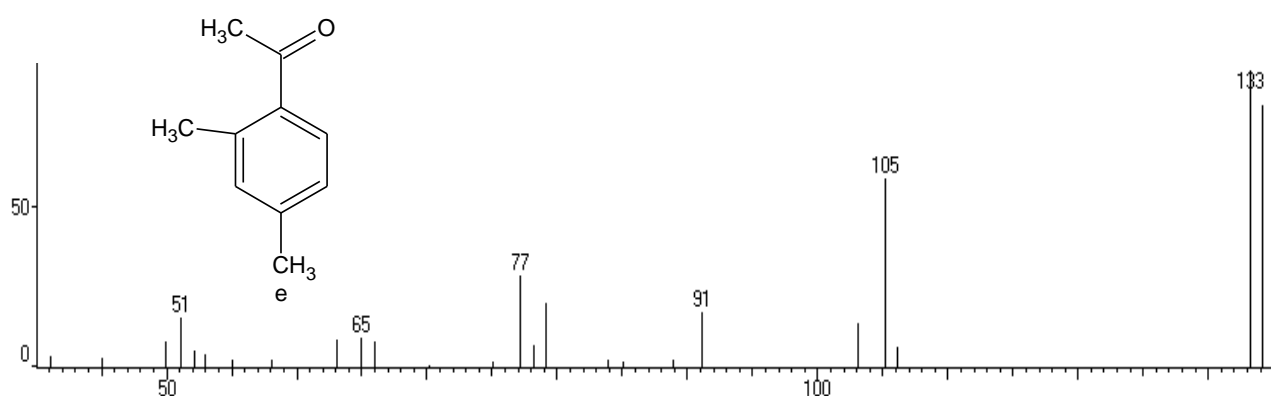
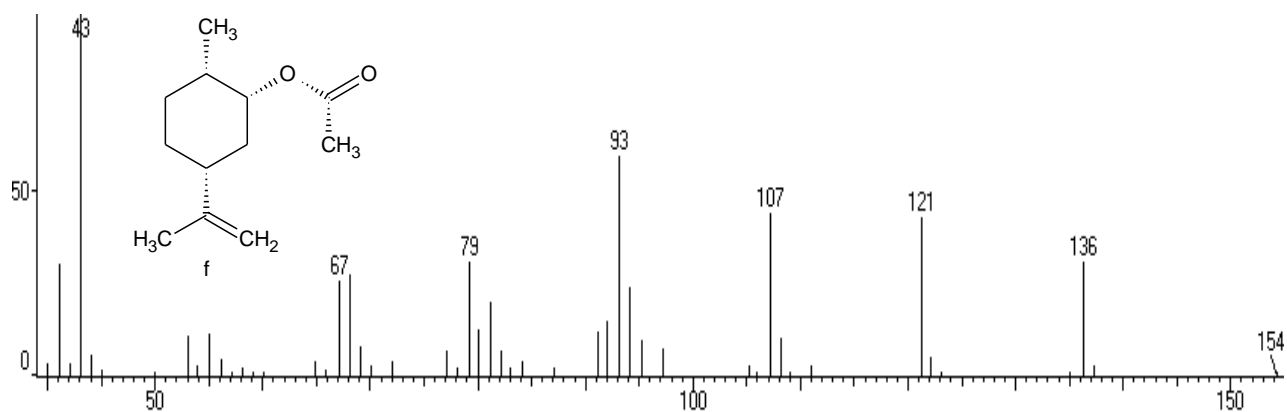
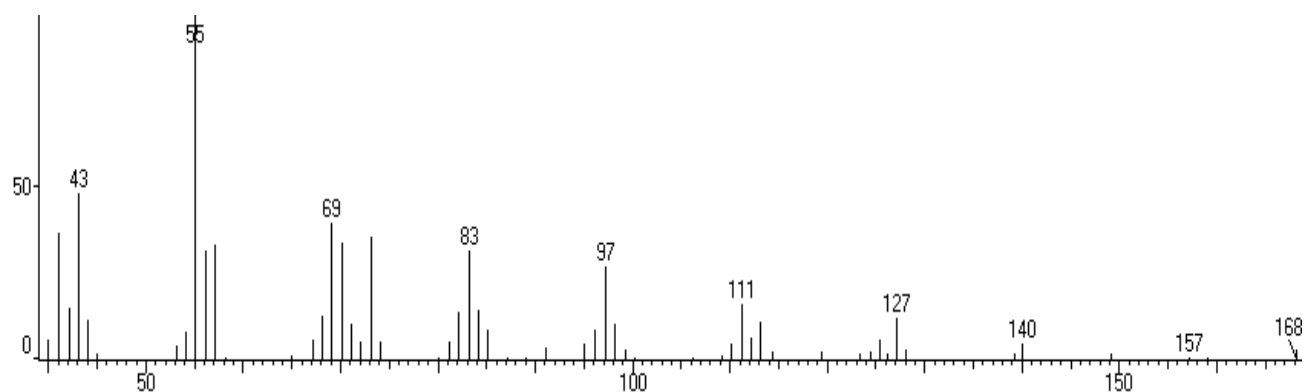
**Produto a.** Neo-dihidrocarveol.

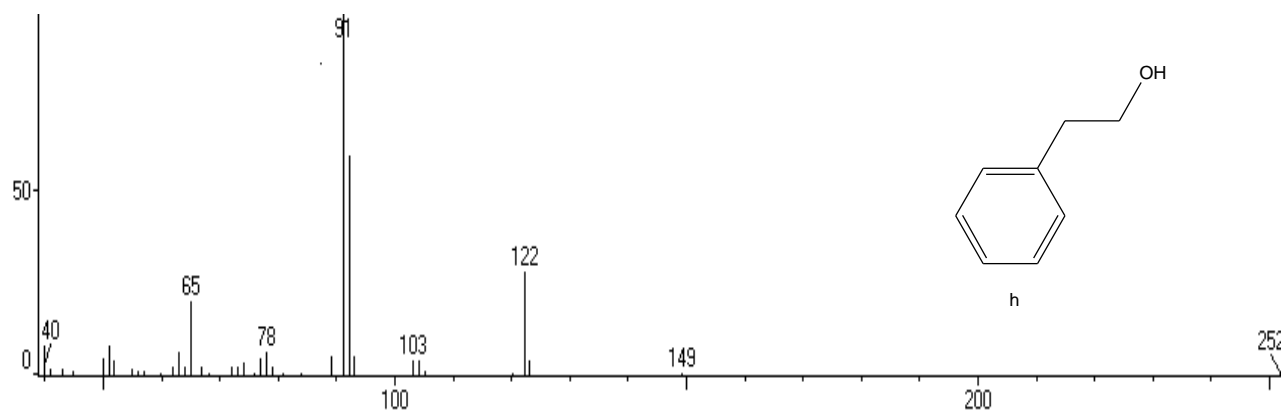


**Produto b.** Trans-dihidrocarvona.



**Produto c.** Iso-dihidrocarveol.

**Produto d.** Neiso-dihidrocarveol.**Produto e.** 2,4-dimetilbenzaldeído.**Produto f.** Acetato de neiso-dihidrocarveol.**Produto g.** Desconhecido.



**Produto h.** Álcool fenetílico.