



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

## **BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS EM COMPOSTOS DE AROMA**

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

**Autor: Denise Maria Pinheiro**

**Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore**

Campinas - SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

P655b Pinheiro, Denise Maria  
Biotransformação de terpenos em compostos de aroma /  
Denise Maria Pinheiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Gláucia Maria Pastore  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biotransformação. 2.Limoneno. 3.Óxidos. 4.Rosa.  
I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## BANCA EXAMINADORA

---

Profª Drª Gláucia Maria Pastore  
(Orientadora)

---

Profª Drª Gabriela Alves Macedo  
(Membro)

---

Profª Drª Maria Regina Bueno Franco  
(Membro)

---

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana  
(Membro)

---

Drª Jane G. Menegaldo Snow  
(Membro)

---

Prof. Dr. Yong K. Park  
(Suplente)

---

Profª Drª Hilary C. de Menezes  
(Suplente)

Campinas, de

de 2004



## AGRADECIMENTOS

Transcrevo aqui os meus agradecimentos a todos que contribuíram para esse trabalho, me desculpando desde já por aqueles que por algum motivo não forem lembrados nas próximas linhas.

- A profa. Dra. Gláucia M. Pastore pelo respeito e pelo aprendizado científico.
- Aos meus pais, pela vida que tenho, e pelo inestimável apoio em todas as etapas da vida.
- A minha família campineira, Edler (Ed) e Elaine (Lalai) que me ensinaram o quanto à vida é importante; e que obstáculos são para serem superados e vencidos com distinção e louvor; mas que acima de tudo está a amizade.
- Aos meus tios que sempre me incentivaram a alcançar os meus objetivos sem nunca deixar a simplicidade de lado e por estarem sempre presentes. Em especial ao meu tio Antonio que me ensinou que embora o estudo seja importante nem sempre nos dá tudo.
- Aos meus colegas de Departamento, Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana e Profa. Dra. Marília O. F. Goulart, que me deram todo o apoio e me mostraram que com criatividade e persistência, o trabalho científico pode ser desenvolvido.
- Ao meu chefe de Departamento, Prof. Dr. Mariano Alves, que sempre me ajudou nas questões burocráticas enquanto eu estava realizando esta dissertação de doutorado.
- Aos ex Pró-Reitores de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, Prof. Dr. Hilário de Alencar e o Prof. Dr. Josealdo Tonholo; que me ajudaram a realizar essa tese na Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP.
- A minha procuradora e amiga Profa. Terezinha da Rocha, pelas palavras de carinho, incentivo e na resolução de questões burocráticas dentro da UFAL.

- Ao meu amigo Francisco Albuquerque, que mostrou que trabalhos são para serem desenvolvidos com criatividade.
- A minha amiga Bianca Brauer pela inestimável ajuda para a finalização dessa tese e pela sua acolhida na cidade de Hannover/Alemanha.
- Ao Prof. Dr. R. G. Berger, Prof. Dr. U. Krings e Prof. Dr. H. Zorn, que me acolheram na Universidade de Hannover/Alemanha e me transmitiram todas as suas experiências de maneira a terminar e esclarecer alguns pontos dessa tese.
- Aos meus colegas do Laboratório de Bioaromas – FEA/UNICAMP, Gabriela Koblitz (Biba), Berenice, Angelita, Janaina, Luciana Carrasco, Cleber, Eliane, Dora, pela presteza e amizade durante esses anos.
- A Bia, do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, por todas as inestimáveis ajudas.
- Ao programa CAPES/PICDT pela bolsa de doutorado.
- A Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio para a realização e a finalização dessa tese de doutorado, em particular as secretárias do Gabinete do Reitor e as da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa.
- E por ultimo, mas não o menos importante, a Deus, por me dado a persistência e paciência, nos momentos mais difíceis.

## ÍNDICE GERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice de Figuras</b>	x
<b>Índice de Tabelas</b>	xxi
<b>Índice de Anexos</b>	xxii
<b>RESUMO</b>	xxvi
<b>SUMARY</b>	Xxvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1. Aromas.	3
2.1.1. História dos Aromas.	3
2.1.2. Receptores de aroma.	5
2.1.3. Indústria de aromas.	7
2.2. Importância dos microrganismos nos processos de biotransformação.	16
2.3. Processos de Biotransformação.	21
2.3.1. Processos de Biotransformação de drogas e inseticidas.	24
2.3.2. Processos de Biotransformação para a produção de aromas.	32
<b>3. OBJETIVO</b>	60
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	61
4.1. Material e Equipamentos.	61
4.1.1. Material.	61
4.1.2. Equipamentos.	62
4.2. Metodologia.	63
4.2.1. Isolamento de microorganismos.	63
4.2.2. Biotransformação dos Terpenos.	63
4.2.3. Extração, Identificação e Quantificação dos produtos da biotransformação.	64
4.2.4. Indução com citrionelol e limoneno.	65
4.2.4.1. Indução com citrionelol	65
4.2.4.2. Indução com limoneno	66
4.2.5. Estudo da composição dos meios de cultura a serem utilizados para a biotransformação.	66

4.2.5.1. Biotransformação do citrionelol e do limoneno.	67
4.2.6. Estudo da rota metabólica da obtenção do óxido de rosa a partir do citrionelol.	68
4.2.6.1. Microrganismos.	68
4.2.6.2. Inóculo	69
4.2.6.3. Biotransformação em meio de cultura líquido número 2 e número 4.	69
4.2.6.4. Estudo da utilização de co-solvente para a biotransformação do citrionelol	70
4.2.6.5. Estudo da linhagem LB-2038 adaptada com citrionelol, no meio de cultura líquida número 2.	70
4.2.6.6. Extração, identificação e quantificação dos produtos da biotransformação.	71
<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
5.1. Isolamento dos microrganismos.	73
5.2. Seleção dos microrganismos.	74
5.2.1. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do citrionelol.	74
5.2.1.1. Biotransformação do citrionelol de acordo com o tempo.	84
5.2.2. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do limoneno.	87
5.2.3. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do geraniol.	94
5.2.4. Seleção de microrganismos para a biotransformação do linalol.	95
5.3. Microrganismos selecionados: LB-2025, LB-2036 e LB-2038.	104
5.4. Composição dos diferentes meios de cultura líquidos para a biotransformação do citrionelol e do limoneno.	104
5.4.1. Estudo da biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de citrionelol, após indução.	106
5.4.2. Estudo da biotransformação pela adição de 0,5% (v/v) de citrionelol, após indução.	113
5.4.3. Estudo da biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de limoneno, após indução.	117
5.4.4. Biotransformação pela adição de 1% (v/v) de limoneno, após indução.	123
5.4.5. Biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial 6,0; após indução.	127
5.5. Rota Metabólica para Obtenção do Óxido de Rosa.	131

5.5.1. Microrganismos utilizados	131
5.5.2. Biotransformação no meio de cultura líquido número 4.	132
5.5.3. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2.	136
5.5.4. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2 do óxido de rosa para a linhagem LB-2038 (no.36)	138
5.5.5. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2 do limoneno e do limoneno como co-adjuvante do citronelol pela linhagem LB-2038 (no. 36).	139
5.5.6. Biotransformação do citronelol, no meio de cultura líquido número 2, com células adaptadas, pela linhagem LB-2038.	141
5.5.7. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2, com duas adições de citronelol, com a linhagem LB-2038 (no. 36).	141
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>143</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>145</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>157</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Voláteis identificados em alimentos nos anos de 1976, 1986 e 1998.	5
<b>Figura 2.-</b> Sistema olfatorial: 1.Células nervosas do sistema olfatorial no nariz; 2. Bulbo olfatorial na forma de uma colher; 3/4. Trato olfatorial; 5. Talo levando ao talamus; 6.Região hipotálamica; 7. amídala.	6
<b>Figura 3.</b> Sequência de eventos durante a interação do receptor com a molécula de odor (1. Molécula de odor; 2. Proteína receptora (Proteína integral); 3. Proteína G; 4. Adenil ciclase; 5. Citossol; 6. Membrana plasmática).	7
<b>Figura 4.</b> Sentidos envolvidos no consumo de alimentos.	8
<b>Figura 5.</b> Consumo de aromas químicos nos EUA e estimativa de crescimento.	12
<b>Figura 6.</b> Consumo de aromas e fragrâncias, dos anos de 1998 e 2004 (estimativa); e média anual de crescimento entre 1998-2004 (*-estimativa).	12
<b>Figura 7.</b> Mercado mundial das 10 empresas líderes de aromas e fragrâncias do ano de 1994 ao ano de 2001.	14
<b>Figura 8.</b> Mercado mundial das 10 empresas líderes do ano de 1994 ao ano de 2000.	14
<b>Figura 9.</b> Cota de mercado de cada uma das 10 empresas líderes do mercado mundial de aromas e fragrâncias.	15
<b>Figura 10.</b> Ciclo do biocatalisador a ser utilizado em processos de biotransformações industriais.	18
<b>Figura 11.</b> Sítios de transformação da $\beta$ -ionona por <i>Lanodiplodia theobromae</i> .	21
<b>Figura 12.</b> Obtenção de cortisona através da biotransformação por microrganismo	26
<b>Figura 13.</b> Metabolismo da canfora: (1) canfeno isoberneol liase isomerase; (2) isoberneol dehidrogenase; (3) 6-endo-canfora hidroxilase; (4) 5-exo-hidroxicanfora dehidrogenase; (5) metileno-5-exo-	35

hidroxilase; (a) Putidaredoxina redutase, (b) Putida redoxina e (c) citocromo C 450-canfora-hidroxilase; (6) cetolactonase.

<b>Figura 14.</b>	Catabolismo microbiano de terpenos.	36
<b>Figura 15.</b>	Transformação do $\alpha$ - e $\beta$ -pineno por <i>Pseudomonas</i> .	36
<b>Figura 16.</b>	Transformação do citronelol a pulegol e isopulegol; com seguida hidrogenação a mentol.	37
<b>Figura 17.</b>	Redução microbiológica do citronelal a citronelol.	37
<b>Figura 18.</b>	Bioconversão da $\beta$ -ionona por <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ATCC 28570.	38
<b>Figura 19.</b>	Hidroxilação do pachtoulol por fungos ( <i>Calonectaria decora</i> ATCC 14769, <i>Paecilomyces carneus</i> FERM P-3797 e <i>Penicillium rubrum</i> FERM P-3796).	39
<b>Figura 20.</b>	Conversão do esclareol a ambróxido (1) e transformação do ambróxido numa mistura de hidroxi- e oxo-derivados (2).	40
<b>Figura 21.</b>	Biotransformação do eugenol a vanilina.	40
<b>Figura 22.</b>	Biotransformação da fenilalanina a benzaldeído por <i>Pseudomonas putida</i> .	42
<b>Figura 23.</b>	Biotransformação do ácido ricinoléico a $\gamma$ -decalactona.	43
<b>Figura 24.</b>	Degradação do linalol por <i>Pseudomonas pseudomallei</i> e <i>Pseudomonas incógnita</i> .	45
<b>Figura 25.</b>	Caminho metabólico para a produção dos óxidos de linalol.	46
<b>Figura 26.</b>	Transformação química do linalol.	47
<b>Figura 27.</b>	Transformação de citronelol por <i>Cystoderma carcharias</i> .	48
<b>Figura 28.</b>	Bioreator de membrana aerada.	49
<b>Figura 29.</b>	Bioconversão do citronelol por cepas de <i>Botrytis cinerea</i> .	50
<b>Figura 30.</b>	$\omega$ -oxidação do <i>Botrytis cinerea</i> .	50
<b>Figura 31.</b>	Interconversão e isomerização química do geraniol ao linalol.	51
<b>Figura 32.</b>	Transformação do geraniol por <i>Penicillium italicum</i> e por	51

levedura.

- Figura 33.** Três caminhos diferentes da transformação do limoneno. 54
- Figura 34.** Transformação do limoneno a alfa-terpineol. 55
- Figura 35.** Transformação do limoneno por *Penicillium italicum*, *Cladosporium* sp. e *Corynebacterium hydrocarboclastrum*. 56
- Figura 36.** Etapas da bioconversão do limoneno a ácido perfílico. 59
- Figura 37.** Amostras de frutas acondicionadas em frascos (a) e após exposição ao ar por 168 horas (b). 73
- Figura 38.** Estrutura dos terpenos utilizados para a biotransformação por microrganismos, na etapa de seleção. 74
- Figura 39.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do citrionelol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044). 77
- Figura 40.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do citrionelol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044). 78
- Figura 41.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do citrionelol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086). 79
- Figura 42.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do citrionelol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; 80

linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).

- Figura 43.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do citrionelol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038). 81
- Figura 44.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do citrionelol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000; linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038). 82
- Figura 45.** Crescimento (peso seco (mg/mL)) e o pH (a) na biotransformação do citrionelol em relação a síntese de óxido de rosa, a adição de citrionelol ( ↓ ) e o citrionelol remanescente no meio de cultura (b), para a linhagem LB-2025 (no. 8). 85
- Figura 46.** Crescimento (peso seco (mg/mL)) e o pH (a) na biotransformação do citrionelol em relação a síntese de óxido de rosa, a adição de citrionelol ( ↓ ) e o citrionelol remanescente no meio de cultura (b), para a linhagem 2036 (no. 9). 86
- Figura 47.** Seleção dos microrganismos (1 ao 12) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 1: LB-2002, linhagem no. 2: LB-2007; linhagem no. 3: LB-2041; linhagem no. 4: LB-2060; linhagem no. 5: LB-2001; linhagem no. 6: LB-2001; linhagem no. 7: LB-2008; linhagem no. 8: LB-2025; linhagem no. 9: LB-2036; linhagem no. 10: LB-2080; linhagem no. 11: LB-2054; linhagem no. 12: LB-2044). 90
- Figura 48.** Seleção dos microrganismos (13 ao 24) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: 91

LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).

- Figura 49.** Seleção dos microrganismos (25 ao 36) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038). 92
- Figura 50.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do linalol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044). 97
- Figura 51.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do linalol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044). 98
- Figura 52.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do linalol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086). 99
- Figura 53.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do linalol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; 100

linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).

- Figura 54.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do linalol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038). 101
- Figura 55.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do linalol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000; linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038). 102
- Figura 56.** Foto em microscópio ótico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem LB-2038: *Aspergillus* sp., (b) linhagem LB-2025: *Penicillium* sp., e (c) LB-2036: *Penicillium* sp.. 105
- Figura 57.** Comportamento do pH (a) e do peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para 3 linhagens após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 107
- Figura 58.** Concentração do óxido de rosa (a) e do citronelol (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 108
- Figura 59.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, 111

LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

- Figura 60.** Rendimento (Y) da concentração do citrônolol remanescente no meio de cultura pelo peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citrônolol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 112
- Figura 61.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo citrônolol remanescente no meio de cultura em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citrônolol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 113
- Figura 62.** Comportamento do pH (a) e do peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citrônolol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 114
- Figura 63.** Concentração do óxido de rosa (a) e do citrônolol (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citrônolol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 116
- Figura 64.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citrônolol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 118

$10^7$  esporos).

- Figura 65.** Rendimento (Y) da concentração do citronelol remanescente no meio de cultura pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 119
- Figura 66.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo citronelol remanescente nos quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 120
- Figura 67.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 120
- Figura 68.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 121
- Figura 69.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 121
- Figura 70.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens 122

(LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

- Figura 71.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 122
- Figura 72.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 124
- Figura 73.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 124
- Figura 74.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 125
- Figura 75.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 125
- Figura 76.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 126

1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

- Figura 77.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 128
- Figura 78.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 128
- Figura 79.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 129
- Figura 80.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos). 129
- Figura 81.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de 130

esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

- Figura 82.** Foto em microscópio ótico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem LB-2042 (no. 3): *Aspergillus* sp. e (b) linhagem LB-2015 (no. 23): *Penicillium* sp. 131
- Figura 83.** Foto em microscópio ótico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem LB-2000 (no. 31): *Aspergillus* sp.; (b) linhagem LB-2010 (no. 20): *Penicillium* sp.; (c) linhagem LB-2029 (no. 14), *Penicillium* sp.; (d) linhagem LB-2060 (no. 4) *Penicillium* sp. 132
- Figura 84.** Formação do 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol (epóxido) e 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol (diol), no meio de cultura líquido número 4 (item 4.2.6.3.), para as oito linhagens (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)). 134
- Figura 85.** Citronelol remanescente no meio de cultura em cada uma das amostras de fungos do meio líquido número 4 (item 4.2.6.3.), para as oito linhagens (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)). 135
- Figura 86.** Produção de óxido de rosa dos oito linhagens testados no meio de cultura líquida número 2, com pH 6,0 (item 4.2.6.3), das oito linhagens testados (linhagem LB- 2041 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)). 136
- Figura 87.** Citronelol remanescente no meio de cultura líquido número 2, com pH 6,0 (item 4.2.6.3), dos oito linhagens testadas (linhagem LB-2041 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)). 137
- Figura 88.** Biotransformação do óxido de rosa pela linhagem LB-2038, a seta indica a adição de óxido de rosa (0,125 % (v/v)). 139
- Figura 89.** Biotransformação do citronelol, utilizando o limoneno como co-solvente, em óxido de rosa, pela linhagem LB-2038, no meio líquido número 2, pH 6,0 (item 4.2.6.3.). 140
- Figura 90.** Citronelol remanescente no meio líquido número 2, pH 6,0, utilizando o limoneno como co-solvente do citronelol, pelo linhagem LB-2038 (item 4.2.6.3). 140

<b>Figura 91.</b>	Biotransformação do citrionelol em óxido de rosa, no meio de cultura líquido número 2 (item 4.2.6.3.), com duas adições de citrionelol (indicadas pelas setas).	142
<b>Figura 92.</b>	Citrionelol remanescente no meio de cultura líquido número 2 (item 4.2.6.3.), com duas adições deste (indicadas pelas setas).	142

## ÍNDICE DE TABELAS

		<b>Página</b>
<b>Tabela I.</b>	Número de compostos conhecidos e utilizados pela indústria de aromas.	4
<b>Tabela II.</b>	Seleção de matéria prima para a produção de aromas.	9
<b>Tabela III.</b>	Matéria prima para a produção de aromas naturais por métodos atualizados.	9
<b>Tabela IV.</b>	Substâncias utilizadas como aroma natural de condimentos e frutas.	10
<b>Tabela V.</b>	Empresas líderes no mercado de aromas.	13
<b>Tabela VI.</b>	Transformações microbianas industriais operantes.	25
<b>Tabela VII.</b>	Desenvolvimento recente de biotransformações industriais com células de microrganismo pelo setor industrial.	27
<b>Tabela VIII.</b>	Biotransformação do limoneno e da piperitona.	59
<b>Tabela IX.</b>	As 36 linhagens utilizadas na etapa de seleção da biotransformação de terpenos, de acordo com a sua origem e a respectiva numeração da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas.	75
<b>Tabela X.</b>	Comparação do valor do óxido de rosa, produto da biotransformação, em relação ao citrionelol.	83
<b>Tabela XI.</b>	Relação da m/z (%) de cada um dos compostos encontrados na biotransformação do limoneno.	87

<b>Tabela XII.</b>	Planta com as concentrações de carvona e o alfa-terpeniol.	89
<b>Tabela XIII.</b>	Comparação do valor do alfa-terpineol e da carvona, produtos da biotransformação em relação ao seu substrato, o limoneno.	94
<b>Tabela XIV.</b>	Relação m/z (%) para o linalol e seus produtos de biotransformação obtidos pelo CG-MS.	95
<b>Tabela XV.</b>	Concentração dos óxidos de linalol (furano).	96
<b>Tabela XVI.</b>	m/z (%) dos dois compostos identificados na biotransformação utilizando o meio líquido número 4.	133

## ANEXO

		<b>Página</b>
<b>Anexo I.</b>	Cromatograma da linhagem LB-2080 (isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citrionelol (14,23-15,89 minutos) (c)).	157
<b>Anexo II.</b>	Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da linhagem LB-2080, isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citrionelol (14,23-15,89 minutos) (c).	159
<b>Anexo III.</b>	Cromatograma do padrão de óxido de rosa (tempo de retenção de 22,929 e 23,555 min.), citrionelol (tempo de retenção de 26,552min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,179 min.)	161
<b>Anexo IV.</b>	Cromatograma do experimento controle com citrionelol e sem o microrganismo: óxido de rosa (tempo de retenção de 22,929 e 23,555 min.), citrionelol (tempo de retenção de 26,552min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,179 min.)	162
<b>Anexo V.</b>	Cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038 (alfa-terpineol: 21,1-21,3 minutos, isomêros do carveol: 21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos, carvona: 22,6-22,7 minutos, e o limoneno: 27,5-27,7 minutos).	163
<b>Anexo VI.</b>	Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-	164

	terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e).	
<b>Anexo VII.</b>	Cromatograma do padrão de carvona (tempo de retenção de 26,660 min.) e padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,972 min.).	169
<b>Anexo VIII.</b>	Cromatograma do padrão de alfa-terpineol (tempo de retenção de 25,416min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,102min.).	170
<b>Anexo IX.</b>	Cromatograma do padrão de limoneno (tempo de retenção de 19,911 min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,873min.).	171
<b>Anexo X.</b>	Cromatograma da biotransformação do limoneno na ausência de microrganismo: limoneno (tempo de retenção de 19,9 min.) e padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,8 min.).	172
<b>Anexo XI.</b>	Cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol (4-metil-3-penten-1-ol: 10,62-10,73 minutos, 6-metil-5-hepten-2-ona: 14,3-13,4 minutos e o geraniol: 23,02-23,26 minutos)).	173
<b>Anexo XII.</b>	Espectros de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol: 4-metil-3-penten-1-ol (10,62-10,73 minutos) (a), 6-metil-5-hepten-2-ona (14,3-13,4 minutos) (b) e o geraniol (23,02-23,26 minutos) (c).	174
<b>Anexo XIII.</b>	Cromatograma da biotransformação do geraniol na ausência de microrganismo: padrão interno (decano) (18,9 minutos) e o geraniol (26,9 minutos).	177
<b>Anexo XIV.</b>	Cromatograma da biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) (isômeros do óxido de linalol (furano) (alfa, alfa, 5-trimetil-5-etenil-tetrahidro-2-furano-metanol): 17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos; linalol: 18,1-18,3 minutos; alfa-terpineol: 21,1-21,29 minutos; e geraniol: 23,03-23,16 minutos).	178
<b>Anexo XV.</b>	Espectros de massa da biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-etenil-tetrahidro-2-furano-metanol) (17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e).	179

<b>Anexo XVI.</b>	Cromatograma do padrão de óxido de linalol (tempo de retenção de 21,352 e 21,844 min.), linalol (22,075) e o padrão interno (decano)	184
<b>Anexo XVII.</b>	Cromatograma do padrão de geraniol (tempo de retenção de 26,998 minutos) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,962 minutos).	185
<b>Anexo XVIII.</b>	Cromatograma da biotransformação do linalol na ausência do microrganismo: óxido de linalol (tempo de retenção de 21,28 e 21,84 min.), linalol (22,01) e o padrão interno (decano)	186
<b>Anexo XIX.</b>	Cromatograma da biotransformação do citrionelol pela linhagem LB-2000. (a) padrão interno, cânfora (25,919 minutos); (b) citrionelol (29,569 minutos); (c) o 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero <u>a</u> e o isômero <u>b</u> (38,870 minutos); e (d) o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (44,720 minutos).	187
<b>Anexo XX.</b>	Espectro de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2000. O 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero <u>a</u> (a) e o isômero <u>b</u> (b), e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (c).	188
<b>Anexo XXI.</b>	Espectro de massa do 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol obtido por ONKEN (1998)	191
<b>Anexo XXII.</b>	Espectro de massa para o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol , obtido por ONKEN (1998)	192
<b>Anexo XXIII.</b>	Espectros de massa para o 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol obtido por ONKEN (1998).	193
<b>Anexo XXIV.</b>	Espectros de massa para o 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol obtido por ONKEN (1998).	194
<b>Anexo XXV.</b>	Cromatograma da linhagem LB-2060 no meio de cultura líquido número 2 de óxido de rosa (a e b) (14,191 e 14,774 minutos), padrão interno (cânfora) (c) (20,682 minutos) e citrionelol remanescente no meio de cultura (d) (30,281 minutos).	195
<b>Anexo XXVI.</b>	Espectros de massa do óxido de rosa, o isômero <u>a</u> (a) e o isômero <u>b</u> (b).	196
<b>Anexo XXVII.</b>	Cromatograma da biotransformação do óxido de rosa no tempo de 144 horas de cultivo	198

## RESUMO

Amostras de solo e água foram coletadas na região Nordeste, no Sertão de Alagoas; no agreste; e na Região Litorânea do Estado de Alagoas e da cidade de Aracaju. As frutas foram coletadas no Mercado Municipal de Maceió (Alagoas) e no Mercado Municipal de Aracaju (Sergipe), Brasil.

As amostras de frutas selecionadas foram a goiaba; acerola; manga rosa e espada; maracujá; tamarina; graviola; carambola; sapoti; mamão; umbu-caja e seriguela. Elas foram expostas ao ambiente por 7 dias e inoculadas em frasco contendo meio líquido YM, por 96 horas, em estufa a 30°C.

Das 368 amostras obtidas, isolou-se 669 microrganismos, sendo 166 fungos (bolores), 180 leveduras e 323 bactérias.

Dos fungos utilizou-se 36 linhagens para a biotransformação utilizando como substrato o citrionelol, geraniol, linalol e limoneno.

Na biotransformação do citrionelol pelas 36 linhagens obtivemos o óxido de rosa; na biotransformação do limoneno obtivemos o alfa-terpineol e a carvona; na seleção da biotransformação do geraniol os produtos foram o 4-metil-3-penten-1-ol e o 6 metil-5-hepten-2-ona; e na biotransformação do linalol encontramos os óxidos furanóides do linalol, o alfa-terpineol e o geraniol.

Com relação a indução com o substrato citrionelol, verificou-se que três linhagens apresentaram um aumento da concentração de óxido de rosa obtido pela biotransformação do citrionelol de até 10 vezes maior do que antes da indução.

Foram testados vários meios de cultura líquidos sendo que quando as oito linhagens foram cultivadas no meio de número 4, sem fonte de carbono, e com adição de citronelol (0,3% (v/v)), de uma única vez, foram capazes de formar o epóxido, 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, e o diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.

A linhagem LB-2038 (no. 36) não metabolizou o óxido de rosa, nas 144h de análise estudadas, mostrando que esse composto deve ser o composto final da biotransformação do citronelol, conforme proposto para *Cystoderma carcharias*.

Foi verificado que as 2 linhagens selecionadas são capazes de converter o citronelol em óxido de rosa proposta para *Cystoderma carcharias*, que é diferente da via proposta para *Botrytis cinérea*.

## SUMARY

Samples of soil and water were collected in the Northeast of Brazil, in the Interior of the state of Alagoas; from rural; and in the Coast Area of the State of Alagoas and of the city of Aracaju.

The fruits investigated were the guava; acerola; pink mango and espada mangos; passion fruit; tamarino; graviola; star fruit; sapoti; papaya; umbu (-caja) and seriguela. They were exposed to the environment for 7 days and inoculated in flask containing liquid medium YM and incubated for 96 hours at 30°C.

We obtain 669 microorganisms, being 166 mould, 180 yeasts and 323 bacterias from 368 samples.

We used 36 fungi for the biotransformation using citronellol, geraniol, linalol and limonene as the substrates.

In the biotransformation of the citronelol by the 36 fungi, the rose oxide was obtained in the biotransformation of limonene we obtained alpha-terpineol and carvone; in the selection of the biotransformação of geraniol, the products were 4-methyl-3-penten-1-ol and the 6 methyl-5-hepten-2-ona; and in the biotransformation of linalol we found the oxides of the linalol (furan), alpha-terpineol and geraniol.

The induction of 3 fungi with citronelol and rose oxide showed in the source an increase of the concentration of rose oxide obtained by the biotransformation of the citronelol of up to 10 times more.

Eight fungi when cultivated in the medium of culture liquid no. 4, without source of carbon, and with the addition of 0,3% (v/v). They were capable of forming the epoxide, 3,7-dimetil-6,7-epoxy-1-octanol, and the diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.

After 144h of studied analysis rose oxide was not metabolized after the end of biotransformation of citronellol after applying fungi 2038 (no. 36). This shows that fungi 2038 (no. 36) did not produce the biotransformation as found in the use of *Cystoderma carcharias*.

The 2 microorganism selected here were capable of accomplishing the formation of rose oxide by proposed for *Cystoderma carcharias*, different form that proposed for *Botrytis cinerea*.

# 1. INTRODUÇÃO

O mercado global de aromas representa U\$ 9,7 bilhões, sendo que somente 6400 voláteis naturais e 10.000 aromas sintéticos são conhecidos, e dentre essas poucas centenas são regularmente utilizadas em aromas e fragrâncias.

As fontes naturais de aromas são: extratos (resinas oleosas); destilados (de extratos a partir de plantas; óleos essenciais); óleos prensados e concentrados (principalmente de sucos de frutas).

As desvantagens da obtenção dos compostos de aroma, a partir dessas técnicas acima descritas, estão relacionadas principalmente as desvantagens das fontes agrícolas que são relacionadas aos efeitos geográficos, sazonais, pragas, instabilidade sócio-política e o estado de maturação da planta. Além disso, os componentes de impacto estão presentes em quantidades mínimas e podem estar em formas conjugadas. Por isso a biotecnologia aparece como alternativa, uma vez que o fornecimento constante de aromas e a sua independência em relação aos problemas agrícolas são os principais motivos em relação às técnicas já mencionadas.

Além disso, as legislações na Comunidade Européia e dos Estados Unidos têm incorporado o termo “aroma natural” para aqueles aromas produzidos a partir de fontes biológicas, células vivas, incluindo fungos e suas enzimas.

Dessa forma a síntese de aromas via ação microbiana recebe o rótulo de “natural”, não sintético, o que promove grande aceitação no mercado quando comparado com um produto sintetizado quimicamente.

Uma outra vantagem da biossíntese em relação a síntese química é que a síntese química libera uma carga de resíduos industriais muito maior do que a biossíntese. Além do fato de que os resíduos da biotransformação são obtidos em menor escala e são biodegradáveis. Logo a biotransformação usando microrganismos promove uma menor poluição do meio ambiente.

Uma vantagem adicional da biossíntese microbiana está relacionada a seletividade das reações enzimáticas, o que permite um direcionamento do sistema para obtenção de um produto definido, acabando por otimizar o processo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Aromas**

#### **2.1.1. História dos Aromas.**

A palavra aroma veio do grego e originalmente significava condimento. Mais tarde esse significado mudou para todas as percepções de odor que apresentavam sensação de cheiro agradável (MATHEIS, 1997).

A aplicação dos aromas abrange várias áreas, desde a indústria alimentícia à indústria de cosméticos. Desde os tempos pré-históricos têm-se adicionado aromas aos alimentos. Essa aromatização foi feita inicialmente com fungos e especiarias, uma vez que os mesmos foram e ainda são muito utilizados como agentes de conservação. Portanto a história das especiarias se encontra extremamente relacionada à história dos aromas

A aplicação de aromas na área cosmética data de 3.000 a.C. que foi comprovado, a partir do descobrimento arqueológico na Pérsia, com o uso de técnicas de destilação para a produção de perfumes (MATHEIS, 1998; VASIC-RACKI, 2000).

Os microrganismos também apresentam uma grande importância econômica e social para a produção de bebidas e alimentos desde o início de sua existência. A fermentação alcoólica, por exemplo, se conhece desde 3500 a.C.; e a produção de vinho já se encontrava em seu apogeu entre os egípcios e assírios. Os babilônios em 2800 a.C. preparavam cerveja de pão ou cevada malteada. Os egípcios elaboraram o primeiro pão com levedura, embora Plínio já tivesse mencionado a função de padeiro, em seus relatos. A Ásia Oriental empregava produtos de soja fermentados, como o tempe e a salsa de soja (MATHEIS, 1997).

As enzimas também vêm sendo utilizadas há muitos anos na indústria alimentícia. Um exemplo é o dos pastores da antiguidade que observaram que ao guardar leite no estômago de um animal degolado, se produzia um alimento sólido, conhecido hoje como o queijo. Plínio (23-79 d.C.) narrava ter visto um soldado romano que mexia o leite com uma rama de figueira. A enzima era a ficina, responsável pela solidificação (MATHEIS, 1997).

Durante este tempo foi descoberto que os microrganismos poderiam modificar substâncias através de reações simples e quimicamente definidas devido ao seu aparato enzimático. Hoje em dia esses processos são chamados de biotransformação.

A história dos aromas além de estar diretamente associada à descoberta de várias especiarias, está também associada aos avanços da química, na área de análise instrumental para a identificação e quantificação de compostos orgânicos.

No ano de 1860, na Filadélfia, nos EUA, de autor anônimo, apareceu o primeiro livro com fórmulas de aromas. Em 1916, Walter publicou um manual para a indústria aromática, de fórmulas de aromas que foi usado até os anos 50 d.C. (MATHEIS, 1997).

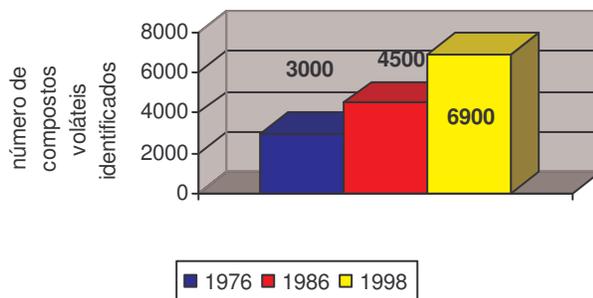
Até os anos 50 a investigação de aromas se baseava no isolamento, descobrimento de estruturas e a síntese de algumas poucas substâncias naturais. Isso mudou radicalmente com a descoberta do cromatógrafo gasoso e com a combinação deste com espectrometro de massas.

MATHEIS (1998) diz que se podia reconhecer mais de 4.000 compostos químicos como substâncias aromáticas, enquanto que CHEETHAM (1997) na Tabela I diz que temos aproximadamente 6400 aromas conhecidos e PICKENHAGEN (1999) diz que foram 6900 (Figura 1). Desses 6.400 aromas (Tabela I) apenas 200-300 compostos são utilizados pela indústria de alimentos e fragrâncias (CHEETHAM, 1997).

**Tabela I.** Número de compostos conhecidos e utilizados pela indústria de aromas (CHEETHAM, 1997).

	Número de compostos conhecidos	Número de compostos usados
Aromas	~6400	200-300
Fragrâncias	5000	200-400
Óleos Essenciais	3000	150-200

Na Figura 1 pode-se observar que há um aumento do número de compostos voláteis identificados, do ano de 1978 ao ano de 1998, da ordem de 230%, em 22 anos (PICKENHAGEN, 1999).



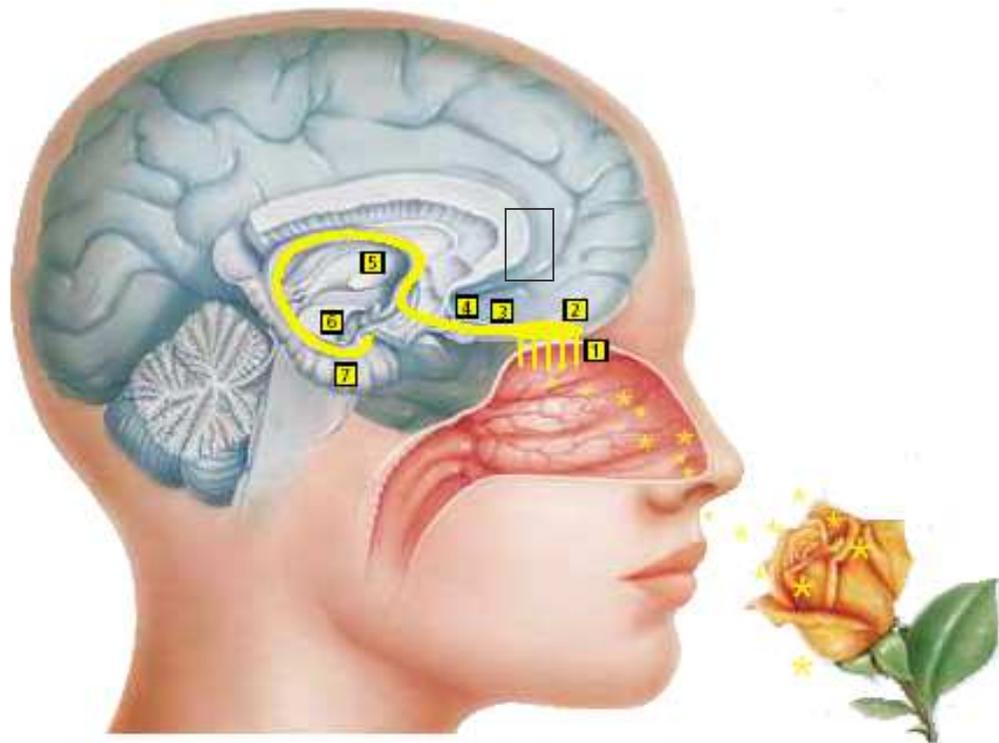
**Figura 1.** Voláteis identificados em alimentos nos anos de 1976, 1986 e 1998 (PICKENHAGEN, 1999).

### 2.1.2. Receptores de aroma

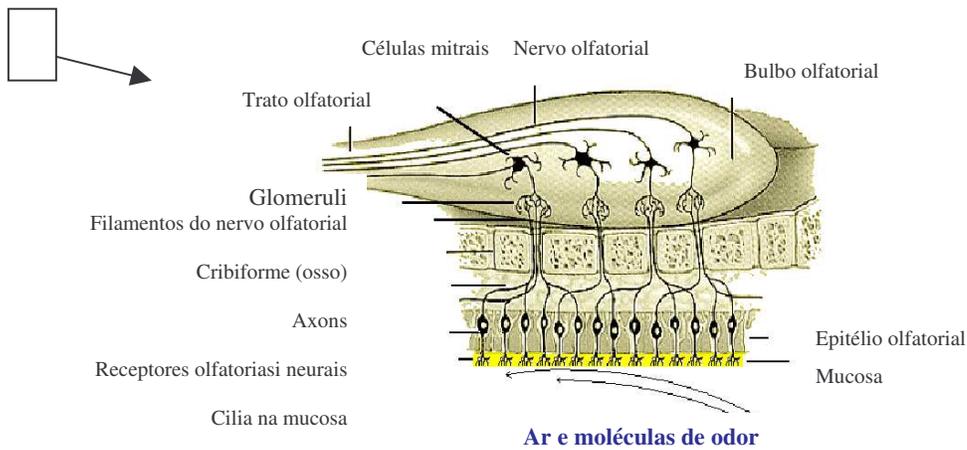
Odor e sabor são resultantes de uma direta interação de compostos químicos com o sistema receptor periférico. Compostos de sabor em solução aquosa estimulam as células de sabor na língua, podendo ser não voláteis (como açúcares) e voláteis (dando o sabor característico). Compostos com cheiro são voláteis e são transportados pelo ar inalado para o epitélio olfatorial (*Regio olfactoria*) localizado na parede do nariz, e abaixo e entre os olhos (Figura 2) (OHLOFF, 1994a, 1994b; HAARMANN & REIMER, 2003; LEFFINGWELL 2003a).

As moléculas de odor possuem propriedades específicas para fornecer as propriedades sensoriais. Essas propriedades são: solubilidade em água, alta pressão de vapor, baixa polaridade, alguma habilidade de solubilizar gordura (lipofilicidade) e atividade de superfície. A molécula com maior peso molecular conhecida e que ainda apresenta odor tem peso molecular de 294, derivado do labdano (OHLOFF, 1994b; LEFFINGWELL, 2003a).

As moléculas dissolvidas interagem com receptores especializados que são chamados de proteínas de ligação de odores (odorant binding proteins). Essas proteínas são proteínas integrais (trans-membranas) que ativam a proteína-G, localizada no seu lado citoplasmático. Esta ativa a adenil ciclase, que está localizada na membrana plasmática do



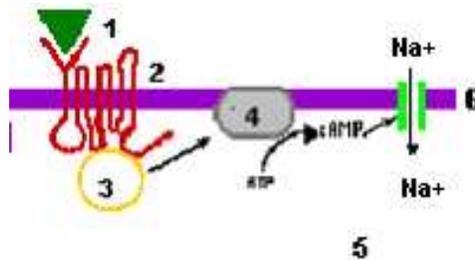
(a)



(b)

**Figura 2.** Sistema olfatorial: 1.Células nervosas do sistema olfatorial no nariz; 2. Bulbo olfatorial na forma de uma colher; 3/4. Trato olfatorial; 5. Talo levando ao talamus; 6.Região hipotálamica; 7. Amígdala (HAARMANN & REIMER, 2003; LEFFINGWELL, 2003a).

cilia. A adenil ciclase catalisa a conversão de ATP a AMP cíclico no citossol. Este por sua vez abre o canal de sódio para uma difusão facilitada de sódio para dentro da célula. Esse influxo de sódio reduz o potencial através da membrana, gerando um potencial que é conduzido ao longo do nervo olfatorial até o cérebro. O cérebro avalia estes e outros sinais olfatoriais traduzindo-o como um particular odor (Figura 3) (KIMBALL, 2003).



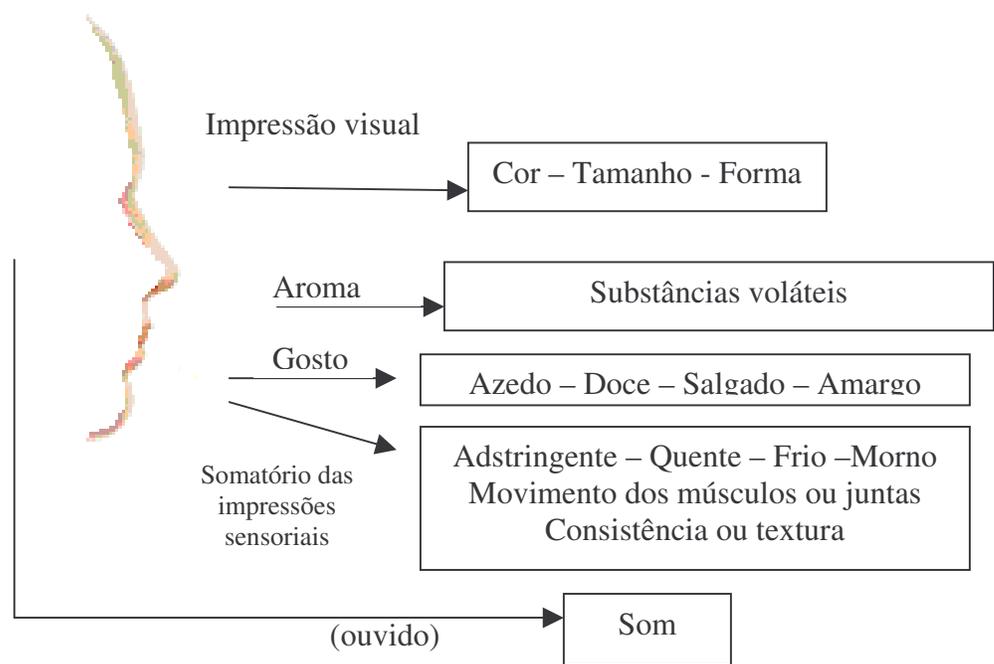
**Figura 3.** Seqüência de eventos durante a interação do receptor com a molécula de odor (1. molécula de odor; 2. proteína receptora (proteína integral); 3. proteína G; 4. adenil ciclase; 5. citossol; 6. membrana plasmática. (KIMBALL, 2003)

O epitélio olfatorial contém terminações nervosas e células sensoriais onde cada uma contém aproximadamente 1000 receptores. Os axônios a partir desses nervos passam através da estrutura do osso e terminam no glomeruli, no bulbo olfatorial, na base do cérebro e atrás do nariz. Estes receptores e os neurônios fornecem um caminho contínuo a partir do ar inalado até o cérebro (TRONSON, 2001).

### 2.1.3. Indústria de Aromas.

O termo aroma pode ter três significados (MATHEIS, 1997): uma impressão sensorial, um produto para ser adicionado em alimentos aromatizados, e um produto usado em aromaterapia, que seria um outro termo empregado, mais popular, para óleo essencial.

Todas as sensações envolvidas no consumo de alimentos estão representados na Figura 4. Com especial importância são os odores, sabor e a sensação na boca que se encontram diretamente relacionados ao aroma de alimentos (MATHEIS, 1997).



**Figura 4.** Sentidos envolvidos no consumo de alimentos.

Os constituintes de aromas produzidos comercialmente são regulamentados por legislações específicas. No caso da União Européia (EU) foi definido em seis classes de constituintes aromatizantes datados de 22/06/1988 (MATHEIS, 1997): substâncias aromatizantes naturais, substâncias aromatizantes idênticas às naturais, substâncias artificiais aromatizantes, preparações aromatizantes, reações aromatizantes e aromatizantes defumados.

Substâncias aromatizantes foram classificadas como as naturais, as idênticas as naturais; e as artificiais, que também apresentem propriedades de aromas.

As substâncias aromatizantes naturais são aquelas obtidas por processos físicos (destilação, extração) ou através de métodos enzimáticos ou microbiológicos (fermentação), a partir de material consumido por humanos (Tabela II, III e IV). Processos enzimáticos e microbiológicos são também conhecidos como biotecnológicos. Para isolar um flavorizante, através do processo biotecnológico, um segundo passo sempre será um processo físico (extração, destilação).

Na Tabela II, temos os materiais utilizados para a produção de aromas naturais e os tipos de processo (físico-químicos) empregados para a extração desses aromas naturais.

**Tabela II.** Seleção de matéria prima para a produção de aromas (MATHEIS, 1989).

<b>MATERIAL BRUTO</b>	
Óleos essenciais	Pressagem ou destilação (destilação a vapor) do material vegetal
Extratos	
Óleo-resinas	Extratos do material vegetal contendo óleos essenciais e resina
Tintura e percolatos	Extratos etanólicos
Absolutos	Extratos etanólicos de extratos concretos e outros
Concentrados	Extratos concentrados e sucos
Destilados	Extratos destilados e material vegetal (destilação etanólica)
Isolados	
Óleos livres de terpenos e sesquiterpenos	Óleos essenciais livres da maioria de terpenos e sesquiterpenos por destilação, extração ou cromatografia.
Terpenos	Compostos secundários obtidos nos óleos livres de terpeno
Substâncias químicas	Isolado por destilação, extração ou cromatografia

Na Tabela III há também os materiais para a produção de aromas naturais empregando métodos mais modernos como a extração em fluido supercrítico e processos biotecnológicos.

**Tabela III.** Matéria prima para a produção de aromas naturais por métodos atualizados (MATHEIS, 1989).

<b>MATERIAL BRUTO</b>	
Óleos essenciais recombinados	Recombinação de várias frações dos óleos essenciais obtidos por métodos físicos
Extratos de CO <sub>2</sub>	Extração da matéria vegetal com dióxido de carbono supercrítico
Substâncias produzidas biotecnologicamente	
Misturas complexas	Produzidas por microrganismos, enzimas, cultura de células de plantas.
Substâncias químicas únicas	Produzidos por enzimas ou fisicamente a partir das misturas.

Já na Tabela IV há uma correlação do material utilizado para o processo de produção de aroma natural e dos processos mais novos de produção de aroma, como os biotecnológicos. Essa correlação se faz de grande importância hoje para diversos processos industriais, para aromatização de alimentos.

**Tabela IV.** Substâncias utilizadas como aroma natural de condimentos e frutas (MATHEIS, 1989).

<b>MATERIAL TRADICIONAL</b> (obtido exclusivamente por processos físicos)	<b>MATERIAL NOVO</b> (obtido por processos físicos e biotecnológicos)
<b>Aroma de frutas</b>	
Óleo de citrus	Acetaldeído
Óleo de conhaque	Diacetil
Concentrados de suco de frutas	Ésteres (acetato de etila, cinamato de metila)
Geraniol	Furaneol
Óleo de amêndoa	Lactonas
<b>Aroma de condimentos</b>	
Óleo de citrus	Diacetil
Extratos vegetais	Ésteres (caprilato de etila)
Extratos de condimentos	Ácidos graxos (cadeia de 4-10 átomos de carbono).
Óleo de alho	Concentrados do aroma de queijo
Óleo de semente de aipo	Metil cetonas
Óleo de cebola	

As substâncias aromatizantes que são idênticas as naturais são obtidas por síntese química ou por isolamento. Elas precisam estar presentes em vegetais ou animais, e devem ser passíveis de serem consumidas por humanos. Um exemplo é o eugenol natural (isolado de cravo) que não difere do eugenol sintetizado quimicamente, tanto em relação a estrutura como ao odor, diferindo apenas quanto aos métodos de produção. Um outro exemplo, muito conhecido, seria a vanilina (MATHEIS, 1997).

Substâncias aromatizantes artificiais são aquelas que são obtidas, como as idênticas as naturais, por síntese química, mas a diferença está no fato de que não foram encontradas nem na matéria vegetal e nem no material animal para o consumo humano. Um bom exemplo para isso é a etil-vanilina. Ela apresenta o mesmo cheiro da vanilina natural, porém com o aroma duas ou três vezes mais forte do que a vanilina natural.

Preparações aromatizantes são produtos que são como as substâncias aromatizantes naturais, são obtidas por métodos físicos ou biotecnológicos, e não definidas

quimicamente como substâncias, mas como misturas de substâncias. Um exemplo familiar são os óleos essenciais, os extratos de ervas e condimentos, extrato de levedura, concentrados de suco de frutas. Embora a legislação tenha acrescentado a palavra natural às preparações aromatizantes, na verdade segundo a União Européia (EU) elas são ingredientes naturais.

Reações de aromatizantes são aromas produzidos por aquecimento de uma mistura de alguns ingredientes. Esses ingredientes podem ser os aminoácidos e/ou açúcares redutores.

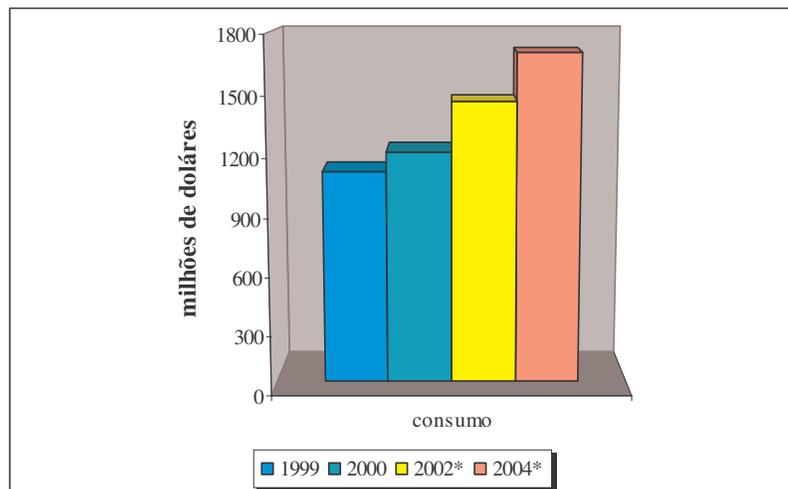
Aromatizantes defumados são preparações obtidas a partir de alimentos defumados

Outros ingredientes, que não participam como aromatizantes, são os solventes (para aromatizantes líquidos), substâncias carreadores de aromatizantes (para aromas em pó), modificadores e preservantes de aroma (substâncias antimicrobiais e antioxidantes) (MATHEIS, 1997).

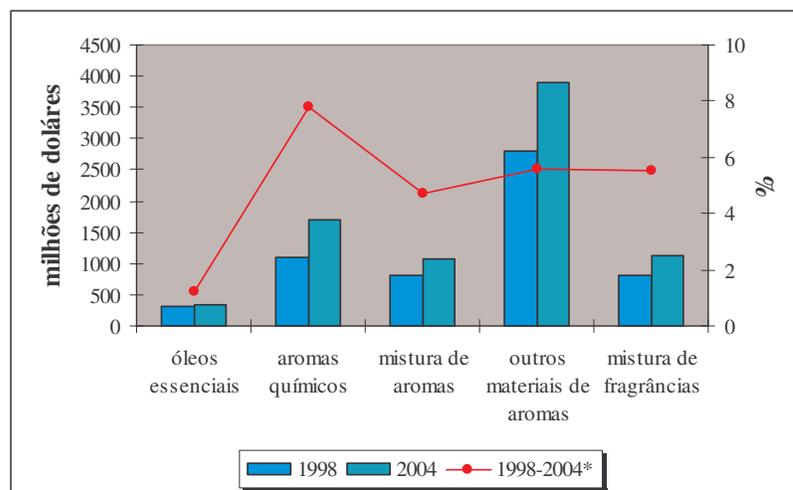
O mercado global de aromas é estimado em aproximadamente 25% do mercado de aditivos de alimentos, e pode ser dividido em U\$ 2,4 bilhões nos Estados Unidos, U\$ 3,6 bilhões na Europa Ocidental, U\$ 1,5 bilhões no Japão, e os outros países do mundo com U\$ 2,1 bilhões. Estas vendas são divididas em 14,8% de aromas químicos, 17,5% de óleos essenciais, 29,2% da composição de fragrâncias e 38,5% de composição de aromas (SOMOGYI, 1996).

Na Figura 5 temos o consumo (em milhões de US\$), nos EUA, de aromas químicos, que se apresentam como um mercado muito maior. Embora, na Figura 6, verificamos que além do mercado crescente de aromas químicos (com uma taxa de crescimento entre 1998 e 2004 de aproximadamente 8%), outros materiais de aromas têm apresentado um mercado muito maior. Embora apresente uma taxa de crescimento de aproximadamente de 6%, entre 1998 e 2004 (Figura 6) (PERFUMER & FLAVORIST, 2001).

A contribuição das empresas americanas (Tabela V) para o mercado de aromas é crescente embora das 10 empresas líderes apenas 4 empresas são americanas.



**Figura 5.** Consumo de aromas químicos nos EUA; e estimativa de crescimento (\*) (PERFUMER & FLAVORIST, 2001).



**Figura 6.** Consumo de aromas e fragrâncias, dos anos de 1998 e 2004 (estimativa); e média anual de crescimento entre 1998-2004 (\*-estimativa) (PERFUMER & FLAVORIST, 2001).

**Tabela V.** Empresas líderes no mercado de aromas (PINHEIRO e PASTORE, 2003).

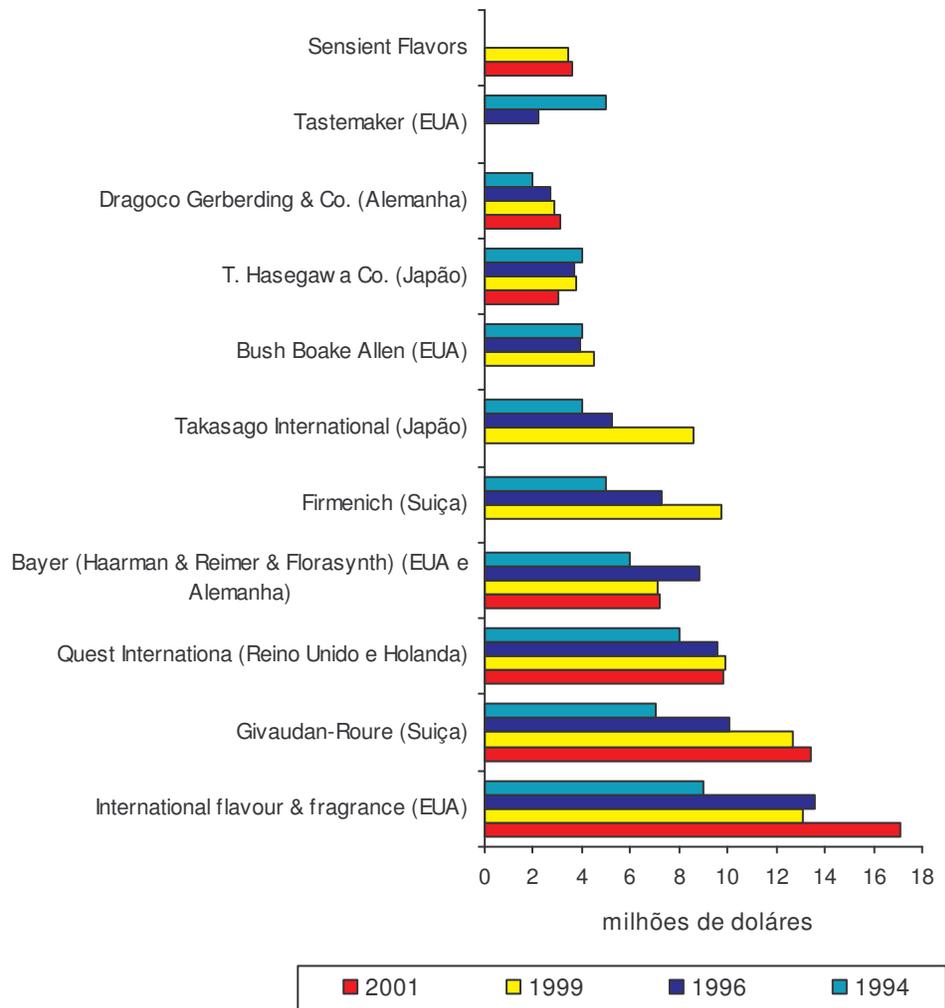
<b>EMPRESA</b>
International flavour & fragrance (EUA)
Givaudan-Roure (Suíça)
Quest International (Reino Unido e Holanda)
Bayer (Haarman & Reimer & Florasynth) (EUA e Alemanha)
Firmenich (Suíça)
Takasago International (Japão)
Bush Boake Allen (EUA)
T. Hasegawa Co. (Japão)
Dragoco Gerberding & Co. (Alemanha)
Tastemaker (EUA)
Universal Flavour (EUA)
V Mane Fils (França)
Ogawa & Co. (Japão)
Robertet (França)

<sup>a</sup> vendas de aroma e fragrância somente; não inclui vendas de produtos de fragrâncias e não aromas tais como aditivos de alimentos, especialmente como princípios de reagentes, sucos, sorvetes e bebidas.

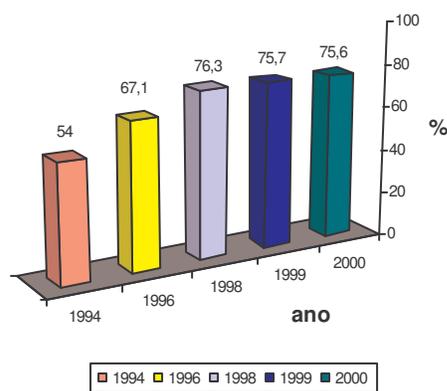
Existe um grande número de indústrias que comercializam aromas e fragrâncias, sendo que as 14 maiores empresas representam um total de 73,4% do total de vendas (SOMOGYI, 1996). Dentre essas, dez empresas são líderes do mercado mundial de aromas. A Tabela V e na Figura 7 apresentam essas empresas e mostram o comportamento individual ao longo do ano de 1994 ao ano de 2001.

Em relação ao mercado mundial que essas 11 empresas ocupam podemos verificar um aumento do ano de 1994 (54%) até o ano de 2000 (75,6%). Mas o mesmo não acontece entre o ano de 1998 (76,3%) e 2000 (75,6%), onde se verifica uma estabilidade de mercado dentre as 10 empresas líderes da produção mundial de aromas (Figura 8) (PINHEIRO e PASTORE, 2003).

Enquanto a soma do mercado das 10 empresas não se modificou ao longo dos anos podemos observar que entre algumas empresas, como a International Flavour & Fragrance (EUA), Firmenich (Suíça) e a Haarmann & Reimer (Alemanha) houve uma modificação ao

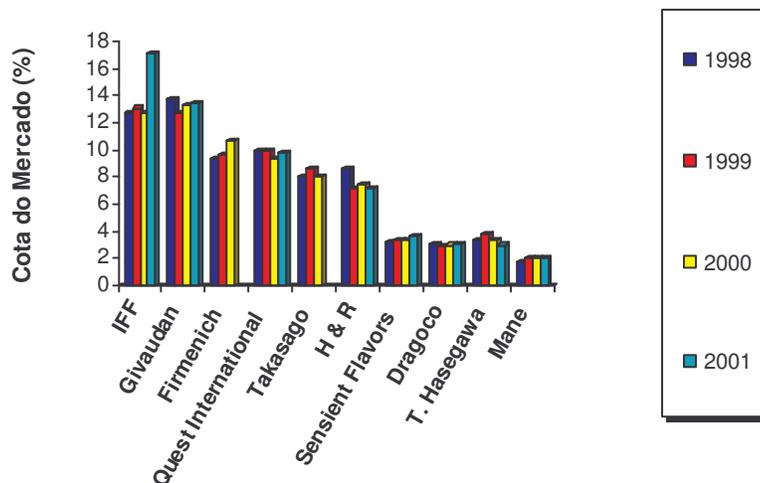


**Figura 7.** Mercado mundial das 11 empresas líderes de aromas e fragrâncias do ano de 1994 ao ano de 2001 (PINHEIRO e PASTORE, 2003).



**Figura 8.** Mercado mundial das 10 empresas líderes do ano de 1994 ao ano de 2000. (PINHEIRO e PASTORE, 2003).

longo dos anos de 1998 a 2001. Essa modificação se mostra mais acentuada na International Flavour & Fragrance (EUA) no ano de 2001, quando essa empresa teve um aumento de mercado de aproximadamente 4% (Figura 9) (PINHEIRO e PASTORE, 2003).



**Figura 9.** Cota de mercado de cada uma das 10 empresas líderes do mercado mundial de aromas e fragrâncias (PINHEIRO e PASTORE, 2003).

Embora exista um grande mercado para a indústria de aromas e fragrâncias e já exista um grande número de compostos identificados, não há uma relação desses compostos e os produtos empregados nessas indústrias. Isso se deve principalmente ao fato de que os aromas são misturas muito complexas e muitas vezes difíceis de serem reproduzidos (Tabela I).

Uma das forças que impulsionaram as indústrias está relacionada à demanda por produtos naturais que sejam adequados para o ambiente e bons para a saúde. Produtos obtidos por processos biotecnológicos são preferenciais porque são considerados naturais ou idêntico aos naturais, estéreo-quimicamente puros e muito mais fáceis de serem biodegradados. Este contraste é grande quando comparamos com os métodos tradicionais, processo de síntese química, os quais se obtém produtos racêmicos e que não são facilmente biodegradáveis.

Modificações no aroma durante o processamento e preparo de alimentos, como durante o cozimento no microondas ou no preparo de alimentos congelados fazem com que haja uma perda no aroma dos mesmos. Para isso há a necessidade de um grande número de

aromas de frutas, vegetais, carnes e até de flores que devem ser adicionadas a tal produto para restabelecer seus níveis de aroma e melhoria da qualidade de cada produto.

Além disso, o consumidor quer um produto que seja saudável e que apresente baixo conteúdo de sal, açúcar e gordura e que apresente alto teor de fibras, vitaminas e antioxidante, além de saboroso.

## **2.2. Importância dos microrganismos nos processos de biotransformação.**

Os microrganismos desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (CANHOS, 2003).

Os microrganismos e invertebrados constituem aproximadamente 90% das espécies da Terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento de ecossistemas. Embora se conheça 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na natureza, conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus e menos que 5% dos fungos. Em termos das bactérias (STALEY, 2003) conhece-se menos do que 5.000 bactérias embora estima-se de que existam entre 100.000 a mais de um milhão. Já segundo PELCZAR *et al.* (1993), existem no solo, aproximadamente entre 3milhões a 500 milhões de bactérias; 1 milhão a 20 milhões de actinomicetes; 5mil a 900mil fungos; e mil a 100mil leveduras.

Segundo DIAS (2003), o Brasil é o país com maior biodiversidade com aproximadamente 10-20% do número total de espécies de microrganismos do planeta. O mesmo autor relata que a biodiversidade brasileira ainda não é conhecida totalmente devido à sua grande complexidade, que está diretamente relacionada às dimensões continentais do país e de sua enorme plataforma marinha. Mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos no território estão sob a jurisdição brasileira (DIAS, 2003).

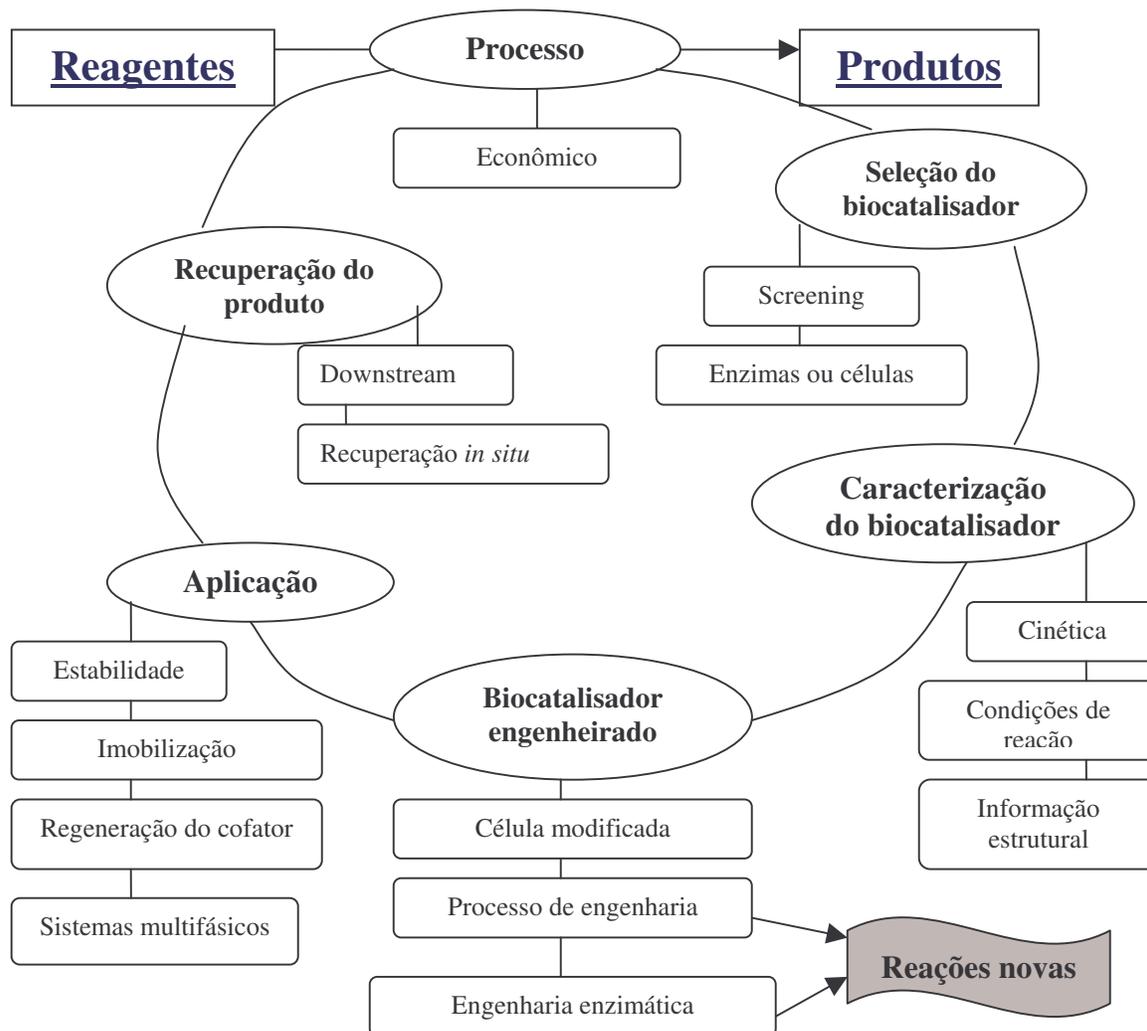
Os microrganismos caracterizados, existentes no planeta, são os responsáveis pelos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura, como consequência das

descobertas nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A participação dos produtos obtidos a partir das atividades microbianas no mercado global pode atingir US\$ 40 bilhões ao ano (CANHOS, 2003), sendo essa exploração ainda incipiente.

Os microrganismos apresentam potencial para a utilização na obtenção de produtos biotecnológicos como: a produção de antibióticos (estreptomicina, penicilina), produção de alimentos (cogumelos), processamentos de alimentos (queijo, iogurte, vinagre), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol), alimentos fermentados (molho de soja), tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo); na agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (controle da lagarta da soja, da cigarrinha da cana-de-açúcar) e produção de compostos de aromas (anisaldeído, álcool 2-feniletanol, coumarinas, benzaldeído) (CANHOS, 2003; BERGER, 1995).

KIELISCH (1984a) e CHEETAM (1997) apontam como uma das principais etapas nos processos de biotransformação a seleção de microrganismos. Esse fato está relacionado aos substratos utilizados nas reações de biotransformação, os quais são insolúveis em meio aquoso. Além disso, essas biotransformações precisam ser economicamente mais viáveis do que quando comparadas aos processos químicos. SCHMID *et al.* (2001) mostraram que há uma necessidade pela procura por microrganismos diferentes dos já utilizados e que possam realizar biotransformações em substituição aos processos químicos. Essas biotransformações podem ser enzimáticas ou com a utilização das células dos microrganismos. SCHMID *et al.* (2001) mostram a preocupação de empresas como BASF, DSM e LONZA, em substituir processos químicos por biotecnológicos, utilizando enzimas ou microrganismos. Essa utilização de processos biotecnológicos se confronta com um fator preponderante que é o custo do processo. Dessa maneira, essas empresas precisam adequar os seus processos industriais à utilização de enzimas ou microrganismos que apresentem rendimentos altos, e com produtos de fácil recuperação, aliado ainda à redução de custos. Esta adequação a um processo novo pode ser monitorada através do ciclo do biocatalisador (Figura 10) (SCHMID *et al.*, 2001).

MIKAMI *et al.* (1981) realizaram uma seleção de 1018 microrganismos, de várias coleções de cultura, capazes de biotransformar a  $\alpha$ - e  $\beta$ -ionona em outros compostos de



**Figura 10.** Ciclo do biocatalisador a ser utilizado em processos de biotransformações industriais (SCHIMID *et al.*, 2001).

aroma. As bactérias eram capazes de consumir as iononas, mas não acumulavam nenhum composto de aroma, no meio de cultura. Todas as leveduras foram capazes de converter as iononas em pequenas concentrações (5%). Os fungos (18), dentre eles cepas de *Aspergillus*, *Phialophora* ou *Rhizopus*, foram capazes de converter as iononas ( $\alpha$ - e  $\beta$ -ionona). A cepa de *Aspergillus* foi a selecionada por apresentar a melhor produção dos compostos de aroma.

Três cepas de *Botrytis cinérea*; 5901/2, 5901/1 e 5899/4; foram utilizadas para a biotransformação do linalol, a fim de estudar o caminho metabólico para a formação dos óxidos de linalol nas formas furanóides e piranóides (BOCK *et al.*, 1986). Essas cepas de *Botrytis cinérea*, e a 5882/1, foram utilizadas também para a biotransformação do citronelol, em meio sintético e mosto de vinho (BRUNERIE *et al.*, 1987). Os autores propuseram um caminho metabólico para a transformação do citronelol por este microrganismo.

ROSAZZA *et al.* (1987) verificaram a capacidade de diferentes microrganismos para transformar o 1,4-cineol. O experimento inicial de seleção utilizou 104 espécies de bactérias, fungos e leveduras (de 39 gêneros), entre elas: *Aspergillus* (19 espécies); *Bacillus* (6 espécies); *Candida* (7 espécies), *Cunninghamella* (5 espécies); *Penicillium* (7 espécies), *Rhodotorula* (3 espécies) e *Streptomyces* (16 espécies). Destas, 27 culturas foram capazes de transformar o 1,4-cineol, em 96 horas, a uma variedade de metabólitos. *Streptomyces griséus* (ATVV 10137) foi o microrganismo que transformou o 1,4-cineol, em maior concentração, em 8-hidroxi-1,4-cineol, e os 2-exo- e 2-endo-hidroxi-1,4-cinéois.

ASAKAWA *et al.* (1991) utilizaram diferentes espécies de *Aspergillus* para transformar o (-)- e (+)-mentol, terpinoleno e carvotanacetona. *Aspergillus niger* foi capaz de converter o (-)-mentol em 1-, 2-, 6-, 7- e 9-hidroximentol e no 8-hidroximentol, o qual é repelente de mosquitos. *Aspergillus cellulosa* transformaram especificamente o (-)-mentol em 4-hidroximentol. O terpinoleno e (-)-carvona foram convertidos por *A. niger* em 2 cetonas insaturadas, -mentano-2,9-diol, e 8-hidroxicarvomentol.

BUSMANN e BEGER (1994) utilizaram os seguintes basidiomycetos para a transformação do mirceno: *Mycena pura* I Nr 817, *Marasmius alliaceus* Nr 413, *Pleurotus sapidus* P226-1; *Pleurotus sajor-caju* P225-3, *Pleurotus flabellatus* P127-2, *Pleurotus cornucopiae* P 125-7, *Lentinula edodes* A 20-5, *Pholiota squarrosa* CBS 570.87, *Hericium erinaceus* CBS 260.74, *Meripilus giganteus* CBS 561.86, *Grifola frondosa* CBS 480.63, *Ganoderma applanatum* CBS 250.61 e *Trametes hirsuta* CBS 282.73. Dentre elas a cepa de *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus flabellatus* e *Pleurotus sajor-caju* apresentaram a maior produção de compostos voláteis oxigenados.

VAN RENSBURG *et al.* (1997) isolaram 4 leveduras capazes de hidroxilar os monoterpenos, limoneno e piperitona. SPEELMANS *et al.* (1998) isolaram a partir de lodo, por técnica de enriquecimento usando 5% de limoneno, como única fonte de carbono, a *Pseudomonas putida*. VAN DER WERF *et al.* (1999) também utilizaram a técnica de enriquecimento para isolamento de *Rhodococcus erythropolis* DCL14 para a transformação do limoneno.

Amostras de solo, 160, de cinco diferentes áreas, de plantação de vegetais, bambu, arroz e plantas medicinais foram coletadas em Chian Mai na Tailândia, para transformar cortexolona e hidrocortisona (MANOSROI *et al.*, 1999). Cepas de fungos, *Cunninghamella blakesleeana* SRP I e II, foram capaz de produzir hidrocortisona a partir de cortexolona; e 3 cepas de bactérias, *Bacillus* sp., *Bacillus sphaericus* SRP I, II e III produziram prednisolona a partir de hidrocortisona.

MOLINARI *et al.* (1999) utilizaram 13 diferentes cepas de *Acetobacter* e uma cepa de *Gluconobacter oxydans* NCIMB 8035 para transformar, por oxidação, o 2-feniletanol em fenilacetaldéido. As cepas selecionadas foram *Acetobacter* sp. ALEF e *Acetobacter* ALEG.

SHIMONEI *et al.* (2000) isolaram microrganismos do solo, em Israel, para transformar o isoeugenol em vanilina. Cinco cepas, B1, B2, B3, B4 e BS6A acumularam vanilina a partir de eugenol.

DEMYTTENAERE *et al.* (2001a) utilizaram 60 cepas de fungos como *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. roqueforti*, *P. lividum*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Botrydioplodia malorum*, *Rhizopus oryzae*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella elegans*, *C. blakesleeana*, *Hyphozima roseoniger*, *Corynespora cassiicola*, *Chaetomiun cochliodes* e *Mortirella* sp.; para selecionar o *Aspergillus niger* como o melhor fungo produtor dos óxidos (nas formas cis e trans dos furanóides e piranóides) de linalol utilizando como substrato o linalol.

Essas cepas de fungos foram ainda utilizadas (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001b) para a biotransformação do limoneno. Nesse trabalho foram selecionadas as cepas de *Penicillium digitatum* e *Corynespora cassiicola*.

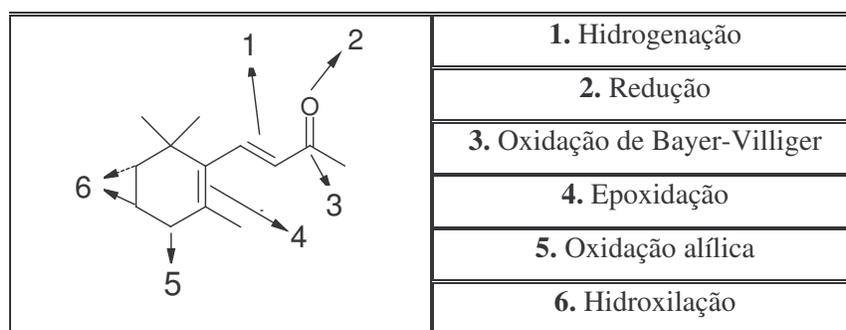
### 2.3. Processos de Biotransformação.

As biotransformações são capazes de catalisar a transformação do substrato em um único passo, enquanto que nas bioconversões as transformações acontecem em várias etapas de reação.

Além disso, faz-se necessário diferenciar a fermentação e a biodegradação da biotransformação. A fermentação acontece em algumas etapas catalíticas entre o substrato e o produto, sendo que estes não necessariamente se assemelham. A biotransformação é a catálise entre substrato e produto acontecendo em uma ou duas etapas, e o produto se assemelha ao substrato. E a biodegradação é a completa decomposição do material em estudo (VASIC-RACKI, 2000).

A transformação de terpenóides pode resultar em um ataque de alguns sítios das moléculas levando a uma mistura de metabólitos. O acúmulo de um único produto é raro. Há a indicação de que novas enzimas possam ser induzidas por metabólitos ou por uma alteração da membrana celular pelo substrato (BERGER, 1995).

O sítio de transformação no terpenóide é um caso de especulação como no caso de compostos orgânicos. Generalizações ou analogias são algumas vezes impossíveis, exceto quando as estruturas moleculares são semelhantes. Esses sítios na molécula de um terpeno ou terpenóide podem ser previstos como no caso da biotransformação da  $\beta$ -ionona na Figura 11 (KIESLICH, 1984b).



**Figura 11.** Sítios de transformação da  $\beta$ -ionona por *Lanodiplodia theobromae* (KIESLICH, 1984b).

As especificidades e condições fisiológicas das reações químicas favorecem a sua aplicação na área de aroma. A biocatálise compete com a catálise química, tanto na área de aromas como na transformação de outros compostos, nos seguintes tipos de reação: funcionalização de carbonos inertes quimicamente; modificação seletiva de um grupo funcional em moléculas multifuncionais; introdução de quiralidade; e a resolução de racematos (BERGER, 1995).

Fungos filamentosos e procariotos mostram uma preferência em converter terpenos voláteis. O número de gêneros especializados neste metabolismo é surpreendentemente pequeno. Leveduras, com algumas exceções, não são aplicáveis a bioconversões. Mecanismos eucarióticos são mais sensíveis e precisam de um passo de adaptação. Os locais ao redor de plantas que produzem terpeno precisam ser considerados como um habitat ecológico de cepas adaptadas (BERGER, 1995).

As importantes técnicas biológicas para o desenvolvimento dos processos de biotransformação estão relacionadas: com a seleção dos microrganismos a serem utilizados; a engenharia genética e a mutação; a bioquímica de como as enzimas trabalham, a fisiologia e o metabolismo microbiano; propriedades físico-químicas além dos processos de purificação e isolamento dos compostos; e a análise dos compostos (CHEETAM, 1997).

A seleção de microrganismos depende principalmente do procedimento de isolamento de microrganismos e/ou cepas para serem utilizadas de acordo com o substrato a ser modificado. Após essa etapa, a engenharia genética e a mutação podem ajudar a aumentar o rendimento de um determinado microrganismo, muito embora esse procedimento seja difícil de ser empregado nas indústrias principalmente, à instabilidade do microrganismo modificado (CHEETHAM, 1995).

A fisiologia e o metabolismo microbiano são de importância vital para o entendimento dos resultados e o encaminhamento das transformações, assim como na etapa seguinte, é importante que as propriedades físico-químicas do produto e os processos de purificação e isolamento dos compostos sejam caracterizados.

As desvantagens da obtenção dos compostos de aroma, a partir das técnicas tradicionais, estão relacionadas ao fornecimento das plantas, às restrições legais, aos requerimentos estereo-químicos e aos avanços na bioquímica celular e na bioengenharia.

As desvantagens das fontes agrícolas são devidas principalmente aos efeitos geográficos, sazonais, pragas, instabilidade sóciopolítico e estado de maturação da planta. Essas instabilidades são as maiores desvantagens nesse mercado crescente (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9) (JANSSENS *et al.*, 1992). Além disso, os componentes de impacto estão presentes em quantidades mínimas e podem estar em formas conjugadas, criando um problema a mais: o econômico. Por isso a biotecnologia aparece como alternativa, uma vez que o fornecimento constante de aromas e a sua independência em relação aos problemas agrícolas são os principais motivos em relação às técnicas já mencionadas (KIESLICH, 1984a; BERGER, 1995).

A destilação a vapor de partes de plantas é capaz de produzir óleos essenciais, dos quais os terpenóides são os seus principais componentes (QUINIESSENCE AROMATHERAPY, 2001). Mas as concentrações de terpenos quanto de terpenóides podem ser baixas, em algumas plantas, mas em outras se constituírem os seus principais componentes. Como por exemplo, o geraniol, que está presente em altas concentrações e, nas respectivas plantas: na Palmarosa (Índia) 5 (79,19%) (SIDDIQUI e GARG, 1990); em *Geranium*, Bourbon 11 (18,10%) (SOUTHWELL *et al.*, 1995); na Rosa (Bulgária) 3a (16,50%) (BOELENS e BOELENS, 1997); e em pequenas concentrações, em Juniper berry 8 (0,60%) (SCHILCHER *et al.*, 1993); em limão (Itália-Sicília) 10 (0,02%) (DELLACASSA *et al.*, 1995); em laranja, doce (Itália) 5 (0,01%) (DUGO *et al.*, 1994); e em *Lavender angustifolia* (Lituânia) (0,01%) (VENSKUTONIS *et al.*, 1997).

Na Comunidade Européia (EU), a produção e a rotulação de aromas para alimentos são realizadas através de diretivas, as quais têm sido adotadas como lei nacional. Na Alemanha, isto é realizado pela Aromenverordnung (Regulamentação de aromatizante). Nessas legislações, e também nos Estados Unidos, houve uma incorporação do termo “aroma natural” para aqueles aromas produzidos a partir de fontes biológicas, células vivas, incluindo fungos e suas enzimas. Este desenvolvimento do processo biotecnológico usando microrganismos e suas enzimas para a produção de aromas naturais fornecem uma possibilidade de troca de estratégia para a indústria de aromas. A elucidação do caminho biossintético envolvido na produção de aroma pode permitir uma expressão pelos caminhos da engenharia genética. Entretanto, organismos modificados geneticamente são muito

difíceis de serem introduzidos no mercado devido a falta de legislação específica (LAMBASCOLO *et al.*, 1999).

A grande vantagem da síntese de aromas via ação microbiana é que um composto biossintetizado recebe o rótulo de “natural”, não sintético, o que promove grande aceitação no mercado quando comparado com um produto sintetizado (TAN *et al.*, 1997).

Uma outra vantagem da biossíntese em comparação com a síntese química é que a segunda produz quantidade de resíduos industriais muito maior que a primeira. Além do fato de que os resíduos da biotransformação são obtidos em menor escala e são biodegradáveis. Logo a síntese utilizando microrganismos promove uma menor poluição do meio ambiente.

Ainda como vantagem da biossíntese microbiana quando comparada a reações químicas temos a estrita natureza régio- e estéreo-seletiva das reações enzimáticas, o que permite um direcionamento do sistema para obtenção de um produto definido, acabando por otimizar o processo. Isto pode ser significativo na produção de aromas em que enantiomêros diferentes apresentam características diferentes.

Biocatálise em síntese orgânica possui uma longa história com algumas transformações, tendo sido documentadas no século 18, voltando a crescer no século 20. Algumas dessas permanecem úteis até hoje (JONES e WONG, 1998).

### **2.3.1. Processos de biotransformação de drogas e inseticidas.**

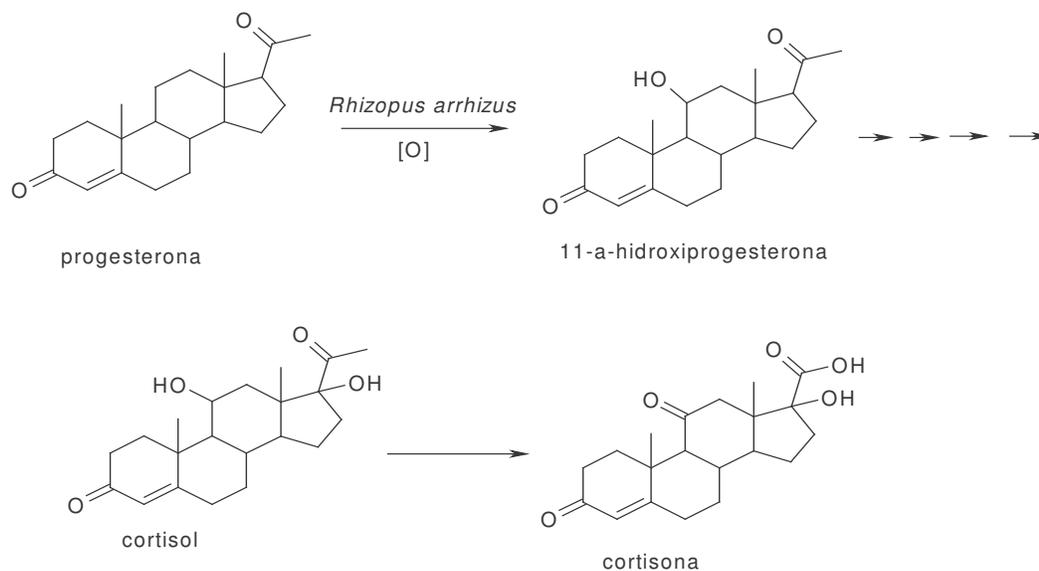
Embora as primeiras biotransformações sejam utilizadas em escala de produção (Tabela VI), elas precisaram de alguns anos para que realmente tivessem significados. A descoberta das transformações microbianas de esteróides facilitou aos processos de biotransformações, de outros tipos de moléculas, hoje utilizadas, em escala industrial. Dentre essas transformações de esteróides, segundo KIESLICH (1984a), temos os seguintes processos: redução da androstenediona à testosterona através de leveduras; a hidroxilação na posição 11- $\alpha$  da progesterona por *Rhizopus arrhizus*; introdução de uma ligação dupla

$\Delta^1$  na 3-ceto-4-enesteróide por *Corynebacterium simplex*; a hidroxilação na posição 11- $\beta$  de C21-esteróides por *Curvularia lunata* e hidroxilação de 9- $\alpha$  flúor-hidro cortisona por *Streptomyces roseochromogenes*.

**Tabela VI.** Transformações microbianas industriais operantes (VASIC-RACKI, 2000).

<b>Operação desde</b>	<b>Biotransformação</b>	<b>Empresa</b>
1823	Bactéria imobilizada para a produção de vinagre através da oxidação do etanol.	várias
1930	L-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol obtido a partir da transformação por levedura.	Knoll AG - Alemanha.
1934	L-sorbose pela bactéria <i>Acetobacter suboxydans</i> .	Várias.
1955	Prednisolona através do microrganismo <i>Arthrobacter simplex</i> .	Schering AG, Alemanha.
1958	Ácido L-aspártico por <i>Escherichia coli</i> .	Tanabe Seiyaku Co. – Japão.
1970	Ácido 7-amino-desacetoxicefalosporânico (7-ADA), por <i>Bacillus megaterium</i> .	Asahi Chemical Industry – Japão.
1974	Ácido L-málico por <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> .	Tanabe Seiyaku Co. – Japão.
1983	D-p-hidroxifenilglicina por <i>Pseudomonas striata</i> .	Kanegafuchi Chemical Co. – Japão.
1985	Acrilamida por <i>Rhodococcus</i> sp..	Nitto Chemical Ltd.
1988	Ácido D-aspártico e L-alanina por <i>Pseudomonas dacunhae</i> .	Tanabe Seiyaku Co. – Japão.
1993	L-carnitina por <i>Agrobacterium</i> sp..	Lonza - República Tcheca.
1999	Ácido 2-ceto-L-gulônico.	BASF, Merck e Cerestar.

Essas transformações microbianas simplificaram e aumentaram a eficiência da síntese em múltiplos passos, como o caso da síntese do acetato de cortisona a partir do ácido deoxicólico. Essa síntese química apresentava 31 passos, e era possível obter 1Kg do acetato de cortisona a partir de 615Kg do ácido deoxicólico. Quando a 11- $\alpha$ -hidroxilação da progesterona foi realizada por microrganismos (Figura 12). Isto foi capaz de reduzir o preço da cortisona de 200 US\$/g para 6 US\$/g (VASIC-RACKI, 2000).



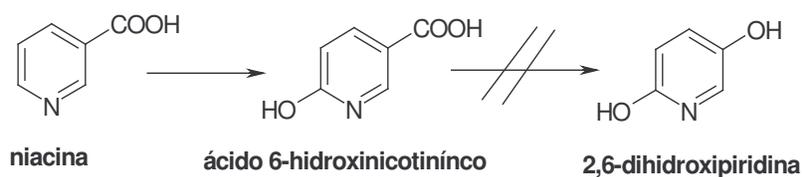
**Figura 12.** Obtenção de cortisona através da biotransformação por microrganismo.

Ainda em conseqüência das biotransformações de esteróides, diversas transformações de substratos foram e são utilizadas nas quimiossínteses. A empresa suíça LONZA é especializada na produção de compostos químicos, incluindo N-heterocíclicos. Essa empresa têm sido responsável pelo desenvolvimento de várias rotas biocatalíticas para a produção de N-heterociclos aonde a síntese química se mostra ineficiente. Na Tabela VII há o exemplo de algumas dessas biotransformações, com células de microrganismos, que foram propostas por essa empresa e que se encontram em escala de produção (SCHMID *et al.*, 2001).

A síntese de inseticidas na atualidade têm sido possível através da biotransformação da niacina (processo 1, Tabela VII). Esse processo tem substituído a síntese química que resulta num preço completamente proibitivo desses inseticidas além dos produtos secundários obtidos. Enquanto que com a biotransformação utilizando o microrganismo *Achromabacter xylosoxidans* apresenta um rendimento de 90% da reação (KULLA, 1991). Além disso, se a concentração do substrato, niacina, for maior do que 10g/L há uma inibição da formação da 2,6-hidroxipiridina, inibição da 6-hidroxinicotinato hidroxilase, mas que não afeta a atividade da niacina hidroxilase.

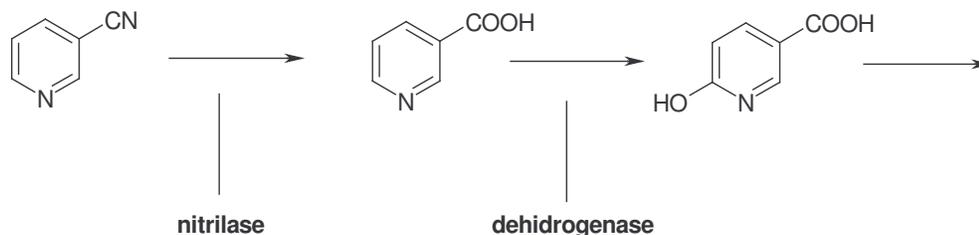
**Tabela VII.** Desenvolvimento recente de biotransformações industriais com células de microrganismo pelo setor industrial.

Microrganismo	Escala (toneladas/ano)	Rendimento
1. <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	algumas	65g/L

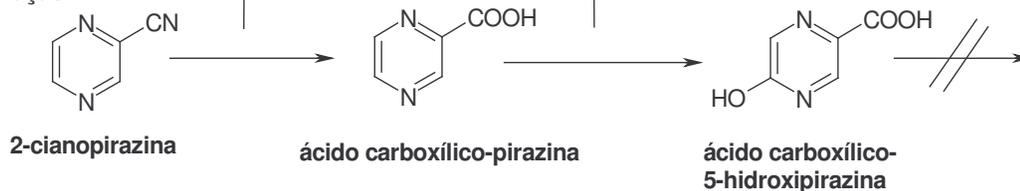


2. <i>Agrobacterium</i> DSM 6336	Produto em desenvolvimento	40g/L
----------------------------------	----------------------------	-------

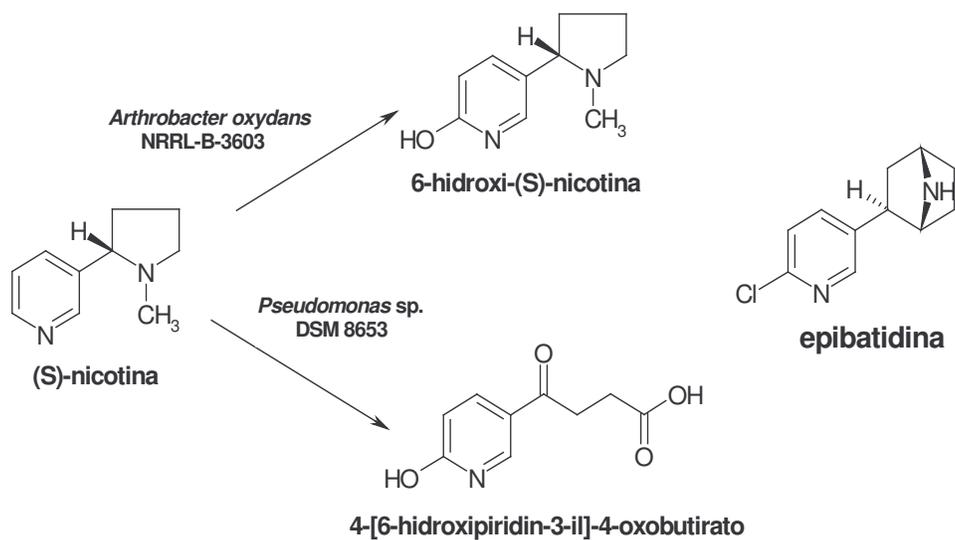
crescimento:



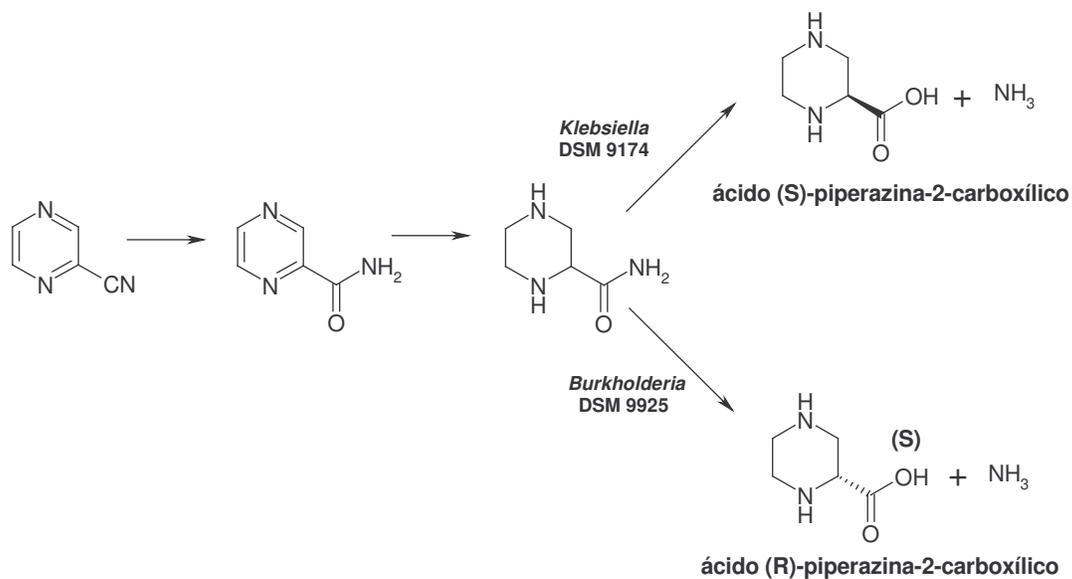
biotransformação:



<b>Microrganismo</b>	<b>Escala (toneladas/ano)</b>	<b>Rendimento</b>
3. <i>Arthrobacter oxydans</i> NRRL-B-3603	Produto em desenvolvimento	30g/L
4. <i>Pseudomonas</i> sp. DSM 8653	Produto em desenvolvimento	15g/L

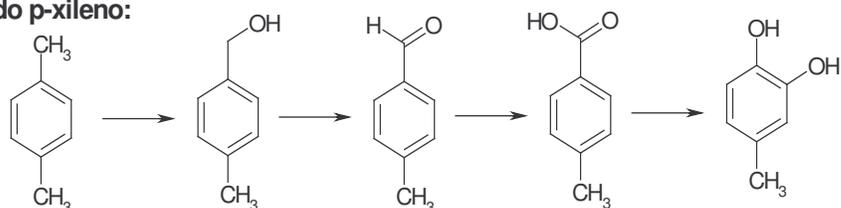


5. <i>Klebsiella</i> DSM 9174 <i>Burkholderia</i> DSM 9925	Produto em desenvolvimento	9g/L
---	----------------------------	------

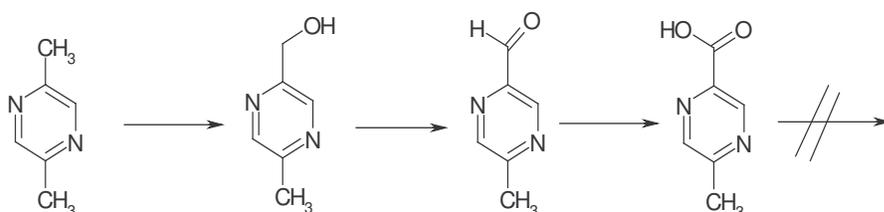


Microorganismo	Escala (toneladas/ano)	Rendimento
6. <i>Pseudomonas putida</i>	Algumas	20g/L

degradação do p-xileno:



oxidação da específica de 2,5-dimetilpirazina:



Um novo composto antituberculose, ácido carboxílico 5-hidroxi-pirazina, têm sido obtidos a partir da biotransformação da 2-ciano-pirazinas por células de *Agrobacterium* (processo 2, Tabela VII). Esse composto apresentou atividade 1000 vezes maior do que os outros compostos já existentes contra *Mycobacterium* sp.. Para essa biotransformação foi necessária que o microrganismo *Agrobacterium* sp. DSM 6336 crescesse primeiramente em 2-cianopiradina como fonte de carbono e nitrogênio, para a bioconversão em seguida (WIESER *et al.*, 1997).

(S)-nicotina, que está presente em 2-8% das folhas de tabaco secas, é utilizada como matéria prima para a produção de piridinas a partir de fontes renováveis. Estas são os precursores para a epibatidina, composto bastante efetivo como analgésico, que é produzido por uma rã. Essa funcionalização da nicotina no anel pirimidínico ou pirimidínico é de difícil controle por síntese química. Embora se tenha conhecimento que vários microrganismos utilizem a nicotina como fonte de carbono e nitrogênio, este não têm sido empregado para a biotransformação e obtenção de novos análogos da nicotina (processos 3 e 4, Tabela VII).

(S)-análogos do processo 5 (Tabela VI) são utilizados como inibidores da HIV protease, Crixivan, da Merck. Neste processo isolaram-se microrganismos a partir de amostras de solo contendo carboxamida racêmica, como fontes de nitrogênio e usada como fonte de enriquecimento. Essa procura por amidases estéreo-seletivas resultaram em *Klebsiella terrigena* DSM 9174 e *Burkholderia* sp. DSM 9925. O excesso enantiomérico para ambos os ácidos piperazina-2-carboxílicos foram maiores do que 99%. (EICHHORN *et al.*, 1997).

Reações de oxidação química usada para a produção em escala industrial de ácidos monocarboxílicos heteroaromáticos a partir de compostos heteroaromáticos são freqüentemente não específicas, levando a vários produtos secundários. LONZA conseguiu desenvolver um método biológico para este tipo de reação, aonde a cepa selvagem de *Pseudomonas putida* ATCC 33015, capaz de crescer em p-xileno como única fonte de carbono e nitrogênio foi utilizada. Esse caminho de degradação do p-xileno têm sido extensivamente estudado, e sabe-se, portanto que, a partir de p-xileno chega-se por biotransformação a 4-metil-catecol. Esse produto será então clivado no anel aromático e os seus respectivos produtos de biotransformação em intermediários do ciclo de Krebs. LONZA descobriu que *P. putida* previamente crescida em p-xileno seria capaz de oxidar alguns anéis com 5 ou 6 metilas substituídas no anel sem realização da decarboxilação ou hidroxilação do anel. No processo 6 (Tabela VII) há a produção do ácido 5-metil-pirazina-2-carboxílico um composto anti-lipolítico. A maior concentração de produtos e altos rendimentos são obtidos com células em crescimento, aonde se fornece 75% xileno e 25% de 2,5-dimetil-pirazina, tendo-se após 54 h, 20g/L de ácido 5-metil-2-pirazina carboxílico (SCHMID, 2001).

Outras biotransformações têm sido empregadas, como a formação de contraceptivos e outros derivados de hormônios esteroidais. Os substratos básicos têm sido derivados a partir de fitoesteróis naturais de soja (mistura de  $\beta$ -sitosterol (40%), campesterol (25%) e estigmasterol (25%)) a partir de coníferas; e de óleo de colza ( $\beta$ -sitosterol (45%), campesterol (15%) e de brassicasterol (12%)). A Schering Alemã (Berlim e Bergkamers) usou essas fontes naturais com mutantes de *Mycobacterium* sp. para a produção de androsten-diona e androsta-dien-diona em escala de 200m<sup>3</sup>. O mercado

mundial excede 1000 toneladas/ano. Estes esteróides são utilizados para subseqüentes sínteses químicas e biotecnológicas de compostos. Hidroxilações com *Curvularia* sp. nas posições 11- $\alpha$  e 11- $\beta$ ; dehidrogenações  $\Delta$ -1-posição da hidrocortisona a prednisolona; e reduções são processos da ordem de 100 toneladas/ano na Schering (REIPA et al, 1997).

CERTIK e SHIMIZU (1999) têm desenvolvido eficientes sistemas baseados em fungos para a produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Estes são importantes para o organismo humano, são precursores de prostaglandinas, leucotrienos e hidroxi-ácidos graxos.

Kyona Hakko Kogyo Ltd., no Japão, tem produzido oligossacarídeos com alta produtividade, maior concentração de produto e alto rendimento, em escala de metro cúbico. Um desses produtos é a globotriose numa produção de 188g/L e com produtividade de 5,22g/L.h (KOIZUMI *et al.*, 1998).

Análises de custo para a oxidação do n-alcano a n-alcanol, em sistema bifásico, por bioconversão com células de microrganismo, seguida por separação de fase, apresentam um custo da ordem de 8 US\$/Kg de produto tanto para a produção em batelada quanto para o processo contínuo. Isto baseado em escala de produção da ordem de 1000 toneladas/ano, necessitando de volumes de bioreator de 800 a 2.000 m<sup>3</sup>, unidade da fase de separação, destilação do substrato e produto, a partir do carreador do solvente e separação final do produto do substrato (MATHYS *et al.*, 1999).

A distribuição de custo segue os seguintes parâmetros: 20% substratos e solventes; 18-22% depreciação e manutenção de equipamentos; 10% de energia; 5% de desperdício; 2% com pessoal (SCHMID *et al.*, 2001). Sendo os maiores custos, os sais do meio de cultura e a fonte de carbono (glicose) a qual conta com 40% de todo o custo devido a limitação da atividade biocatalítica e o tempo de vida do biocatalisador (SCHMID *et al.*, 2001).

Atualmente, as biotransformações podem apresentar como vantagens (BERGER, 1995) a modificação específica da estrutura do substrato via reações de transformação; degradação parcial de substratos em metabólitos importantes através do controle dos caminhos das reações microbianas e extensão da estrutura do substrato pelo uso de reações de biossíntese a estruturas artificiais.

### 2.3.2. Processos de biotransformação para a produção de aromas.

As dificuldades encontradas na transformação de terpenóides são devido ao fato de que alguns microrganismos selecionados transformam ou degradam os substratos numa grande variedade de compostos não usuais ou metabólitos de difícil separação. Além disso, os terpenóides podem ser perdidos através da forte aeração, especialmente em tanques profundos de fermentação (BERGER, 1995; VAN DER WERF *et al.*, 1997).

Sabe-se que  $2,8 \times 10^5$  Kg de terpenos são consumidos anualmente no mundo todo (WELSH *et al.*, 1989). Dentre os terpenos, os monoterpenos estão presentes predominantemente em óleos essenciais. Eles são usualmente separados a partir da retificação dos óleos devido ao baixo teor de atividade, alta hidrofobicidade, e a alta tendência a auto-oxidação e polimerização. Isto torna os terpenos abundantes, tais como  $\alpha$ -pineno e limoneno, rejeitos industriais e substratos baratos para transformações químicas e bioquímicas.

Os monoterpenos são hidrocarbonetos formados a partir de duas unidades de isopreno, e são encontrados em plantas, tendo sido identificados mais de 400 diferentes terpenos. Os derivados de terpenos, os terpenóides, apresentam agradável aroma, sendo alguns deles reconhecidos como GRAS (sigla que vem do inglês “generally recognized as safe”, que significa seguro). Esse reconhecimento possibilita o uso desses compostos em alimentos, quando obtidos de fontes naturais. Geralmente o preço desses terpenos é bastante baixo, da ordem de US\$ 2-4/Kg (VAN DER WERF *et al.*, 1997).

A biotransformação de monoterpenos apresenta um papel bastante importante, embora não existam, segundo VAN DER WERF *et al.* (1997), processos industriais de real importância.

Ao contrário da utilização da biotransformação em esteróides, a biotransformação de terpenos têm sido negligenciada pelas indústrias. Essa dificuldade se deve a incompatibilidade dos substratos lipofílicos com os cultivos em meio aquoso; a geração de produtos secundários, levando a perda da probabilidade de reação. Além disso, a instabilidade química, a volatilidade e a toxicidade dos monoterpenos; degradação dos produtos, longos tempos de incubação, pequeno tempo de vida do biocatalisador; e como

consequência baixo rendimento e baixa concentração do produto (VAN DER WERF *et al.*, 1997; BERGER *et al.*, 1999). Uma vez que se tenha o conhecimento das desvantagens, podem-se encontrar soluções para contorná-las.

A instabilidade química dos monoterpenos pode dar lugar a reações químicas de auto-oxidação, cis/trans isomerização, racemização, hidratação, ciclização, rearranjo e polimerização. Essa instabilidade também está relacionada aos produtos, gerando um grande número de produtos secundários, que reduzem significativamente o rendimento do processo.

Essas instabilidades dos monoterpenos estão relacionadas a (VAN DER WERF *et al.*, 1997): propriedades intrínsecas da molécula, como por exemplo o  $\alpha$ -pineno apresenta catálise ácida 16 vezes mais rápido do que com o limoneno; pH do meio, valores de pH maiores do que 8 e menores do que 6 aumentam as reações químicas; concentração de íons metálicos, em particular o ferro que estimula a auto-oxidação; pressão parcial de oxigênio; temperatura; exposição a luz (especialmente ultra violeta) resulta em um aumento dos níveis de auto-oxidação; e o conteúdo de água.

Segundo VAN DER WERF *et al.* (1997), essas instabilidades podem ser minimizadas pelo crescimento das células em temperaturas moderada, abaixo ou igual a 30°C, usando pH neutro, e meio mineral contendo baixa concentração de sais.

A solubilidade dos terpenos pode ser contornada quando da adição de terpenos em fase gasosa (VAN DER WERF *et al.*, 1997). De acordo com VAN DER WERF *et al.* (1997), a afinidade do sistema biológico pelo substrato pode ser monitorada pela baixa concentração de microrganismos, muito embora outros autores mencionem a necessidade de altas concentrações de microrganismos.

LEUBERGERM *et al.* (1976) recomenda que se solubilize, em pequenas concentrações, em solventes solúveis em água e não-tóxicos (etanol, acetona, propilenoglicol, dimetil-sulfóxido, etilenoglicol, dimetil-formamida, e mono-etiléter). Além disso, ele sugere também que no lugar de solventes possa ser adicionado agentes emulsificantes como o Tween.

BERGER (1995) relata que as condições para melhorar as aplicações industriais da biotransformação, ele cita a seleção de microrganismos que sejam capazes de crescer em

substratos lipofílicos e para isso pode-se fazer uma adaptação do microrganismo ao substrato além do uso da técnica de enriquecimento. O mesmo autor cita ainda a adição do substrato com solventes não tóxicos e a limitação de nutrientes para direcionar o metabolismo do substrato da biotransformação.

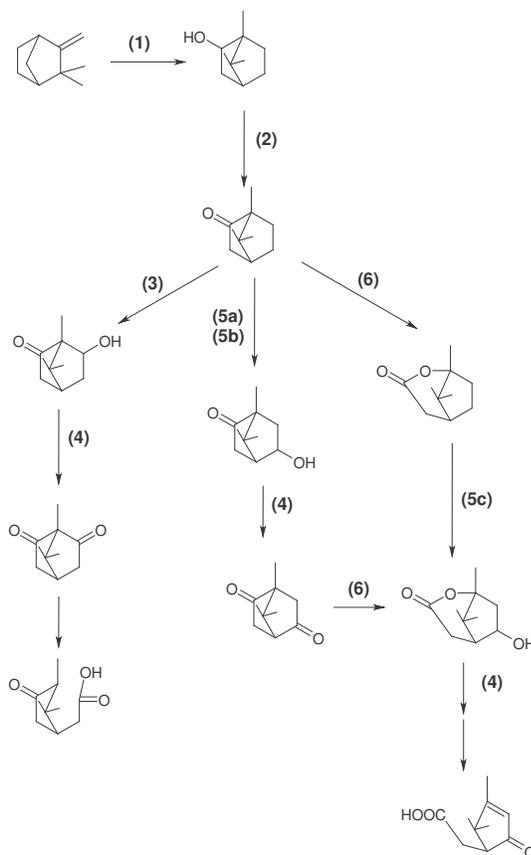
A volatilidade do substrato pode causar graves problemas da produção em escala da biotransformação, uma vez que as reações de importância comercial são oxigênio dependente, portanto necessitando de aeração e agitação vigorosas (VAN DER WERF *et al.*, 1997). Cabe ressaltar também que os terpenóides produzidos são menos voláteis do que seus respectivos terpenos.

A toxicidade de terpenos está relacionada com a desorganização da membrana promovida tanto pelo próprio terpeno quanto pelo solvente utilizado. Neste caso o produto da biotransformação pode ser mais tóxico do que o seu substrato. Para evitar esse problema pode-se adicionar o substrato após o crescimento do microrganismo (final da fase logarítmica de crescimento) (VAN DER WERF *et al.*, 1997).

Processos de imobilização de microrganismos podem ajudar no problema do pequeno tempo de vida do biocatalizador. Além disso, devem ser escolhidos, no processo de isolamento e seleção, microrganismos capazes de realizar biotransformação ou bioconversão dos substratos em tempos curtos de incubação para atrair interesse industrial, devido ao custo do processo e do aumento da possibilidade de contaminação, principalmente em processos industriais com degradação do produto e do substrato (VAN DER WERF *et al.*, 1997).

Gunsalus e colaboradores identificaram o caminho de degradação da canfora em *Pseudomonas*, isolando e identificando as principais enzimas do processo (SCHINDLER e SCHMID, 1982) (Figura 13).

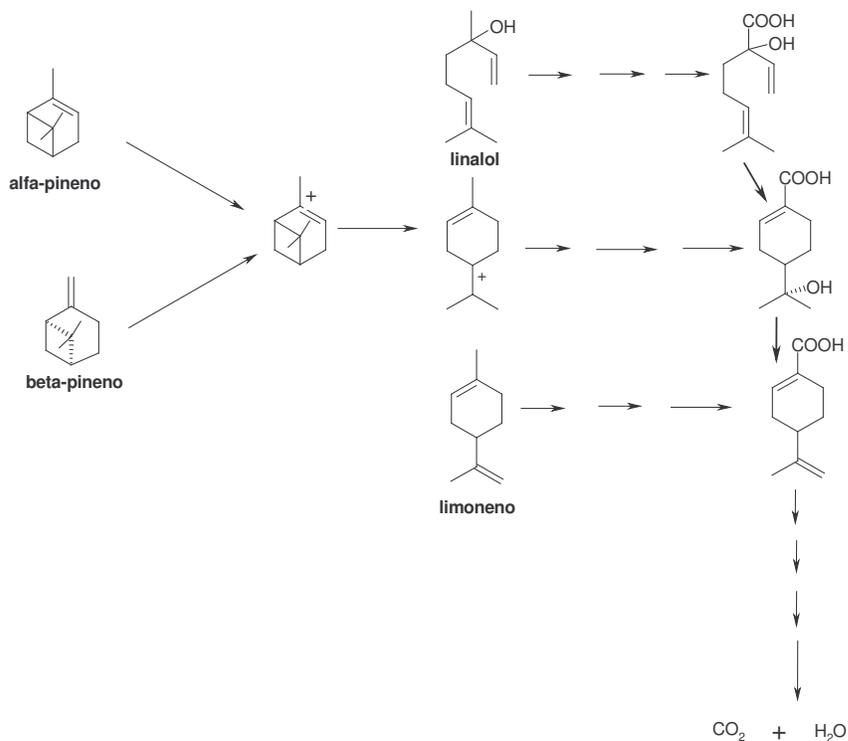
Algumas enzimas mostravam baixa especificidade ao substrato indicando caminhos metabólicos que serviam de economia da biossíntese protéica e do material genético. A ceto-lactonase solúvel e a canfor-5-exo-hidroxilase de *Pseudomonas putida* foram altamente purificadas e ambos os sistemas mostraram consistir de 3 proteínas, as quais foram reconstituídas, com sucesso, para a formação do complexo ativo enzimático processo (SCHINDLER e SCHMID, 1982). Já o complexo exo-hidroxilase analisado



**Figura 13.** Metabolismo da canfora: (1) canfeno isoberneol liase isomerase; (2) isoberneol dehidrogenase; (3) 6-endo-canfora hidroxilase; (4) 5-exo-hidroxicanfora dehidrogenase; (5) metileno-5-exo-hidroxilase; (a) Putidaredoxina redutase, (b) Putida redoxina e (c) citocromo C 450-canfora-hidroxilase; (6) cetolactonase.

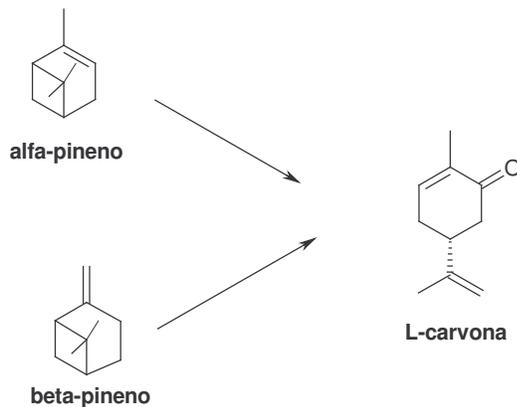
através de técnicas de cristalografia, que puderam estabelecer a relação estrutura-função, mostraram que o sistema é muito lábil para uso direto em processos biotecnológicos.

Segundo SCHINDLER e SCHMID (1982), Bharracharyya e seus colaboradores investigaram várias etapas na degradação do pineno, limoneno e linalol. A Figura 14 pode exemplificar a seqüência simplificada para o catabolismo. Segundo os autores uma enzima é capaz de atuar em diversos substratos. Assim, a enzima monoterpene álcool dehidrogenase de diferentes cepas de *Pseudomonas* foram induzidas por diferentes, substratos mostrando distintas similiaridades em relação à especificidade do substrato.



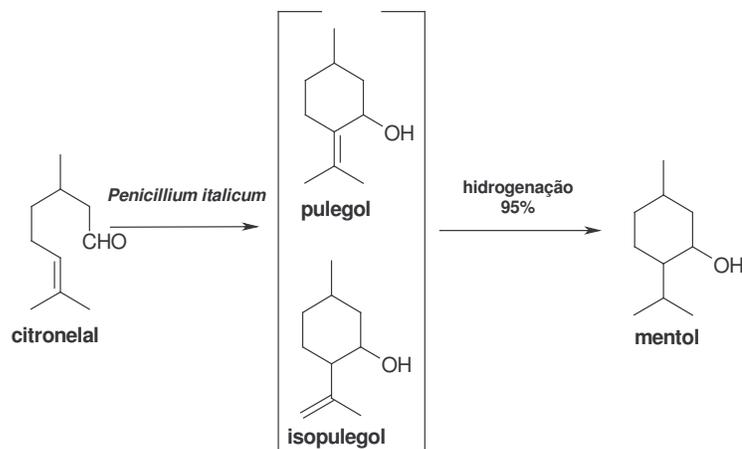
**Figura 14.** Catabolismo microbiano de terpenos.

Rhodes e Winskill, em 1985, patentearam a preparação de 1-carvona a partir de  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno por uma cepa de *Pseudomonas* sp. (GATFIELD, 1988). Os rendimentos foram extremamente baixos, 15mg/L após 48h de incubação (Figura 15), embora já houvesse sido descrita uma patente usando o microrganismo, *Corynebacteria* para transformar o limoneno em carvona (KIESLICH, 1984b).



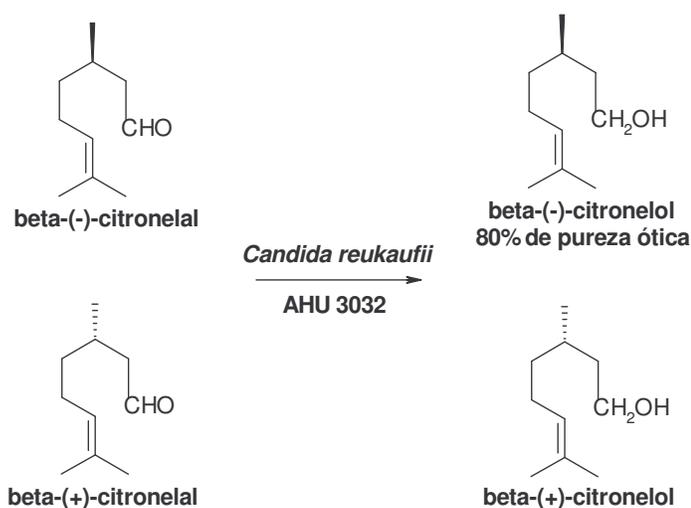
**Figura 15.** Transformação do  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno por *Pseudomonas*.

Babicka *et al.* patentearam, em 1952, a ciclização do citronelal por *Penicillium digitatum* a pulegol e isopulegol seguindo de uma hidrogenação para formação de mentol (Figura 16) (KIESLICH *et al.*, 1986).



**Figura 16.** Transformação do citronelal a pulegol e isopulegol; com seguida hidrogenação a mentol.

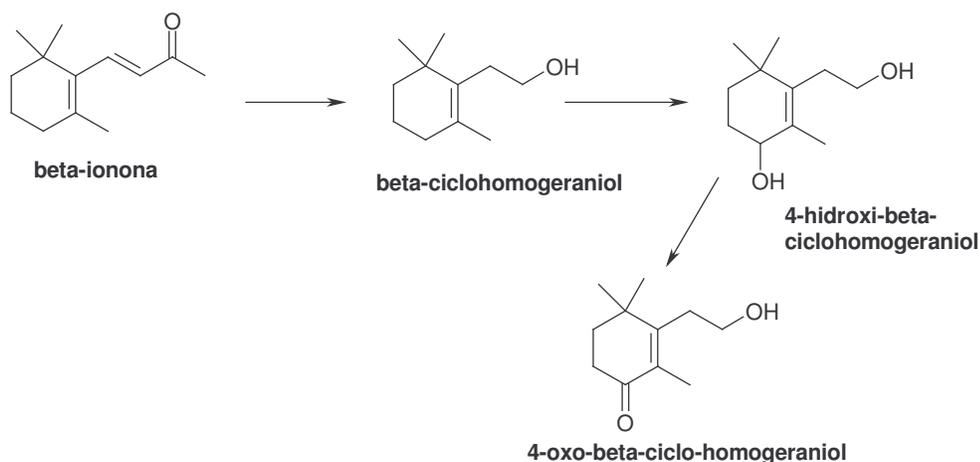
A empresa Takasago Perfumery Co. Ltd. (YAMAGUCHI *et al.*, 1976) mostraram a transformação do citronelal em citronelol, por uma levedura, *Candida reukaufii* AHU 3032, com excesso de pureza ótica da ordem de 80%, após um curto período de incubação de somente horas. O odor do citronelal é o oposto do odor do citronelol, sendo este último muito mais agradável (Figura 17).



**Figura 17.** Redução microbiológica do citronelal a citronelol.

Alguns importantes compostos de aroma são formados a partir da degradação de carotenóides em plantas e incluem a  $\beta$ -ionona e a  $\beta$ -damascona. MIKAMI *et al.* (1978) foi capaz de transformar a  $\beta$ -ionona numa mistura complexa de 13 compostos incluindo 2-hidroxi-  $\beta$ -ionona e a 4-hidroxi-  $\beta$ -ionona por uma cepa de *Aspergillus niger* JTS 191. A mistura foi bastante efetiva em aromatizar o tabaco em níveis de ppm. Como consequência, utilizaram-se outros substratos como mentona e teaspirano com *Rhizopus* ou *Penicillium*, onde os produtos da biotransformação foram usados como agentes aromatizantes do tabaco.

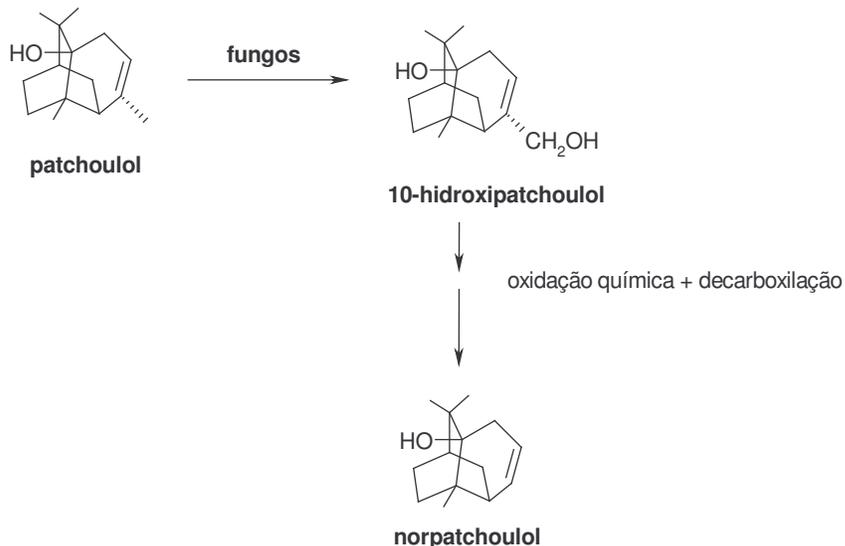
KRASNOBAJEV e HELMINGER (1982) reportaram a biotransformação da  $\beta$ -ionona por *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570 em uma mistura complexa aonde o produto principal foi o 4-oxo-  $\beta$ -ciclohomogeraniol, que também pode ser utilizado como aromatizante de tabaco (Figura 18).



**Figura 18.** Bioconversão da  $\beta$ -ionona por *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570.

Sesquiterpenóides também têm sido descritos como substratos para biotransformação. O patchoulol pode ser hidroxilado por vários fungos, *Calonectaria decora* ATCC 14769, *Paecilomyces carneus* FERM P-3797 e *Penicillium rubrum* FERM P-3796 (GATFIELD, 1988); *Gliocladium roseum* NRRL 8194 (HOFFMANN-LA ROCHE, 1978); e por *Pithomyces* sp. (SUHARTA *et al.*, 1981), para produzir o 10-hidroxi-patchoulol, o qual pode ser convertido por oxidação química a norpatchoulenol (Figura 19). Este último é o principal carreador do odor do óleo essencial do patchouli, e que apresenta uma síntese química bastante difícil. Porém, a hidroxilação na posição 10 foi

somente de 25-45%, sendo as outras posições também afetadas, formando produtos indesejados. Dessa maneira a eficiência desse processo foi bastante questionada.



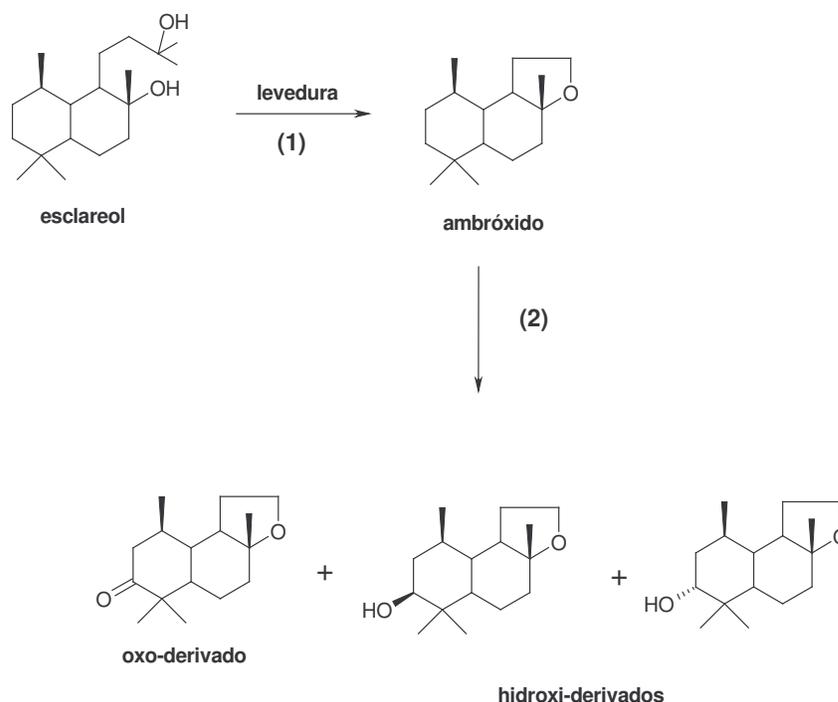
**Figura 19.** Hidroxilação do patchoulol por fungos (*Calonectaria decora* ATCC 14769, *Paecilomyces carneus* FERM P-3797 e *Penicillium rubrum* FERM P-3796).

Esclareol pode ser convertido a ambroxido por oxidação microbiológica através dos fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, resultando numa mistura de hidróxi- e oxo-derivados (Figura 20), que apresentam importante valor como agentes aromatizantes de tabaco (BRITISH-AMERICAN TOBACCO Co. LTD, 1984).

Vanilina é um dos compostos de aroma mais importantes e é usado em uma grande variedade de alimentos. A vanilina sintética é produzida em quantidades superiores a 12.000 toneladas por ano, algumas a partir de fontes petroquímicas, como o guaiacol; e também a partir de lignina, um sub-produto da indústria de papel.

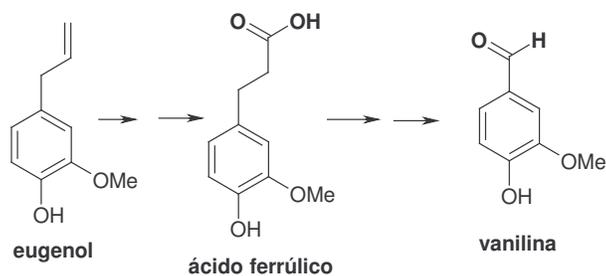
A vanilina é um intermediário na biodegradação de uma grande variedade de produtos naturais incluindo estilbenos fenólicos, eugenol, ácido ferrúlico e lignina (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).

A partir da casca do abeto se obtém os estilbenos fenólicos e a partir destes pode-se obter a vanilina. Hasegawa Flavor Company têm um número bem grande de trabalhos patenteados através do uso do gene da dioxigenase, que oxidativamente cliva os estilbenos formando os aldeídos aromáticos (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).



**Figura 20.** Conversão do esclareol a ambróxido (1) e depois o ambróxido transformado numa mistura de hidroxi- e oxo-derivados (2).

O principal constituinte do óleo de cravo é o eugenol, o que o torna um composto barato e disponível. COOPER (1989) descreve uma patente de biotransformação do eugenol a coniferaldeído (aldeído ferrúlico, Figura 21) usando mutantes de *Arthrobacter globiformis* DSM 3597. Este aldeído foi acumulado em até 1,25g/L com um rendimento teórico de 65%, o que implica claramente que o aldeído é um intermediário do metabolismo do eugenol. Esse processo foi licenciado pela BASF.



**Figura 21.** Biotransformação do eugenol a vanilina.

TAKASAGO (WASHISU *et al.*, 1993) desenvolveram uma patente para produzir vanilina a partir de eugenol usando uma cepa de *Pseudomonas* sp. TK2102 (FERM P-12689). Este microrganismo cresceu em eugenol como fonte de carbono, porém se desenvolveu muito pouco em vanilina, ácido vanílico e álcool vanílico. Houve um acúmulo transiente de até 280 mg/L de vanilina.

Pesquisadores da Haarmann & Reimer (RABEN e HOPP, 1991; HOPP, 1993) tem reportado que *Serratia marcescens* DSM 30126 pode ser usado para oxidar o isoeugenol a vanilina até 3,8 g/L com rendimento de 5%. Neste caso o microrganismo desenvolveu-se primeiramente em glicerol e em seguida suspenso em meio contendo isoeugenol. Entretanto a taxa de biotransformação do isoeugenol foi muito pequena (0,018 g/L.h). Eugenol também foi metabolizado por este microrganismo porém em meio contendo extrato de levedo e de carne, apresentando um rendimento da vanilina muito pequeno (18 mg/L).

Ácido ferrúlico é um constituinte comum de várias uvas e da oxidação da lignina. A *Pseudomonas fluorescens* e *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de produzir o 4-hidroxi-3-metoxi-estireno, com alto rendimento a partir do ácido ferúlico. Os microrganismos foram crescidos em meio complexo contendo extrato de levedura, glicose e ácido ferúlico (HUANG *et al.*, 1993).

Pesquisadores da Kraft General Foods patentearam uma rota para produção de vanilina a partir de ácido ferrúlico e eugenol (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994). *Pseudomonas putida* (ATCC 55180) foi usado para acumular 210 mg/L de vanilina a partir de ácido ferúlico, e ditiotreitol e ditioeritreitol. A patente ainda inclui o uso de *Aspergillus niger* (ATCC 11414), *Pseudomonas acidovorans* (ATCC 15668) e *Rhodotorula glutinis* (ATCC 74056).

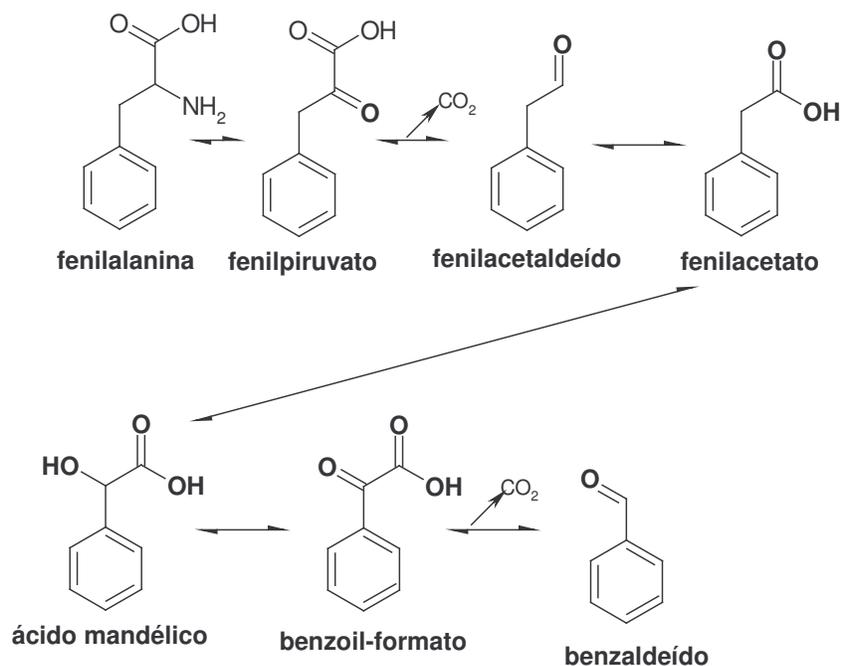
Uma outra patente da Pernod-Ricard utilizou *Pycnopus* sp. a partir de ácido ferrúlico, acumulando apenas quantidades traço de vanilina (40 mg/L), além da biotransformação necessitar de um longo período de tempo para ocorrer (GROS *et al.*, 1991).

CASEY e DOBB (1992) descreveram uma rota bioquímica para formação de aldeídos a partir de aminoácidos, por *Proteus vulgaris* (CMCC2840). Os aminoácidos são deaminados aos ácidos fenil-pirúvicos, os quais são convertidos aos aldeídos

correspondentes, produzindo vanilina a partir de metoxi-tirosina e benzaldeído a partir de fenilalanina.

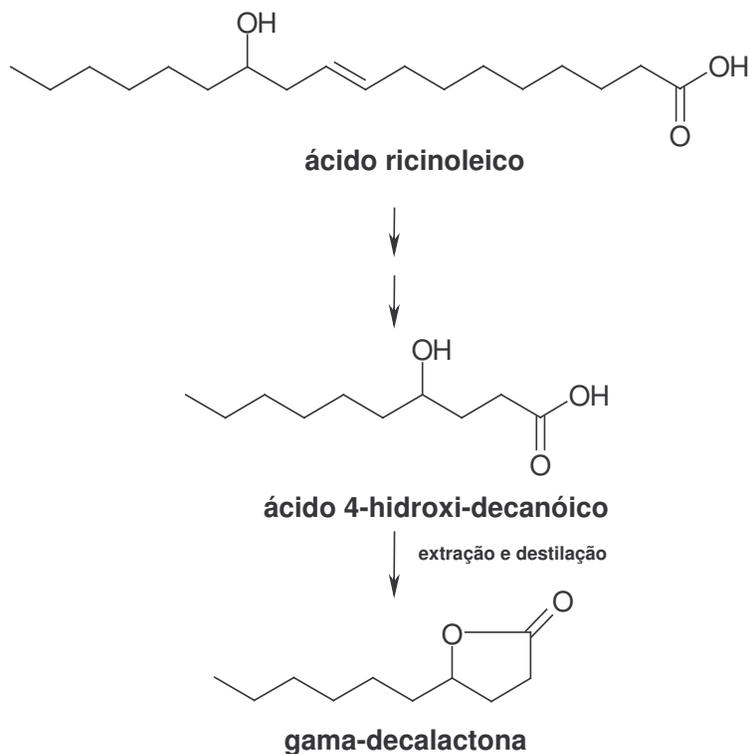
Benzaldeído apresenta aroma de cereja e de outras frutas. Entretanto, quando extraído da amêndoa de damasco, tem como subproduto indesejável e tóxico, o ácido hidrocianico. A fermentação fornece uma alternativa natural de produção do benzaldeído (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).

O isolamento da *Pseudomonas putida* (ATCC 55012), a partir de técnicas de enriquecimento, possibilitou a transformação da fenilalanina a benzaldeído, através de fenil-piruvato, fenil-acetaldeído, acetato de fenila, mandelato, formato de benzoila e finalmente benzaldeído (Figura 22) (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).



**Figura 22.** Biotransformação da fenilalanina a benzaldeído por *Pseudomonas putida*.

Gama-decalactona e outras lactonas são produzidas com altos rendimentos a partir do ácido ricinoleico, principal ácido graxo do óleo de ricínio. Existem várias patentes de biotransformação do ácido ricinoleico a gama-decalactona (Figura 23) (HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).



**Figura 23.** Biotransformação do ácido ricinoleico a  $\gamma$ -decalactona.

FARBOOD *et al.* (1990) desenvolveram uma patente para produzir uma ampla variedade de lactonas a partir do óleo de ricínio. Neste processo, *Candida petrophilium* (ATCC 20226) cresceu em um meio rico contendo óleo de ricínio e produziu ácidos graxos hidroxilados que foram recuperados por acidificação e extração. Uma grande variedade de lactonas foi produzida após destilação dos ácidos graxos sob condições ácidas do meio.

Linalol e seus quatro óxidos são encontrados em chá preto, sendo encontrado também em óleos essenciais e aromas de frutas. Esses óxidos também podem ser utilizados em perfumaria apresentando nota de lavanda e são utilizados para a reconstituição de óleos essenciais (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001a).

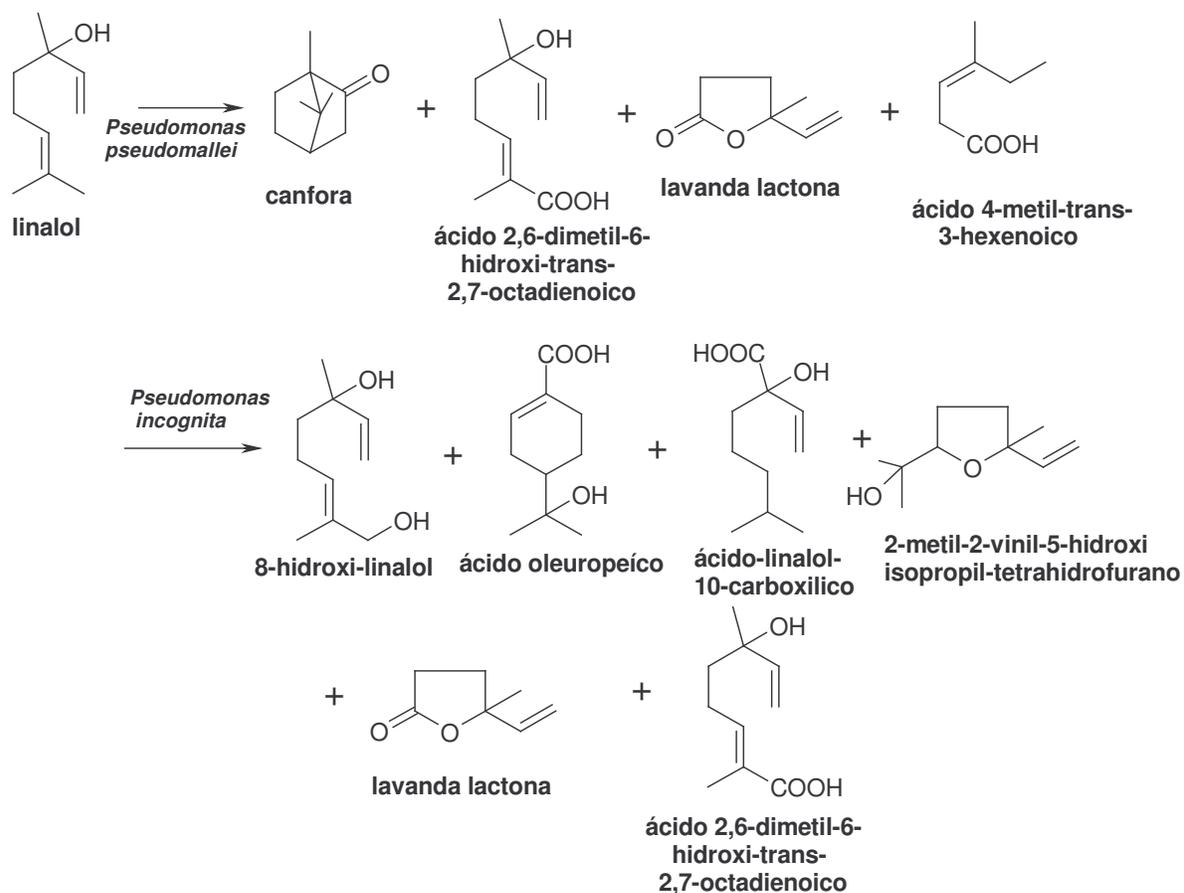
O linalol também pode ser encontrado em plantas como: Lavender *angustifolia* (Lituânia) (20,98%), *Lavandula angustifolia* Mill., fam. Lamiaceae (VENSKUTONIS *et al.*, 1997); Geranium, Bourbon 11 (9,90%), *Pelargonium graveolens* L'Herit. ex Aiton (*P. roseum*), fam. Geraniaceae (SOUTHWELL *et al.*, 1995); Laurel leaf (Itália) 2 (6,20%),

*Laurus nobilis* L., fam. Lauraceae (PINO *et al.*, 1993); Basil (França) 2 (3,70%), *Ocimum basilicum* L., fam. Lamiaceae, (BARITAUX *et al.*, 1992); Palmarosa (Índia) 5 (3,64%), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats., var. *martinii*, fam. Poaceae (Gramineae) (SIDDIQUI and GARG, 1990); Rose (Bulgária) 3a (2,20%), *Rosa damascena* Mill., fam. Rosaceae (BOELENs and BOELENs, 1997); Wormwood (Mugwort) (Itália) 2 (1,70%), *Artemisia absinthium* L., fam. Asteraceae (Compositae) (MUCCIARELLI *et al.*, 1995); Juniper berry 8 (0,60%), *Juniperus communis* L., fam. Cupressaceae (SCHILCHER *et al.*, 1993); laranja, doce (Itália) 5 (0,41%), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, fam. Rutaceae (DUGO *et al.*, 1994); limão (Itália-Sicília) 10 (0,11%), *Citrus limon* (L.) Burm., fam. Rutaceae (DELLACASSA *et al.*, 1995).

MIZUTANI *et al.* (1971) descreveram a conversão do linalol por uma cepa de *Pseudomonas pseudomallei* em uma mistura de metabólitos (Figura 24). Os produtos foram cânfora, resultante da ciclização do linalol, além do ácido 2,6-dimetil-6-hidroxi-trans-2,7-octadienóico e outros produtos de degradação, como 5metil-vinil-tetrahydro-2-furanona e o ácido 4-metil-trans-3hexanoico (Figura 24).

DEVI e BHATTACHARYYA (1977) obtiveram uma mistura complexa em estudos de degradação do linalol, por *Pseudomonas incógnita*. Essa cepa foi isolada através de técnicas de enriquecimento usando linalol como única fonte de carbono. Nesse caso, os autores, não encontraram cânfora. Entretanto o composto cíclico (lavanda lactona) e hidroxi-ácido (ácido 2,6-dimetil-6-hidroxi-trans-2,7-octandienoico) foram identificados, conforme os resultados para a degradação do linalol por *Pseudomonas pseudomallei* (Figura 24). Encontrou-se também o 8-hidroxi-linalol, 2-metil-2-vinil-5-hidroxi-isopropil-tetrahidrofurano, ácido-linalol-10-carboxílico e ácido oleuropeico (Figura 24).

Vinhos nobres apresentam dois microrganismos, o fungo *Botrytis cinerea* e leveduras, que são os responsáveis pelo seu preparo e por desenvolverem aromas característicos. Numa dessas etapas para a formação de aromas, os terpenóides em uvas são modificados pela ação do fungo *Botrytis cinerea* que atacam a pele da uva. (SHIMIZU *et al.*, 1982). Dessa maneira SHIMIZU *et al.* (1982) e BOCK *et al.* (1986) têm estudado a transformação do linalol por esse fungo.

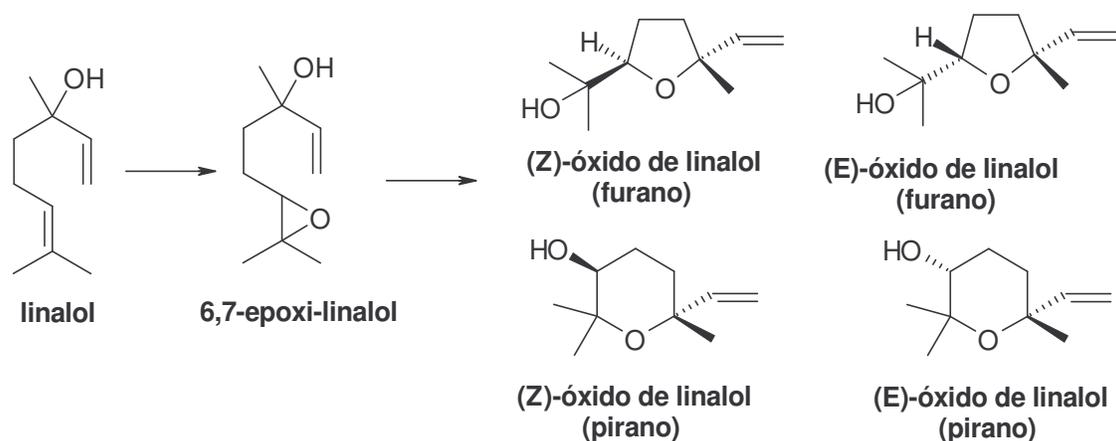


**Figura 24.** Degradação do linalol por *Pseudomonas pseudomallei* e *Pseudomonas incognita*.

BOCK *et al.* (1986) demonstrou que, para a formação dos hidroxi-éteres (Figura 25), os óxidos do linalol, seu precursor biogenético, seria um epóxi, o 6,7-epoxi-linalol (Figura 25). Mas como o meio de cultura se encontrava ácido não foi possível a detecção desses epóxidos.

SHIMIZU *et al.* (1982) quando adicionaram o linalol ao mosto de uva obtiveram como produtos da biotransformação do  $\beta$ -pineno; os óxidos do linalol tanto os furanos quanto os piranos; o p-ment-1-eno-3ona;  $\alpha$ -terpineol; geraniol; p-mentano-1,8-dieno-9-ol e mais três terpenos não identificados.

DEMYTTENAERE e WILLEMEN (1998) também obtiveram os óxidos de linalol (tanto os furanos quanto os piranos) em rendimentos que foram de 5 a 24%.



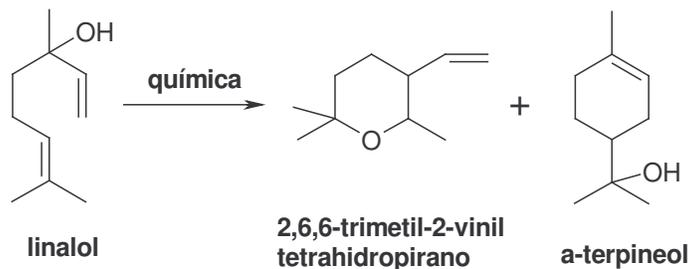
**Figura 25.** Caminho metabólico para a produção dos óxidos de linalol (BOCK *et al.*, 1986).

As reações de degradação do linalol por *Pseudomonas incógnita* levaram a formação de ácidos oleuropeico e perilico através de reações de oxidação e hidroxilação (RAMADEVI e BHATTACHARYYA, 1977). Já uma *Pseudomonas* do solo foi capaz de formar uma mistura de óxidos de linalol (furanos), 2-vinil-2-metil-tetrahydrofuran-5-ona, 8-hidroxlinalol, ácido oleuropeico e  $\alpha$ -terpineol.

O fungo *Aspergillus niger*, isolado do solo, levou a uma mistura de 8-hidroxlinalol, geraniol e  $\alpha$ -terpineol (MADYASTHA e MURTY, 1988a, 1988b), a partir do linalol. Enquanto que quando se utilizou o fungo *Botrytis cinerea*, para verificar a rota da biotransformação do linalol, obtiveram: os dióis 2,6,-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol, 2,6-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol, 8-hidroxlinalol,  $\alpha$ -terpineol, 2-viniltetrahydrofuran-5-ona, os óxidos de linalol (furanos e piperanos) e o 6-metil-5-hepten-2-ona (RAPP e MANDERY, 1988).

Na biotransformação do linalol também se deve tomar cuidados devido a auto-oxidações e a transformações químicas. Essas auto-oxidações envolvem a formação dos óxidos do linalol (furanos e piperanos) em pH ácido (3,5) (DEMYTTENAERE e WILLEMEN, 1998), que também podem ser obtidos por transformação do linalol por microrganismos (Figura 25). Na degradação química, segundo DEMYTTENAERE e WILLEMEN (1998)

pode acontecer a formação do 2,6,6-trimetil-2-viniltetrahidropirano e do  $\alpha$ -terpineol (Figura 26).



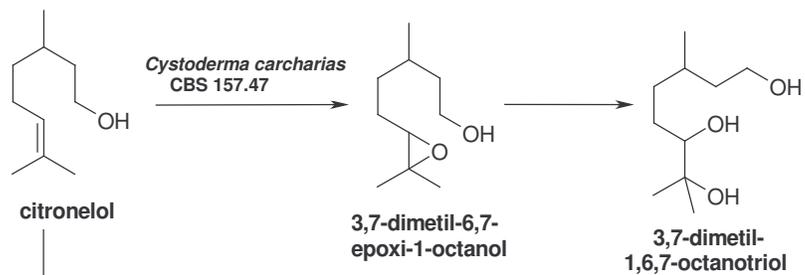
**Figura 26.** Transformação química do linalol.

O citronelol pode ser encontrado em plantas em diversas concentrações, como por exemplo, de: Rose (Bulgária) 3a (27,50%), *Rosa damascena* Mill., fam. Rosaceae (BOELENIS e BOELENIS, 1997); Geranium, Bourbon 11 (20,60%), *Pelargonium graveolens* L'Herit. ex Aiton (*P. roseum*), fam. Geraniaceae, (SOUTHWELL *et al.*, 1995); *Eucalyptus citriodora* (China) 2 (4,16%), *Eucalyptus citriodora* Hook. f., fam. Myrtaceae, (ZHU *et al.*, 1995); Lavender angustifolia (Lituânia) (0,35%), *Lavandula angustifolia* Mill., fam. Lamiaceae, (VENSKUTONIS *et al.*, 1997); limão (Itália-Sicília) 10 (0,02%), *Citrus limon* (L.) Burm., fam. Rutaceae (DELLACASSA *et al.*, 1995).

O basidiomiceto *Cystoderma carcharias* foi capaz de transformar o citronelol em óxido de rosa, que é um composto de impacto. Além disso, ONKEN e BERGER (1999a) obtiveram também como intermediários (Figura 27): o 3,7-dimetil-1, 6, 7-octanotriol, como principal produto; e o epóxi, 3,7,-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, que foi o intermediário dos dióis, 2,6-dimetil-2-octeno-1,8-diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol e 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-dióis (Figura 27). As taxa de produção alcançaram 150mg/L.dia e levaram a uma produção de 866 mg/L, com taxa de conversão de 52%. Além disso, foi utilizado um método de aeração aonde o ar foi adicionado ao reator no seu fundo, o que mostrou que a perda do substrato volátil foi de apenas 4,5% (Figura 28) (ONKEN e BERGER, 1999).

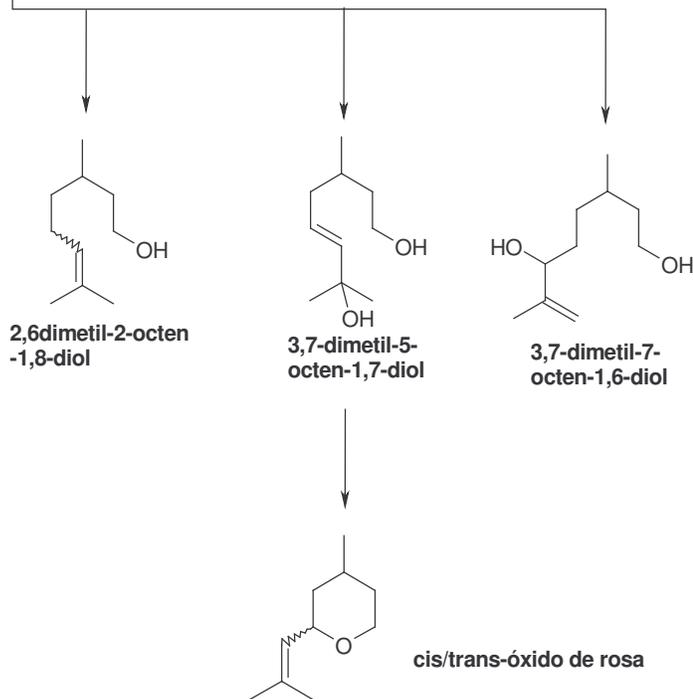
Citronelol utilizado como substrato para a transformação com o *Botrytis cinerea* levou a formação dos principais compostos: 2,6-dimetil-octan-1,8-diol e (E)-2,6-dimetil-oct-2-em-1,8-diol e como produtos secundários: o 2,6-dimetil-octan-2,8-diol, 2 isômeros do

**ROTA PRINCIPAL**

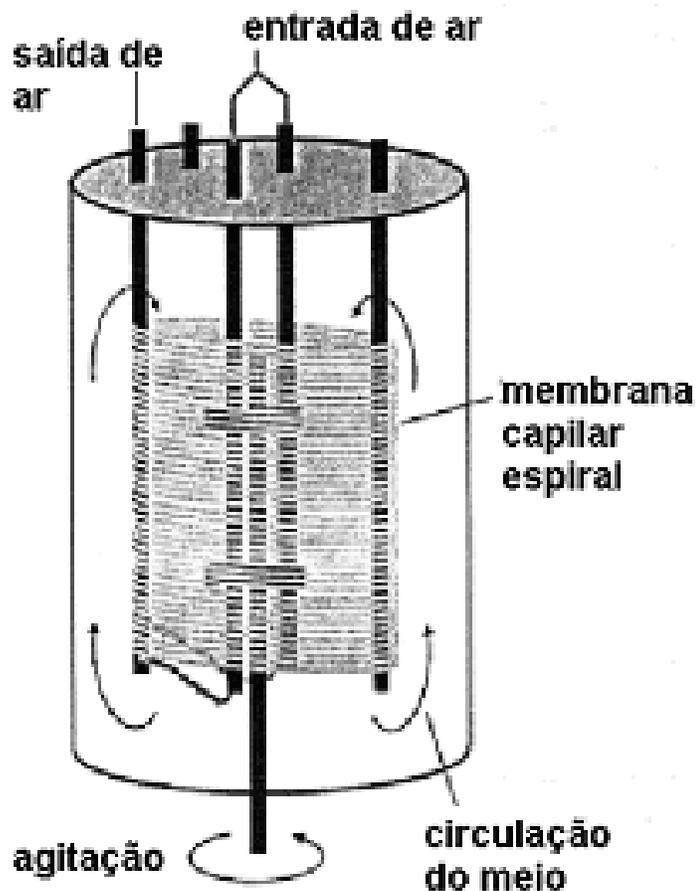


**ROTA SECUNDÁRIA**

*Cystoderma carcharias* CBS 157.47

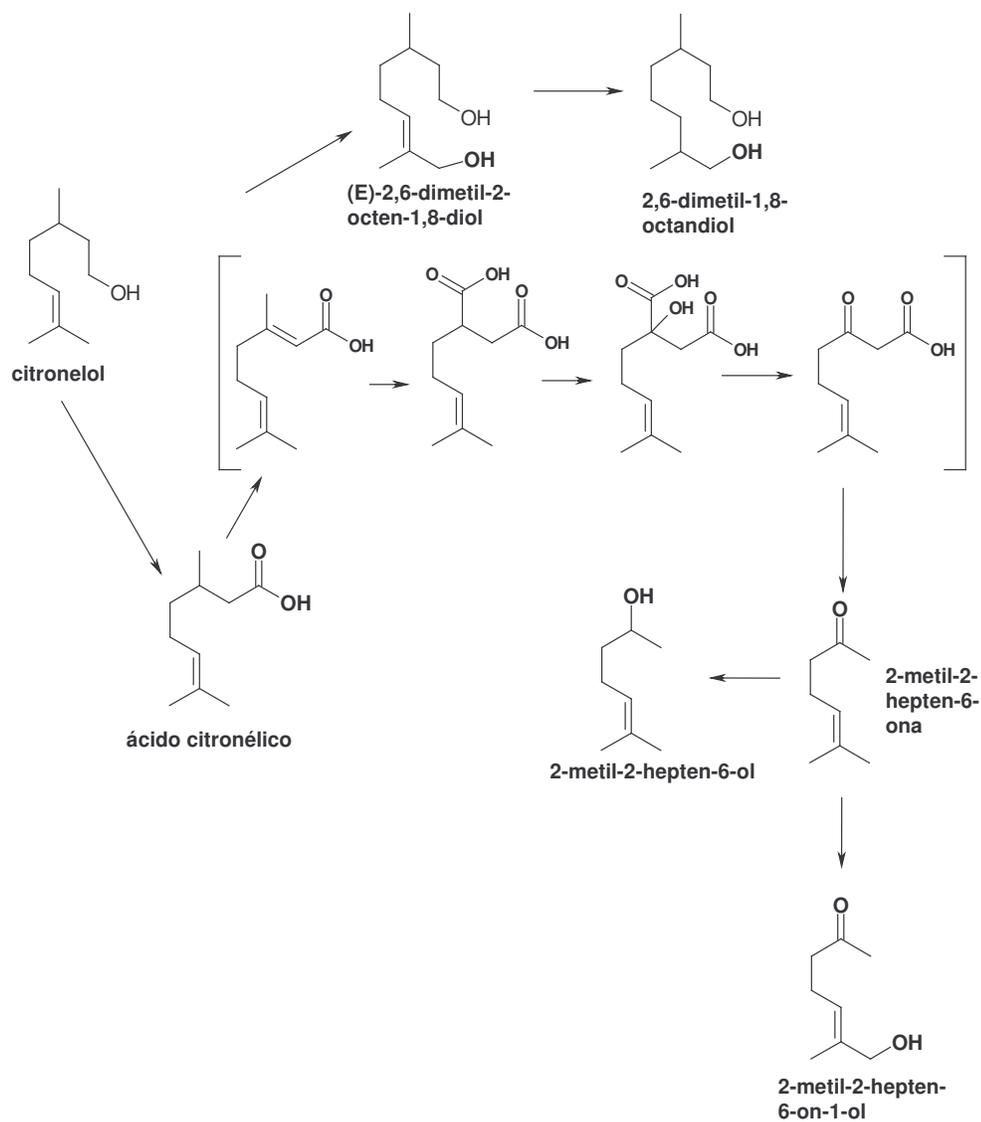


**Figura 27.** Transformação de citronelol por *Cystoderma carcharias*.

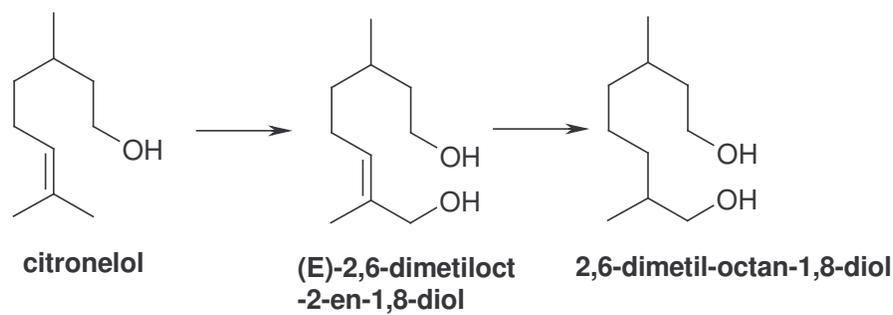


**Figura 28.** Bioreator de membrana aerada.

p-menta-3,8-diol, (Z)-2,6-dimetilocta-2-en-1,8-diol, isopulegol, 2-metilhept-2-en-6-on-1-ol e 2-metil- $\gamma$ -butirolactona (Figura 29). Geralmente, as concentrações encontradas foram baixas e indicando, segundo ALEU e COLLADO (2001), que o citrionelol foi incorporado na biomassa e/ou degradado a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . ALEU e COLLADO (2001) realizaram o experimento, tanto com o mosto quanto com o meio de cultura e sob condições ótimas, onde a transformação foi realizada por uma  $\omega$ -oxidação. Essa  $\omega$ -oxidação levaria ao (E)-2,6-dimetil-oct-2-en-1,8-diol e esse, então, sendo transformado a 2,6-dimetil-octan-1,8-diol, pela redução dupla da ligação 2,3 (Figura 30). Por isso se encontrou como produto da biotransformação do citrionelol por *Botrytis cinerea* o (E)-2,6-dimetil-oct-2-en-1,8-diol e o 2,6-dimetil-octan-1,8-diol.

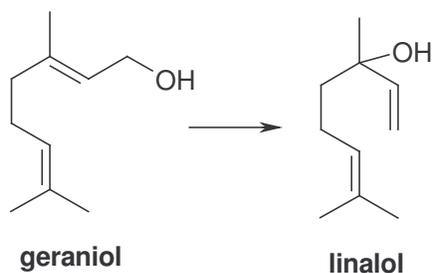


**Figura 29.** Bioconversão do citronelol por cepas de *Botrytis cinerea*.



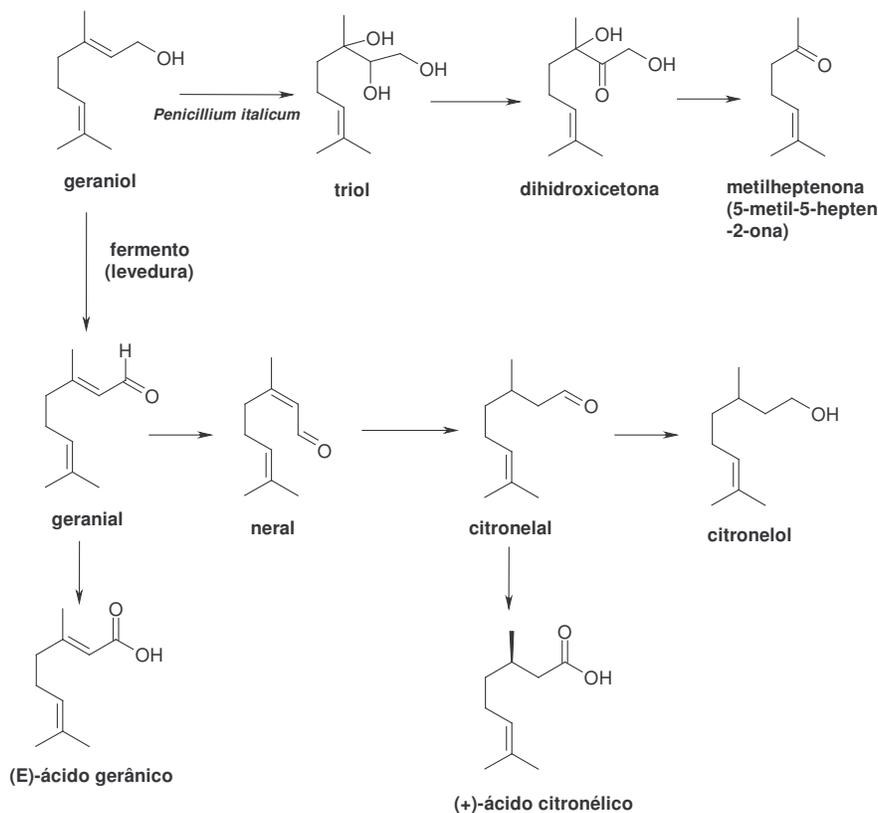
**Figura 30.** ω-oxidação do *Botrytis cinerea*

O geraniol pode ser encontrado em diferentes plantas e sob condições ácidas apresenta uma interconversão e isomerização química a linalol (ALEU e COLLADO, 2001) (Figura 31).



**Figura 31.** Interconversão e isomerização química do geraniol ao linalol

A biotransformação do geraniol por *Botrytis cinerea* teve como produto o: (2E, 6E)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1,8-diol e (E)-3,7-dimetiloct-2-en-1,8-diol (ALEU e COLLADO, 2001) (Figura 32).



**Figura 32.** Transformação do geraniol por *Penicillium italicum* e por levedura

Uma das justificativas para o estudo da biotransformação do limoneno por microrganismo está baseada no fato de que este é um dos compostos mais abundantes no Brasil, uma vez que o país é um dos maiores produtores de laranja do mundo. Dados revelam que, junto com os Estados Unidos, o Brasil produz 60% das laranjas em todo o mundo. O principal produto industrial do processamento da laranja é o seu suco, concentrado e congelado, que é exportado. Sabe-se que o Brasil é responsável por 80% do suco concentrado encontrado no mundo, gerando divisas da ordem de 1,5 bilhões por ano (BRADDOCK, 1995).

O limoneno é um líquido incolor, com leve odor cítrico obtido da destilação do licor cítrico. Este licor provém da prensagem do resíduo úmido da laranja (casca, bagaço, sementes) após a extração do suco. Dentre os produtos e subprodutos obtidos da laranja, obtém-se 0,92% de limoneno (ABECitrus, 2003). O D-limoneno é usado para a síntese de fragrâncias utilizadas em escala industrial, como solvente industrial, na obtenção de sabores artificiais na fabricação de doces, balas e goma de mascar. A disponibilidade mundial anual de limoneno é da ordem de aproximadamente 50 milhões/quilo (TAN *et al.*, 1998), no Brasil, na safra de 1998/99, esse número foi de 30 toneladas (ABECitrus, 2003).

O limoneno é usado como material de partida para a produção de álcoois terpênicos e cetonas (BAUER & GARBE, 1985; TAN *et al.*, 1997); na fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, tintas, cosméticos, complemento para ração animal (ABECitrus, 2003), podendo ainda ser dispostos à combustão ou como detritos de plantas.

Os progressos da biotecnologia têm levado a utilização desses rejeitos de baixo custo em alguns precursores não usuais para aromas na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica, onde os respectivos valores agregados desses compostos transformados são bem maiores do que o de seu substrato, o limoneno.

O limoneno pode ser encontrado ainda em: laranja, doce (Italy) 5 (95,18%), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, fam. Rutaceae (DUGO *et al.*, 1994); limão (Itália-Sicília) 10 (65,87%), *Citrus limon* (L.) Burm., fam. Rutaceae (DELLACASSA *et al.*, 1995); Dill seed 3 (18,00%), *Anethum graveolens* L., fam. Apiaceae (Umbelliferae) (CHARLES *et al.*, 1995); Fennel, bitter (Lituânia) (10,35%), *Foeniculum vulgare* Miller, var. *vulgare* Dc,

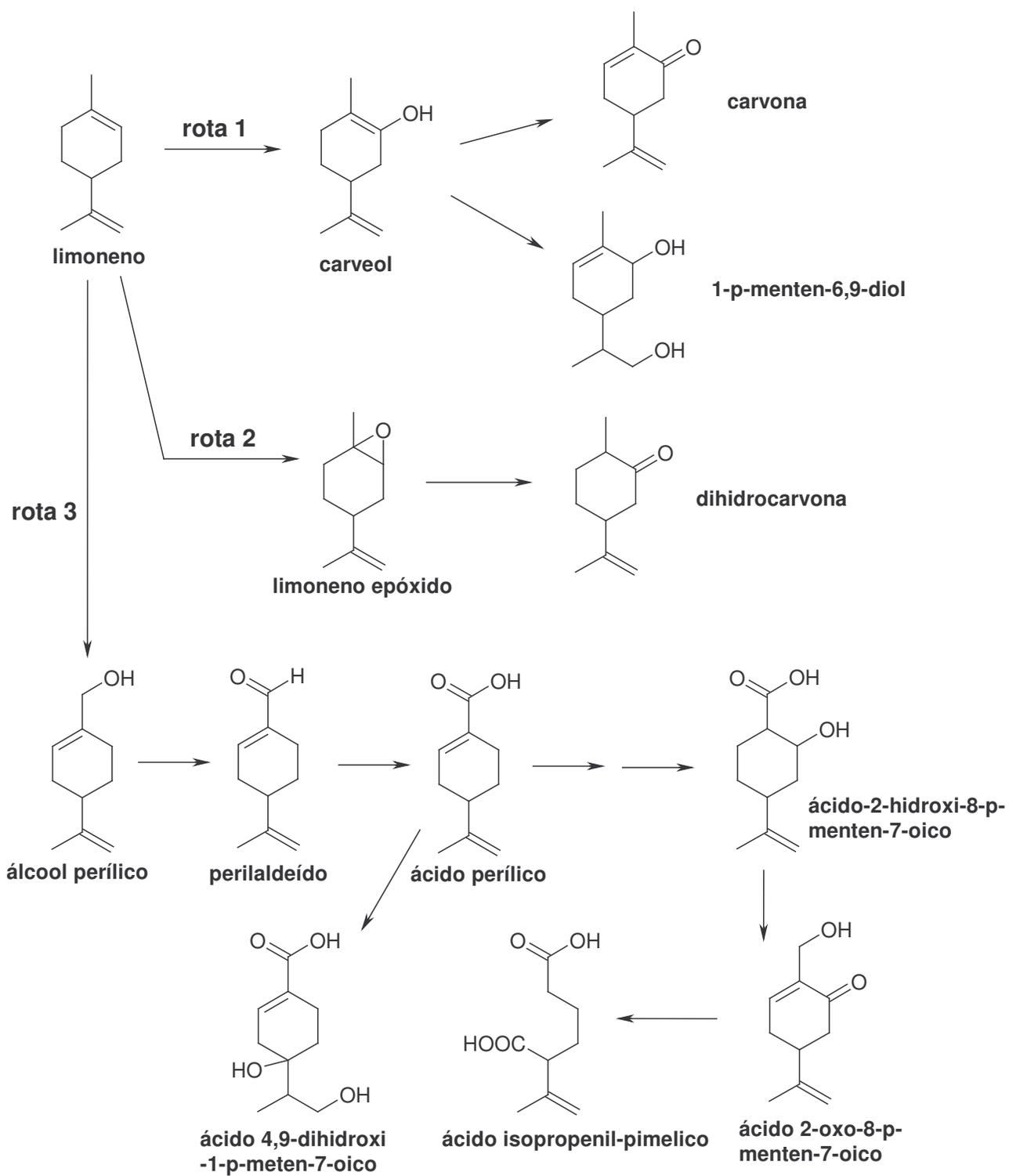
fam. Apiaceae (Umbelliferae) (VENSKUTONIS *et al.*, 1996); Juniper berry 8 (10%), *Juniperus communis* L., fam. Cupressaceae (SCHILCHER *et al.*, 1993); Lavender angustifolia (Lithuania) (0,59%), *Lavandula angustifolia* Mill., fam. Lamiaceae (VENSKUTONIS *et al.*, 1977); Eucalyptus citriodora (China) 2 (0,24%), *Eucalyptus citriodora* Hook. f., fam. Myrtaceae; Laurel leaf (Italy) 2 (0,20%), *Laurus nobilis* L., fam. Lauraceae (PINO *et al.*, 1993); Rosa (Bulgária) 3a (0,05%), *Rosa damascena* Mill., fam. Rosaceae (BOELENIS e BOELENIS, 1997); Basil (França) 2 (0,03%), *Ocimum basilicum* L., fam. Lamiaceae (BARITAUX *et al.*, 1992); Cilantro (Coriander leaf) 5a (0,03), *Coriandrum sativum* L., fam. Apiaceae (Umbelliferae) (POTTER, 1996); e Wormwood (Mugwort) (Itália) 2 (0,01%), *Artemisia absinthium* L., fam. Asteraceae (Compositae) (MUCCIARELLI *et al.*, 1995)

As biotransformações no limoneno podem resultar em compostos de impacto industrial, como a carvona, dihidrocarvona, perilaldeído e  $\alpha$ -terpineol (BERGER, 1995).

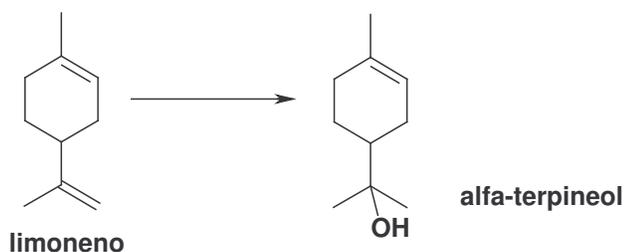
DHAVALIKAR *et al.* (1966) propuseram 3 caminhos para a conversão do limoneno (Figura 33). Pela rota 1, obtiveram (+)-cis-carveol e (+)-carvona, importantes constituintes de óleos de sementes de cominho e endro juntamente com o 1-p-menteno-6,9-diol. Pela rota 2, (+)dihidrocarvona formado a partir do limoneno epóxido e o 8-p-menteno-1-ol-2-ona, formado a partir do limoneno-1,2-diol, na rota 3 foram formados o perilaldeído e o ácido perílico, que são constituintes de vários óleos essenciais e usados na indústria de aroma e fragrâncias. Os outros produtos formados não eram compostos de valor comercial, mas sim os metabólitos formados ajudando a diferenciar o caminho enzimático.

KIESLICH *et al.* (1986) realizaram uma seleção de 800 microrganismos diferentes, a partir de uma coleção de culturas, e encontraram 320 cepas que modificavam o limoneno. Dependendo do microrganismo, observa-se acúmulo dos produtos, apresentando diferentes intermediários. Além disso, eles acrescentaram um caminho a mais ao da Figura 33 (Figura 34), onde o limoneno, dependendo do microrganismo, poderia se converter em  $\alpha$ -terpineol e este ainda poderia ser convertido a trans-sobrerol (KIESLICH *et al.*, 1986).

Técnicas de enriquecimento para isolamento de microrganismos foram utilizadas para isolar microrganismos de frutas cítricas de laranjas maduras, como as culturas puras de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, em meio Czapeck-Dox contendo 1% de



**Figura 33.** Três rotas diferentes da transformação do limoneno.



**Figura 34.** Transformação do limoneno a alfa-terpineol.

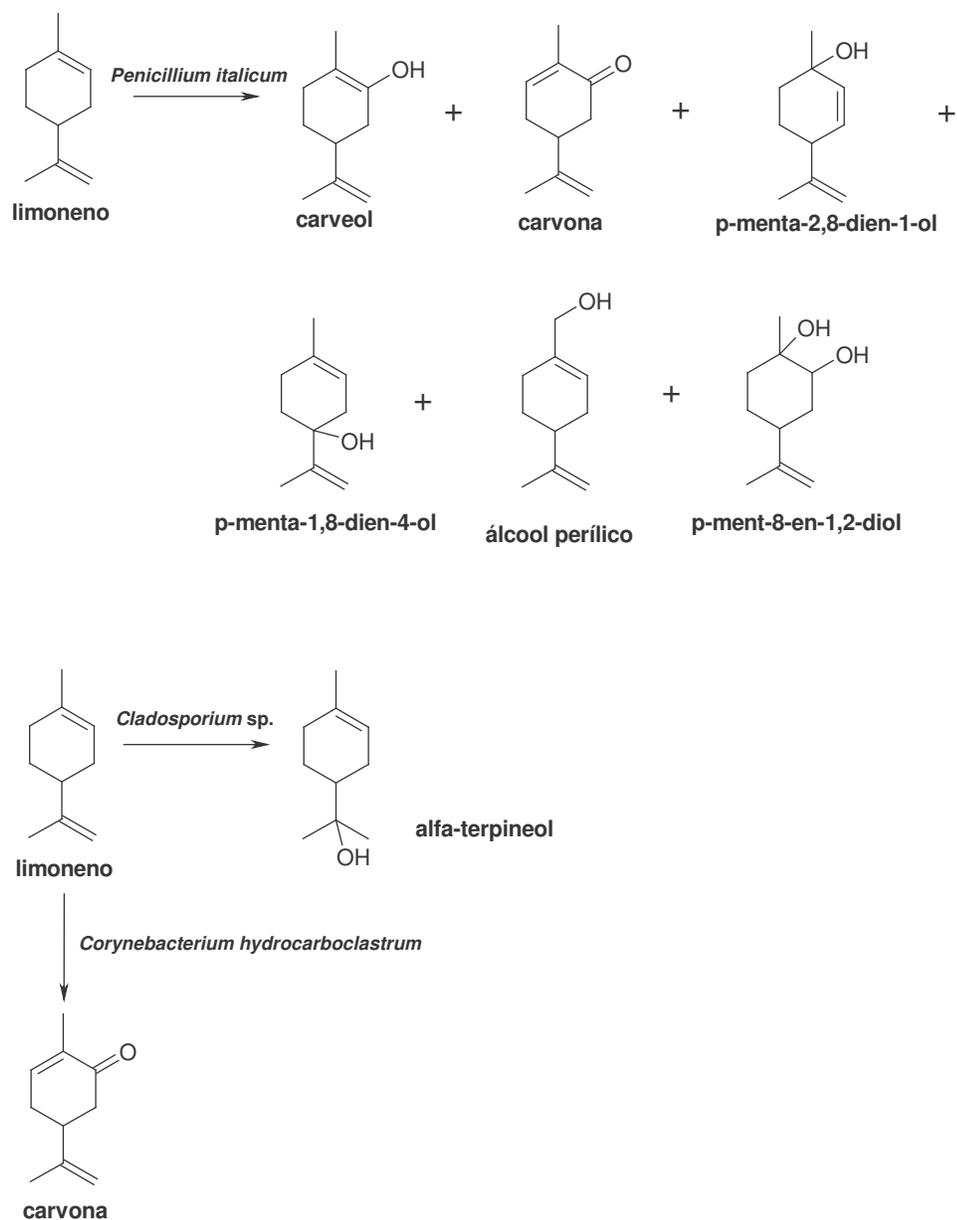
limoneno, como única fonte de carbono (KIESLICH, 1984b).

Transformações do limoneno (0,5%) em erlenmeyers, por *P. italicum*, apresentaram eficiência acima de 80%. Altas concentrações de limoneno podem ser inibitórias. Os produtos identificados foram o cis- e trans-carveol (26%) como produtos principais, carvona (6%), cis- e trans-p-menta-2,8-dien-4-ol (4%), álcool perílico (3%) e p-ment-8-eno-1,2-diol (3%) (Figura 35).

$\alpha$ -Terpineol foi um produto da transformação do limoneno por bactéria, *Cladosporium* sp., que foi isolada também através de técnicas de enriquecimento (Figura 35).

*Chaetomium cochlioides* DSM 1909 ou *Chaetomium globosum* DSM 62109 formaram trans-carveol como o principal metabólito a partir do limoneno. Embora haja formação de produtos secundários e a produção de trans-carveol (24 mg) a partir de limoneno (1,7g) em fermentador de 2 L, seja baixo, esse valor ainda foi alto quando comparado com a patente de 1972 por Hasegawa Co.. Nessa patente a produção foi realizada em fermentador de 10L para a produção de 32mg de carvona (KIESLICH *et al.*, 1986).

TAN e col. (1997) obtiveram sucesso na biotransformação de limoneno em  $\alpha$ -terpineol através do fungo *Penicillium digitatum*. A biotransformação mostrou enantioespecificidade ou enantioseletividade, pois converteu (4R)-(+)-limoneno a (4R)-(+)- $\alpha$ -terpineol, mas não o fez com o (4S)-(-)-limoneno, não sendo detectado o produto (4S)-(-)- $\alpha$ -terpineol. O fungo não converteu S(-)-limoneno. As condições ótimas encontradas



**Figura 35.** Transformação do limoneno por *Penicillium italicum*, *Cladosporium sp.* e *Corynebacterium hydrocarboclastrum*.

no estudo foram concentração de oxigênio de 1,60mg/litro e temperatura de 28°C, sendo que acima de 32 °C, a bioconversão sofre uma queda muito abrupta. O pH ótimo da bioconversão foi de 4,5 e a concentração de limoneno ótima foi de 1%. A bioconversão ocorreu principalmente no primeiro dia de contato das células com o substrato, sendo detectada desde o início do contato até a fase log, sendo que após a fase log, a bioconversão caiu dramaticamente, com quantidades traços de produto encontrados durante a fase

estacionária. Houve inibição do processo quando a concentração de  $\alpha$ -terpineol atingiu 1,86mg/ml. O rendimento máximo obtido foi de 3,2mg/ml, com indução enzimática do substrato.

Já se observou a biotransformação do limoneno pela bactéria *Pseudomonas gladioli*. A bioconversão ocorreu principalmente na fase estacionária, tendo como produtos  $\alpha$ -terpineol e ácido perílico, mostrando enantioespecificidade e seletividade, pois converteu (4R)-(-)-limoneno para (4R)-(+)- $\alpha$ -terpineol ou (4S)-(-)-limoneno para (4S)-(-)- $\alpha$ -terpineol, convertendo também (+)-limoneno a (+)-ácido-perílico. (CADWALLADER *et al.*, 1989; BRADDOCK *et al.*, 1995).

ACOSTA *et al.* (1995) estudaram a conversão microbiana do limoneno por *Pseudomonas aeruginosa*. Encontrou-se carvona e  $\alpha$ -terpineol em concentrações de 625 e 239 ppm, respectivamente, após 21 dias. O valor da concentração de limoneno decresce com o aumento da concentração de carvona e  $\alpha$ -terpineol, provando que a síntese foi de limoneno a carvona e  $\alpha$ -terpineol.

O basidiomiceto *Pleurotus sapidus* atuou sobre R-(+)-limoneno tendo como produtos principais cis,trans-carveol e carvona. A biotransformação teve seu rendimento aumentado com o pré-cultivo na presença de limoneno. Depois de 2 dias de transformação, 97% do substrato se acumulou no micélio, e 3% ficaram no meio de cultura. A concentração final foi maior que 100mg/l, quando o limoneno foi adicionado na fase gasosa. Tal rendimento é insuficiente para a sua aplicação em processos industriais em geral (ONKEN e BERGER, 1999b).

Estudos vêm sendo realizados para tentar contornar o baixo rendimento das transformações microbianas. Cita-se o uso de um sistema reacional de duas fases para a biotransformação de terpenos para haver maior proteção aos microorganismos quanto ao efeito da toxicidade causada por substrato, intermediários e produtos, promovendo ainda a prevenção da oxidação dos componentes pelo oxigênio e/ou água. Houve grande inibição do crescimento com concentrações acima de 0,2% de  $\alpha$ -pineno. Esta toxicidade foi contornada com a adição do solvente orgânico 1-dodecanol. (VAN KEULEN *et al.*, 1998).

Segundo KRINGS e BERGER (1998), vários estudos foram realizados quanto a biotransformação de monoterpênos e terpenos de um modo em geral, porém não existe um

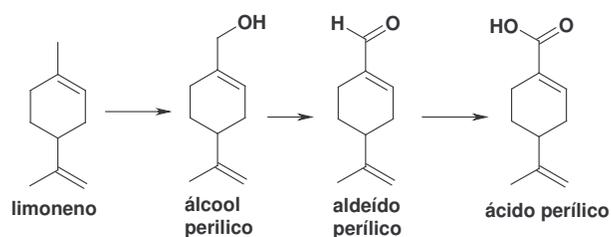
estudo que vise a aplicação do método em uma indústria, como por exemplo, uma produção de grande escala. Isso se deve particularmente as características físicas e químicas de monoterpenos, de terpenos e de seus produtos da biotransformação. Os maiores problemas são alta volatilidade, baixa solubilidade em água, alta citotoxicidade de ambos, tanto do precursor como do produto, além da baixa taxa de transformação.

Apesar disso, técnicas vêm tentando estabelecer uma aplicabilidade da biotransformação para a indústria, pois os terpenos e monoterpenos são de grande interesse comercial. Um exemplo disso é o patenteamento de um processo que transforma alfa ou beta-pineno em 1-carvona com a através de *Pseudomonas* sp. Mas os rendimentos são extremamente baixos para que se pense em uma industrialização do processo. A alta procura pela bioconversão é justificada pelo baixo preço do alfa-pineno, que é encontrado facilmente, pois é o principal subproduto do processamento de árvores coníferas. E apesar de terem baixo custo, os produtos da biotransformação são de alto valor agregado. (GATFIELD, 1988; HAGEDORN e KAPHAMMER, 1994).

VAN DYK e col. (1998) isolaram uma cepa de *Hormonema* sp. capaz de converter o limoneno a trans-isopiperitenol com 31% após 12h enquanto que o (-)- $\alpha$ -pineno foi convertido a verbonona e trans-verbenol, com 6% de rendimento em 96h e o (-)- $\beta$ -pineno foi convertidos a pinocamfona (2% de rendimento após 72h).

Uma nova cepa de *Pseudomonas putida*, tolerante a solvente, foi isolada através do enriquecimento de 5% de limoneno, convertendo o (+)-limoneno em único e estável produto, o ácido perílico. Esse ácido foi produzido na concentração de até 18mM (3.0g/L), que não é uma concentração inibitória do crescimento (SPEELMANS *et al.*, 1998). Essa bioconversão apresenta um interesse comercial muito grande devido a metabolização do limoneno em um único produto. Segundo os autores, o metabolismo dessa bioconversão deve passar pelo álcool, em seguida o aldeído e por último o ácido perílico (Figura 36).

VAN RENSBURG *et al.* (1997) realizaram uma seleção para selecionar microrganismos capazes de transformar piperitona e limoneno. Na Tabela VIII temos os microrganismos que realizaram a biotransformação tanto da piperitona quanto do limoneno com os rendimentos dos produtos.



**Figura 36.** Etapas da bioconversão do limoneno a ácido perílico.

**Tabela VIII.** Biotransformação do limoneno e da piperitona.

 <b>piperitona</b>	 <b>trans-6-hidroxi-piperitona</b>	 <b>7-hidroxi-piperitona</b>	 <b>2-isopropil-5-metil-hidroquinona</b>
<i>Trichosporon</i> sp. UFOS Y-2041	0,2 g/L	-----	Não detectado
<i>Trichosporon</i> sp. UFOS Y-0116	0,1 g/L	-----	0,08 g/l
<i>Arxula adenivorans</i> CSIR Y-1149	-----	0,06 g/L	-----
<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 599 T	-----	0,04 g/L	-----
 <b>limoneno</b>	 <b>isopiperitona</b>	 <b>trans-1,2-dihidroxi-limoneno</b>	 <b>ácido perílico</b>
<i>Trichosporon</i> sp. UFOS Y-2041	0,4 g/L	0,6 g/L	-----
<i>Trichosporon</i> sp. UFOS Y-0116	0,05g/L	Não detectado	-----
<i>Arxula adenivorans</i> CSIR Y-1149	-----	-----	0,06 g/L
<i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 599	-----	-----	1 g/L

### 3. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram:

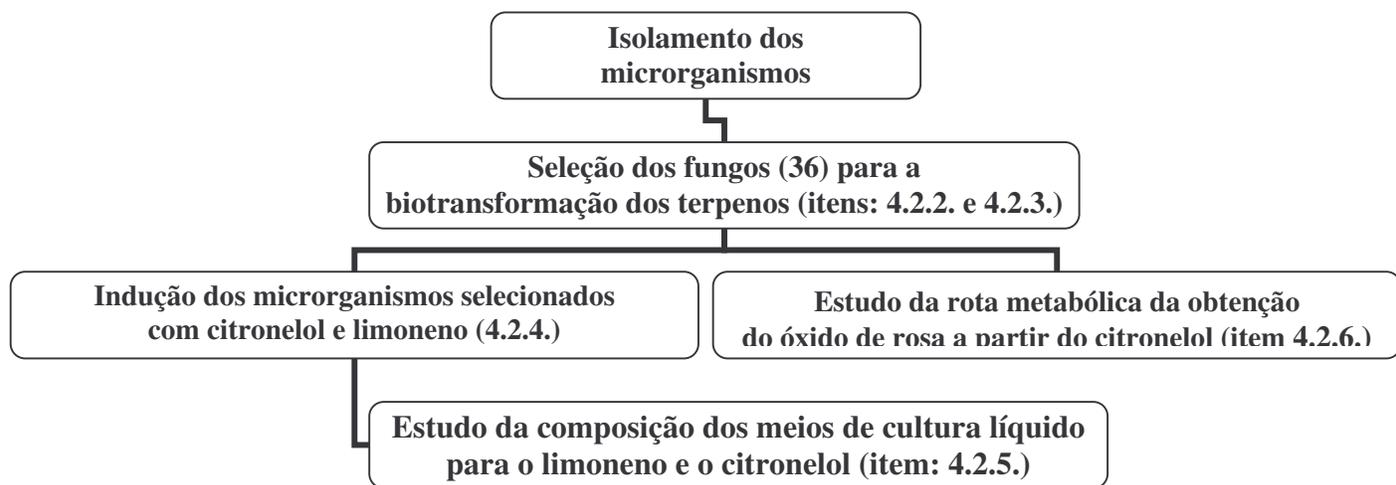
a. Isolar e selecionar microrganismos da Região Nordeste, especificamente, nas regiões do sertão, agreste e região litorânea dos Estados de Alagoas e Sergipe; capazes de transformar o limoneno (1,8-p-mentadieno), o citrionelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol), o geraniol (3,7-dimetil-trans-2,6-octadien-1-ol) e o linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) em compostos de interesse.

b. Estudar a obtenção de óxido de rosa a partir da biotransformação do citrionelol visando a otimização da produção e identificação da rota metabólica para esta obtenção.

c. Estudar a biotransformação do limoneno em alfa-terpineol e carvona.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A seqüência de experimentos realizados encontra-se no organograma abaixo, a fim de facilitar a compreensão da metodologia utilizada e dos resultados obtidos.



### 4.1. Material e Equipamentos.

#### 4.1.1. Material.

Os reagentes químicos utilizados foram todos de grau de análise (PA), sendo os seguintes com as respectivas marcas: cloreto de sódio (Merck e Reagen); sulfato de sódio anidro (Merck); acetato de etila (Merck); pentano (Merck); éter dietílico (Merck).

O conteúdo dos meios de cultura foram: extrato de malte (difco); peptona de carne (Difco); peptona de caseína (Merck); extrato de levedura (Oxoid); agar (Difco e Merck); glicose (Reagen e Merck); asparagina monohidratada (Aldrich e Merck); fosfato de potássio monobásico (Merck); sulfato de magnésio (Reagen); nitrato de sódio (Reagen);

fosfato de potássio dibásico (Reagen e Merck); sulfato de ferro II (Reagen); cloreto de ferro III (Reagen); sulfato de zinco heptahidratado (Reagen); sulfato de manganês (Reagen); sulfato de cobre (Reagen).

Os padrões autênticos que serviram para a confirmação e referência deste trabalho foram: Limoneno (Merck); Geraniol (Aldrich); Citronelol (Merck e Aldrich); Linalol (Aldrich); Cânfora (Aldrich); óxido de rosa D, óxido de rosa L, alfa-terpineol, óxido de linalol (furano) (DRAGOCO); linalol, mirceno, ocimeno, alfa-terpineol (SUN FOODS).

#### **4.1.2. Equipamentos.**

- Shaker New Brunswick refrigerado modelo G 25
- Shaker refrigerado programável INNOVA 4335
- Shaker de banho new brunswick, modelo G-76
- Shaker de banho New Brunswick Scientific - CLASSIC SERIES - EDSON, NJ, USA)
- Estufa Fanem para secagem de vidraria
- Autoclave Fanen mod 415
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Estufas Bacteriológicas Fanen mod. 002 – CB
- pHmetro - METTLER TOLEDO 320 - Laboratory Equipment (UK).
- balança analítica Explorer -OHAUS CORPORATION (USA)
- balança Precision Plus - OHAUS CORPORATION (USA)
- cromatógrafo gasoso Chrompack com coluna capilar CP-SIL-5CB (60m X 0,25mm X 0,25µm).
- Programa do GC - Chem Station - Agilent Technologies 1990-2000 (USA.)
- cromatógrafo gasoso Carlo Erba Instruments, modelo HRGC 5300 Mega Series com coluna capilar Carbowax (30m X 0,32mm X 0,4µm).
- cromatografo gasoso Fisons GC 8000 acoplado a detector de massas seletivo Fisons MD 800 com coluna capilar Carbowax (30m X 0,32mm X 0,4µm).
- cromatografo gasoso acoplado a detector de massas da Shimadzu (CG-MS)

## **4.2. Metodologia.**

### **4.2.1. Isolamento dos microrganismos.**

A coleta de amostras de frutas e solo foi realizada na região Nordeste, nas cidades de Jaramataia, Batalha, Jacaré dos Homens, Olho d'Água das Flores e Olho D'Água do Casado no Sertão de Alagoas; na cidade de Piranhas/AL, no agreste; e na Região Litorânea do Estado de Alagoas, nas cidades de São Luis do Quitunde, Barra do Camarajipe, Passo de Camarajipe e Porto da Rua. Ainda na Região Nordeste, as amostras foram coletadas no Estado de Sergipe, na cidade de Aracaju, na região litorânea.

As frutas foram coletadas no Mercado Municipal de Maceió – Estado de Alagoas; e no Mercado Municipal de Aracaju – Estado de Sergipe. Dentre as frutas foram selecionadas a goiaba; acerola; manga rosa e espada; maracujá; tamarina; graviola; carambola; sapoti; mamão; umbu (-caja) e seriguela.

As frutas foram cortadas e acondicionadas em frascos plásticos abertos para exposição ao ambiente por 7 dias (Figura 38). Após esse tempo as amostras foram inoculadas em frasco contendo meio líquido YM, por 96 horas, em estufa a 30°C. O meio YM apresenta a seguinte composição: glicose (1% (p/v)), extrato de malte (0,3% (p/v)); peptona de carne (0,5% (p/v)) e extrato de levedura (0,3% (p/v)), com pH não ajustado.

O isolamento também foi realizado no meio sólido YM, em placas de petri contendo 20 mL do respectivo meio e Agar (2% (p/v)). Esses microrganismos também foram conservados em meio YM.

### **4.2.2. Biotransformação dos Terpenos.**

O inóculo foi preparado com os microrganismos previamente isolados, cultivados em meio sólido YM, por 96h, a 30°C, em estufa.

Uma suspensão da cultura dos fungos em meio sólido com água destilada, 10mL, previamente esterilizada, por 15 minutos, a 121 °C, foi preparada; e foi adicionada  $1 \times 10^7$  esporos aos erlenmeyers de 125ml contendo 25 mL de meio contendo (% (p/v)): glicose 1%, extrato de malte 2%, peptona 1%, e extrato de levedura 0,3%, previamente esterilizado (VAN RENSBURG *et al.*, 1997).

Os frascos foram mantidos sob agitação (160rpm) a 30°C. Após 72h de crescimento, o substrato monoterpênico (0,1%) foi adicionado diretamente ao frasco de cultura, com subseqüentes adições, a cada 24 horas por 3 dias. Na última adição, o cultivo de cada uma das linhagens permaneceu por mais 24h, para em seguida o seu conteúdo ser analisado. O conteúdo de cada um dos erlenmeyers foi filtrado em papel whatman número 1. No filtrado mediu-se o pH e realizou-se a extração dos compostos biotransformados.

A massa celular foi incubada em estufa a 70°C por 24h, para medida do peso seco de cada um dos microrganismos.

Os substratos monoterpênicos utilizados foram o limoneno, o geraniol, o citronelol e o linalol.

Foram realizados experimentos controle com meio de cultura e o terpeno na concentração de cada experimento; e um outro controle para o microrganismo e o meio de cultura na ausência de terpeno.

#### **4.2.3. Extração, Identificação e Quantificação dos produtos da biotransformação.**

O filtrado do meio de cultura foi saturado com NaCl (5g) e extraído com acetato de etila (10mL). A fase orgânica foi transferida para um outro frasco após a extração, sendo seca com sulfato de sódio anidro (0,4g).

Para a quantificação dos produtos formados, essas amostras (990 $\mu$ L) foram contaminadas com o padrão interno, decano (10 $\mu$ l), para em seguida serem analisadas em um cromatógrafo a gás (CG) Chrompack numa coluna capilar CP-SIL-5CB (60m de comprimento X 0,25mm de diâmetro X 0,25 $\mu$ m de espessura do filme). A amostra (1  $\mu$ L) foi injetada em modo splitless, a uma temperatura de 220°C e o detector a 250°C; a coluna foi mantida a temperatura inicial de 40°C por 1 minuto, sendo aquecida a 5°C por minuto até 210°C, permanecendo a 210°C por 5 minutos.

A identificação foi realizada co-injetando-se os padrões com as amostras, além da confirmação em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de massas da Shimadzu (CG-MS) com a mesma coluna acima descrita, e também do cálculo do índice de Kovats a partir da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos e a amostra.

#### **4.2.4. Indução com citrionelol e limoneno.**

##### **4.2.4.1. Indução com citrionelol**

Após 72 horas de crescimento, em shaker a 30°C, por 72 horas a 160 rpm, de cada linhagem, (LB-2025 (no. 8), LB-2036 (no. 9) e LB-2038 (no. 36)), em meio líquido YM, adicionou-se o citrionelol (0,1% (v/v)) em cada frasco de cultura. Depois de 48 horas transferiu-se o conteúdo de 25 % (v/v) deste erlenmeyer, contendo o microrganismo, para um novo meio, incubando-se novamente no shaker, a 30°C, por 72 horas a 160 rpm,.

A estas linhagens foi adicionado também 2% de óxido de rosa e 5% de citrionelol, e os frascos incubados por mais 72 horas para posterior plaqueamento das amostras, isolando os microrganismos induzidos, em tubo de ensaio, contendo o mesmo meio.

#### **4.2.4.2. Indução com limoneno**

Após 72 horas de crescimento, de cada linhagem, (LB-2025 (no. 8) e LB-2038 (no. 36)), em meio líquido YM, adicionou-se o limoneno (0,1% (v/v)) em cada frasco de cultura. Depois de 48 horas transferiu-se o conteúdo de 25 % (v/v) deste erlenmeyer, contendo o microrganismo, para um novo meio, incubando-se novamente no shaker, a 30°C, por 72 horas a 160 rpm,.

A estas linhagens foi adicionado também 2% de carvona e  $\alpha$ -terpineol, e 5% de limoneno. Os frascos foram incubados por mais 72 horas, sendo que as amostras foram plaqueadas de maneira a isolar os microrganismos induzidos, em tubo de ensaio, contendo o mesmo meio.

#### **4.2.5. Estudo da composição dos meios de cultura líquidos a serem utilizados para a biotransformação.**

O estudo da otimização foi realizado com as linhagens de microrganismos que foram induzidas com citrionelol e limoneno, e os seus respectivos produtos da biotransformação. Essas linhagens foram as que apresentaram as concentrações mais altas de carvona e  $\alpha$ -terpineol, como resultado da biotransformação do limoneno; e do óxido de rosa como resultado da biotransformação do citrionelol.

#### 4.2.5.1. Biotransformação do Citronelol e do Limoneno.

As linhagens selecionadas, utilizadas na indução, foram cultivadas em diferentes meios líquidos, em duas concentrações diferentes de inóculo ( $1 \times 10^7$  esporos e  $3 \times 10^7$  esporos), a fim de se obter o melhor meio de cultura e a melhor concentração de inóculo, tanto para a biotransformação do citronelol quanto para a biotransformação do limoneno. Os meios utilizados apresentavam a seguinte composição (%(p/v)):

- **Meio 1:** glicose (1%), extrato de malte (2%), peptona (1%), extrato de levedura (0,3) (VAN RENSBURG et al., 1997; VAN DYK et al., 1998; TAN e DAY, 1998a; TAN e DAY, 1998b);

- **Meio 2:** glicose (3%), extrato de levedura (0,3%), Asparagina monohidratada (0,45%), fosfato de potássio monobásico (0,15%), sulfato de magnésio (0,05 %); Solução traço (0,1% (v/v)) (A solução traço foi composta de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 80mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 90mg/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 30mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 5 mg/L e EDTA: 0,4g/L) (ONKEN e BERGER, 1998 e 1999).

- **Meio 3:** glicose (1%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,3%) (BUSMANN e BERGER, 1994);

- **Meio 4:** sulfato de magnésio (0,05%), nitrato de sódio (0,3%), fosfato de potássio di-básico (0,1%), cloreto de potássio (0,05%), sulfato de ferro II (0,001%) (BRUNERIE *et al.*, 1987).

O inóculo utilizado foi preparado a partir do crescimento de cada linhagem em meio sólido YM, por 96h a 30°C, em estufa.

Foram preparadas uma suspensão de cada linhagem com água destilada, 10mL, previamente esterilizada, por 15 minutos, a 121 °C. Essa suspensão contendo  $1 \times 10^7$  esporos ou  $3 \times 10^7$  esporos, foi adicionada a erlenmeyers de 125 ml contendo 25 mL de cada meio de cultura testado, previamente esterilizado.

Os frascos foram mantidos em agitação a 160 rpm a 30<sup>0</sup>C. Após 72h de crescimento, o terpeno (citronelol ou limoneno) foi adicionado diretamente ao frasco de cultura, com subseqüentes adições, a cada 24 horas por 3 dias. Na última adição, o cultivo do microrganismo permaneceu por mais 24h, sendo em seguida o seu conteúdo filtrado em papel whatman número 1.

No filtrado mediu-se o pH e foi realizada também a extração dos compostos biotransformados. A massa celular foi seca em estufa a 70°C por 24h, para a determinação do peso seco de cada uma das linhagens.

A concentração de citronelol utilizada foi de 0,1% (v/v) ou 0,5% (v/v); enquanto que para o limoneno a concentração foi de 0,1% (v/v) e 1% (v/v).

Para a biotransformação do limoneno foi realizado um experimento adicional onde o pH inicial dos quatros meios líquidos, citados anteriormente, tiveram o seu pH ajustado para 6,0 com NaOH, 0,1N e com adição de 0,1% (v/v) de limoneno.

#### **4.2.6. Estudo da rota metabólica da obtenção do óxido de rosa a partir do citronelol.**

##### **4.2.6.1. Microrganismos.**

As linhagens utilizadas para esses experimentos foram as de número: LB-2000, LB-2003, LB-2010, LB-2015, LB-2017, LB-2025, LB-2029, LB-2038, LB-2047, LB-2060; de acordo com a numeração da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Bioaromas – Depto. de Ciência de Alimentos/FEA, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Gláucia M. Pastore, UNICAMP.

Esses microrganismos foram mantidos em meio sólido YM, em placas de Petri e repicados para tubo de ensaio contendo meio YM sólido. Nesse caso a peptona utilizada foi de caseína.

#### **4.2.6.2. Inóculo.**

As linhagens foram cultivadas em tubo de ensaio contendo o meio YM, em estufa a 30°C por 96h. Colocou-se 5mL de água destilada estéril em cada tubo de ensaio. Os esporos foram raspados, através da alça de platina, para obtenção da suspensão de esporos, conforme citado anteriormente (item 4.2.2.).

Dessa suspensão retirou-se  $10^7$  esporos para inocular no meio de cultura, em erlenmeyer de 200mL contendo 40 mL de meio líquido de número 4 (item 4.2.5.1.); e  $3 \cdot 10^7$  esporos em erlenmeyer de 500mL contendo 400 mL do meio líquido de número 2 (item 4.2.5.1.), de acordo com ONKEN e BERGER (1998, 1999).

No caso dos experimentos em meio líquido número 2, o inóculo dos esporos é utilizado apenas como pré-inóculo do meio de cultura para a biotransformação. Desse pré-inóculo transferiu-se 18 mL de cada cultura para um novo meio de cultura líquido de número 2.

#### **4.2.6.3. Biotransformação em meio de cultura líquido número 2 e número 4.**

O meio de cultura utilizado inicialmente foi o meio líquido número 4 (item 4.2.5.1.), e posteriormente foi utilizado o meio líquido número 2 (item 4.2.5.1.) com pH 6,0, ajustado com NaOH, 0,1N.

Os erlenmeyers, do meio de cultura líquido número 2 e 4, foram incubados em shaker a 160 rpm a 30°C por 72 horas, para posterior adição do terpeno.

A adição do citrônolol ao meio líquido de número 2 foi realizada, numa única etapa de citrônolol (0,125 % (v / v)). Foi ainda utilizado o óxido de rosa como substrato da biotransformação também na concentração de 0,125% (v/v).

Os erlenmeyers, do meio de cultura líquido número 4 tiveram a adição do citrônolol na concentração de 0,3 % (v/v), também de uma única vez. As condições de incubação foram as mesmas citadas anteriormente.

Foi realizado ainda um experimento utilizando o limoneno (0,0063 % (v/v)) como co-solvente do citrônolol (0,125 % (v/v)); e uma cultura adaptada inicialmente com citrônolol para avaliar a possibilidade de aumentar a produção de óxido de rosa.

#### **4.2.6.4. Estudo da utilização de co-solvente para a biotransformação do citrônolol**

A linhagem LB-2038 (no. 36) foi utilizada para estudar a utilização do limoneno (0,0063%) como co-solvente do citrônolol (0,125 % (v/v)) no meio líquido número 2 (item 4.2.5.1.).

#### **4.2.6.5. Estudo da linhagem LB-2038 adaptada com citrônolol, no meio de cultura líquido número 2.**

A linhagem LB-2038 foi inoculada, a partir de uma suspensão de esporos contendo  $3 \times 10^7$  esporos, no meio líquido número 2, pH inicial 6,0; e após 8h de crescimento foi adicionado citrônolol (0,125 % (v/v)) ao meio.

Após 20h transferimos (18 mL) para um novo meio de cultura de mesma composição, e colocamos novamente no shaker, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Uma outra adaptação foi realizada aonde após 72 horas de inoculados os esporos, e com formação dos pellets, adicionamos citronelol (0,125% (v/v)). Após 24 horas da adição transferimos (18 mL) desse meio para um novo meio de cultura.

#### **4.2.6.6. Extração, Identificação e Quantificação dos produtos da biotransformação.**

O filtrado do meio de cultura, 4 mL, foi extraído com uma mistura de pentano:éter (1:1) (2 mL), adicionando-se canfora (10 mg/L), como padrão interno. A fase orgânica foi transferida para um outro frasco após a extração, adicionando-se a este sulfato de sódio anidro (0,05g).

Para a análise e quantificação das amostras utilizou-se o CG e o CG-MS, onde a coluna capilar utilizada foi de sílica fundida Carbowax 20M (30m de comprimento X 0,32mm de diâmetro interno X 0,4 $\mu$ m de espessura do filme). As condições de análises foram: injeção diretamente na coluna (on-column) da amostra (2 $\mu$ L), utilizando um programa de temperatura de 40°C por 3 minutos, com 3°C por minuto até 230°C, permanecendo por mais 15 minutos a 230°C.

A identificação foi realizada com o CG-MS (Fisons GC 8000), contendo a mesma coluna acima descrita e nas mesmas condições. O detector de massas tinha a interface de 230°C, fonte iônica de 200°C, quadrupolo de 100°C, ionização eletrônica 70eV, m/z=33 – 300.

Foi calculado o índice de retenção para essas amostras também, a partir de uma mistura de hidrocarbonetos, contendo hidrocarbonetos lineares com 9, 10, 12, 13, 14 e 16 átomos de carbono.

O Índice de Retenção ou índice de Kovats foi calculado a partir de uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C9-C10-C12-C13-C14-C16), relacionando-se os picos das amostras e os picos dos padrões autênticos.

A fórmula para o cálculo do índice de retenção foi:

$$IR = \frac{(T_{rx} - T_{rcn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \times 100}{T_{rcn} - T_{rcn-1}} \times (C_{n-1} \times 100)$$

Onde:

IR = Índice de Retenção

$T_{rx}$  = Tempo de retenção da substância em questão

$T_{rcn}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção após  $T_{rx}$

$T_{rcn-1}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção anterior  $T_{rx}$

$C_n$  = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com  $T_{rcn}$

$C_{n-1}$  = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com  $T_{rcn-1}$

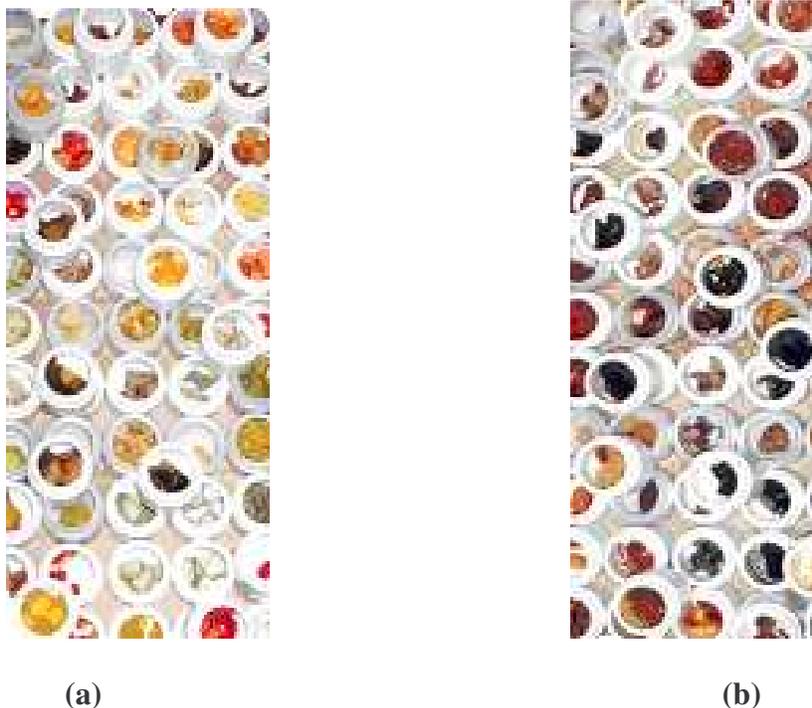
O índice de retenção foi comparado com o banco de dados demonstrativo, ESO 00 Database of Essential oils ([www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)).

Não se encontrou nenhuma concentração dos produtos aqui analisados nem no controle com adição de terpeno e nem no controle com apenas o microrganismo. Quando se encontravam estes eram descontados dos experimentos de biotransformação.

## 5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento dos microrganismos.

As frutas foram cortadas e acondicionadas em frascos plásticos abertos para exposição ao ambiente por 7 dias (Figura 37). Após esse tempo as amostras foram inoculadas em frasco contendo meio líquido YM (item 4.2.), por 96 horas, em estufa a 30°C.

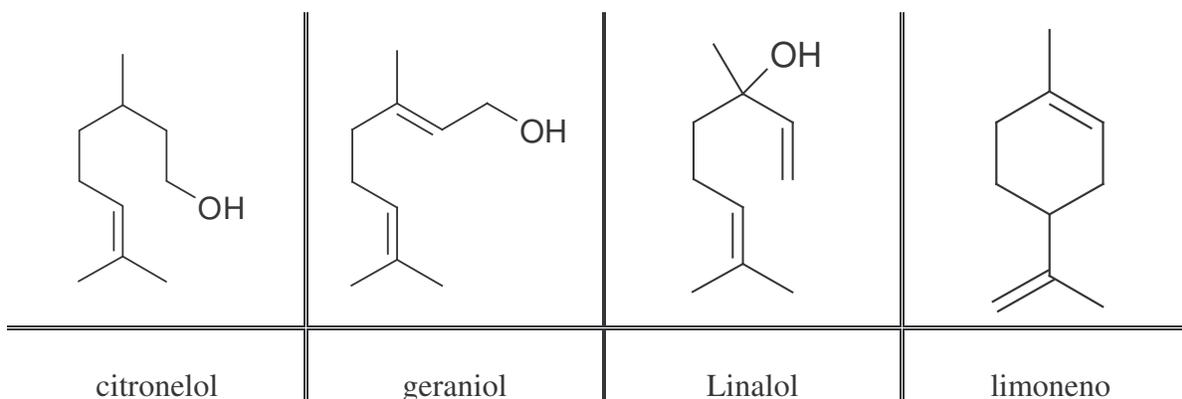


**Figura 37.** Amostras de frutas acondicionadas em frascos (a) e após exposição ao ar por 168 horas (b).

O isolamento foi realizado em meio sólido YM (item 4.2.) para a biotransformação de terpenos. Das 368 amostras isolou-se 669 microrganismos, sendo 166 fungos (bolors), 180 leveduras e 323 bactérias.

Dos fungos utilizou-se 36 linhagens para a biotransformação utilizando como substrato o citronelol, geraniol, linalol e limoneno (Figura 38). As linhagens de fungos

utilizadas com a sua origem e a respectiva numeração da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas encontram-se na Tabela IX.



**Figura 38.** Estrutura dos terpenos utilizados para a biotransformação por microrganismos, na etapa de seleção.

## 5.2. Seleção dos microrganismos.

Pelo menos cinco extratos, de cada microrganismo cultivados em meio líquido, de cada produto da biotransformação com citronelol, limoneno, geraniol e linalol, foram inicialmente analisados por CG-MS, conforme item 4.2.3.. Dessa maneira tivemos uma idéia dos possíveis produtos de cada uma das biotransformações.

Em seguida, foi feita a co-injeção do padrão nas amostras, cálculo do índice de retenção, a sua quantificação com o padrão interno (decano), e a quantificação a partir de uma curva padrão.

### 5.2.1. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do citronelol.

O Anexo I mostra o cromatograma do íon total obtido por espectrometria de massa do produto da biotransformação do citronelol, os isômeros do óxido de rosa (tetrahydro-4-

metil-2-(2-metil-1-propenil)-2H-Pirano). Os dados de m/z (%) para o isômero a do óxido de rosa foram: 69 (100), 139 (83), 55 (42), 83 (33), 154 (13); e para o isômero b foram:

**Tabela IX.** As 36 linhagens utilizadas na etapa de seleção da biotransformação de terpenos, de acordo com a sua origem e a respectiva numeração da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioaromas.

Solo/Fruta	Numeração da coleção do Lab. De Bioaromas	Número
Casca de Goiaba	LB-2002	1
Sapoti com casca	LB-2007	2
Sapoti só a casca	LB-2041	3
Sapoti só a casca	LB-2060	4
Acerola com casca – madura	LB-2001	5
Acerola com casca (madura)	LB-2057	6
Acerola com casca (madura)	LB-2008	7
Manga Espada (bem madura)	LB-2025	8
Manga Espada (bem madura)	LB-2036	9
Manga espada (bem madura)	LB-2080	10
Tamarina	LB-2054	11
Tamarina	LB-2044	12
Tamarina	LB-2037	13
Tamarina	LB-2029	14
Casca da Graviola	LB-2074	15
Casca da Graviola	LB-2084	16
Goiaba vermelha (polpa)	LB-2019	17
Caju	LB-2085	18
Manga rosa (polpa e casca)	LB-2045	19

Solo/Fruta	Numeração da coleção do Lab. De Bioaromas	Número
Manga rosa polpa + casca	LB-2010	20
Manga rosa (polpa e casca)	LB-2034	21
Goiaba vermelha (casca e polpa)	LB-2042	22
Umbu	LB-2015	23
Umbu	LB-2086	24
Manga Espada (bem madura)	LB-2013	25
Jamelão cortado (manjelão)	LB-2040	26
Graviola (casca e polpa)	LB-2077	27
Manjelão	LB-2082	28
Semente sapoti	LB-2033	29
Caju vermelho (casca e polpa)	LB-2026	30
Solo (antigo açude na região do sertão alagoano)	LB-2000	31
Solo (antigo açude na região do sertão alagoano)	LB-2004	32
Solo (antigo açude na região do sertão alagoano)	LB-2050	33
solo(antigo açude	LB-2075	34

<b>Solo/Fruta</b>	<b>Numeração da coleção do Lab. De Bioaromas</b>	<b>Número</b>
na região do sertão alagoano)		
Solo (antigo açude na região do sertão alagoano)	LB-2068	35
acerola	LB-2038	36

60(100), 139 (79), 41 (63), 55 (42), 8 (33) (Anexo II). A similaridade no banco de dados do CG-MS foi de 91% (Anexo II) para cada um dos dois isômeros do óxido de rosa.

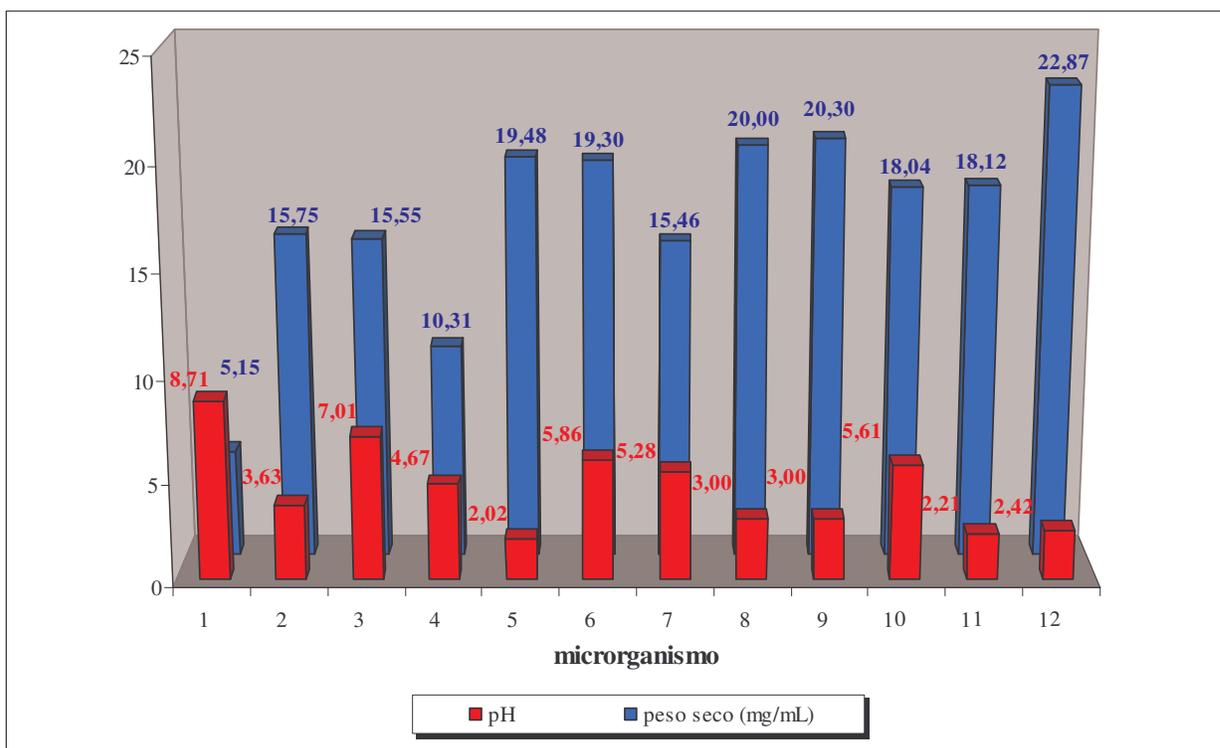
O índice de retenção para a coluna cromatográfica CP SIL 5 CB (a mesma que a DB-1, a HP-1 ou a OV101), para o óxido de rosa isômero a foi de 1101 e para o isômero b do óxido de rosa foi de 1105. Esse foi o valor encontrado também para os padrões do óxido de rosa (Anexo III), enquanto que nos experimentos sem o microrganismo mas com adição de citrionelol, a concentração de óxido de rosa foi desprezível (Anexo IV).

Os valores encontrados estão em conformidade com o banco de dados ESO 00 Database of essential oils ([www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)), o tempo de retenção para o cis-óxido de rosa é de 1087 e para o trans-óxido de rosa é de 1100. Esse banco de dados mostra ainda de que plantas os óleos essenciais podem ser obtidos com as respectivas concentrações.

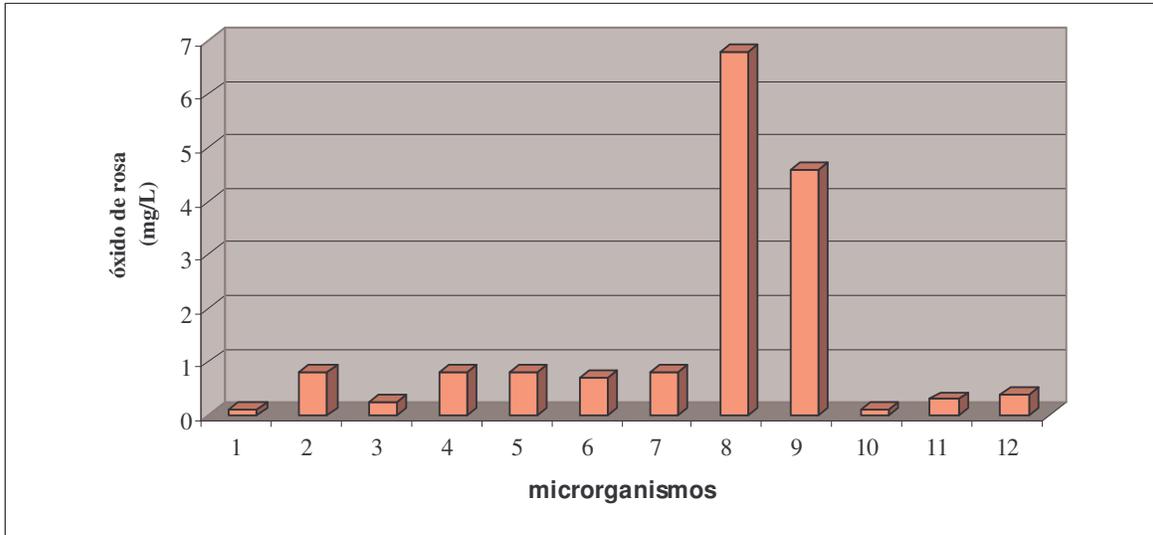
O cis-óxido de rosa pode ser encontrado em *Geranium*, Bourbon 11 (Espécie botânica: *Pelargonium graveolens* L'Herit. ex Aiton (*P. roseum*), fam. Geraniaceae), na concentração de 0,60% (SOUTHWELL *et al.*, 1995); e em Rosa (Bulgaria) 3a (espécie botânica: *Rosa damascena* Mill., fam. Rosaceae), na concentração de 0,25% (BOELENS AND BOELENS, 1997). O trans-óxido de rosa foi encontrado na concentração de 0,30% e 0,15%, para as respectivas espécies botânicas citadas anteriormente (SOUTHWELL *et al.*, 1995; BOELENS AND BOELENS, 1997).

Nas Figuras 39 a 44 encontram-se o resultado da biotransformação do citrionelol, para as 36 linhagens testadas nessa etapa de seleção, quanto ao peso seco final (mg/mL) e pH final; concentração de óxido de rosa (mg/L) e a concentração de citrionelol (mg/mL).

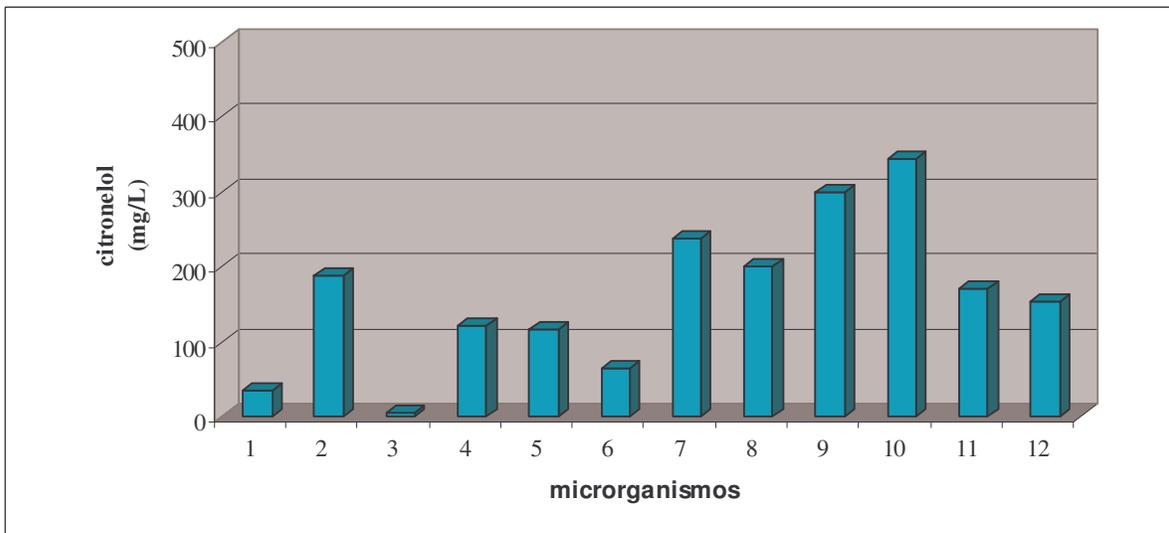
De acordo com as Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44, observamos que a biotransformação do citrionelol a óxido de rosa acontece quando o microrganismo tem seu pH final na faixa ácida (pH de 1 a 3), como para o linhagem LB-2025 (número 8) e LB-2036 (número 9). Se o pH final for próximo a sete, a concentração de óxido de rosa é menor do que 0,5 mg/L (Figura 40 e Figura 44; linhagens LB-2041 (no. 3) igual a 0,3 mg/mL, linhagem LB-2004 (no. 32) igual a 0,1 mg/mL e linhagem LB-2050 (no. 33) igual a 0,3 mg/mL).



**Figura 39.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do citrônolol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044).

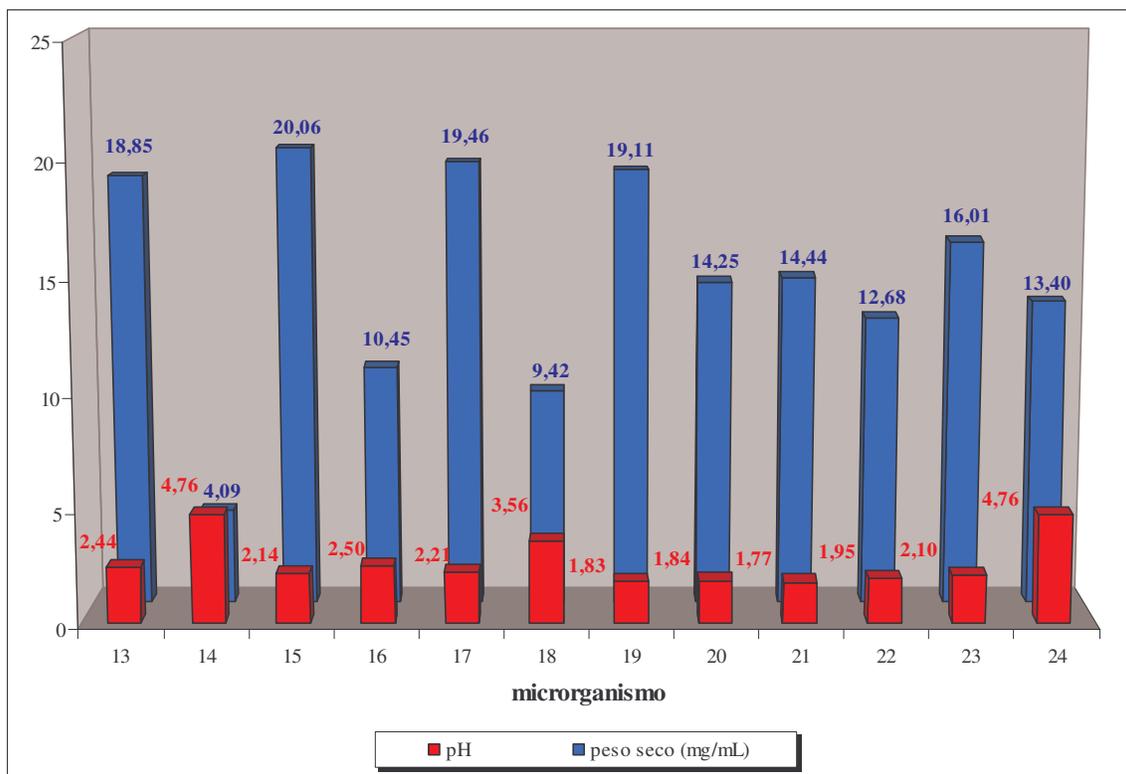


(a)

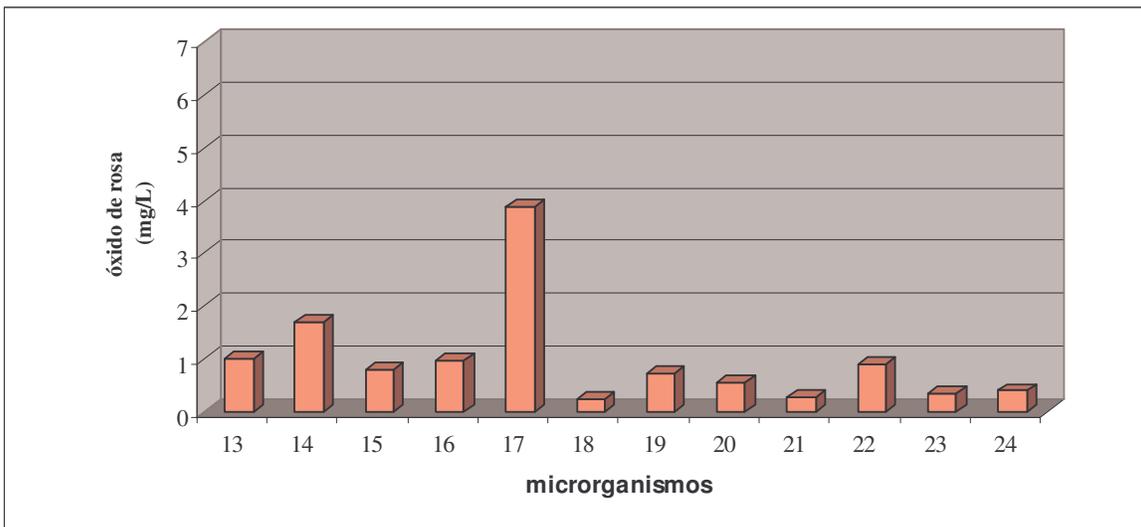


(b)

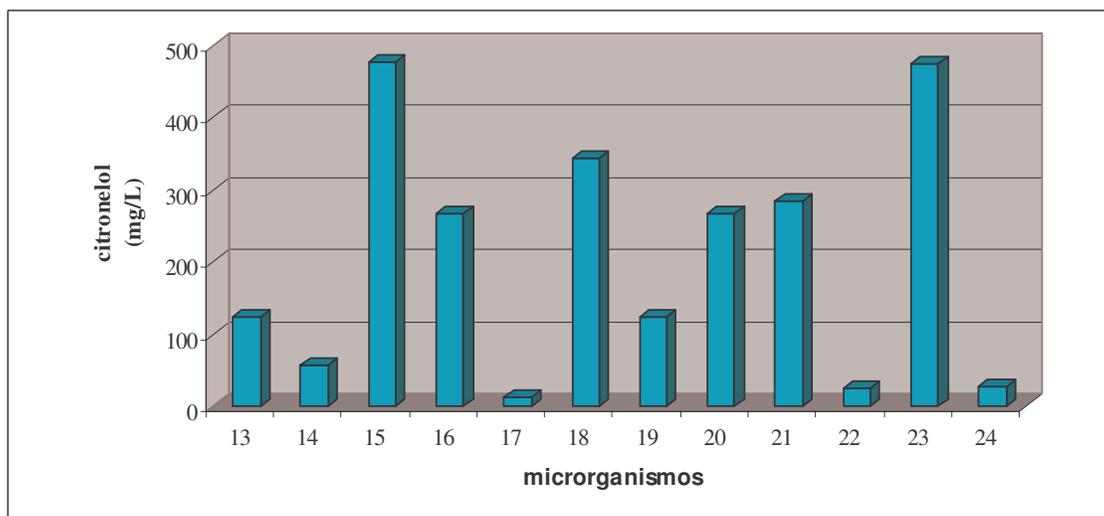
**Figura 40.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citronelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do citronelol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044).



**Figura 41.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do citrônolol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).

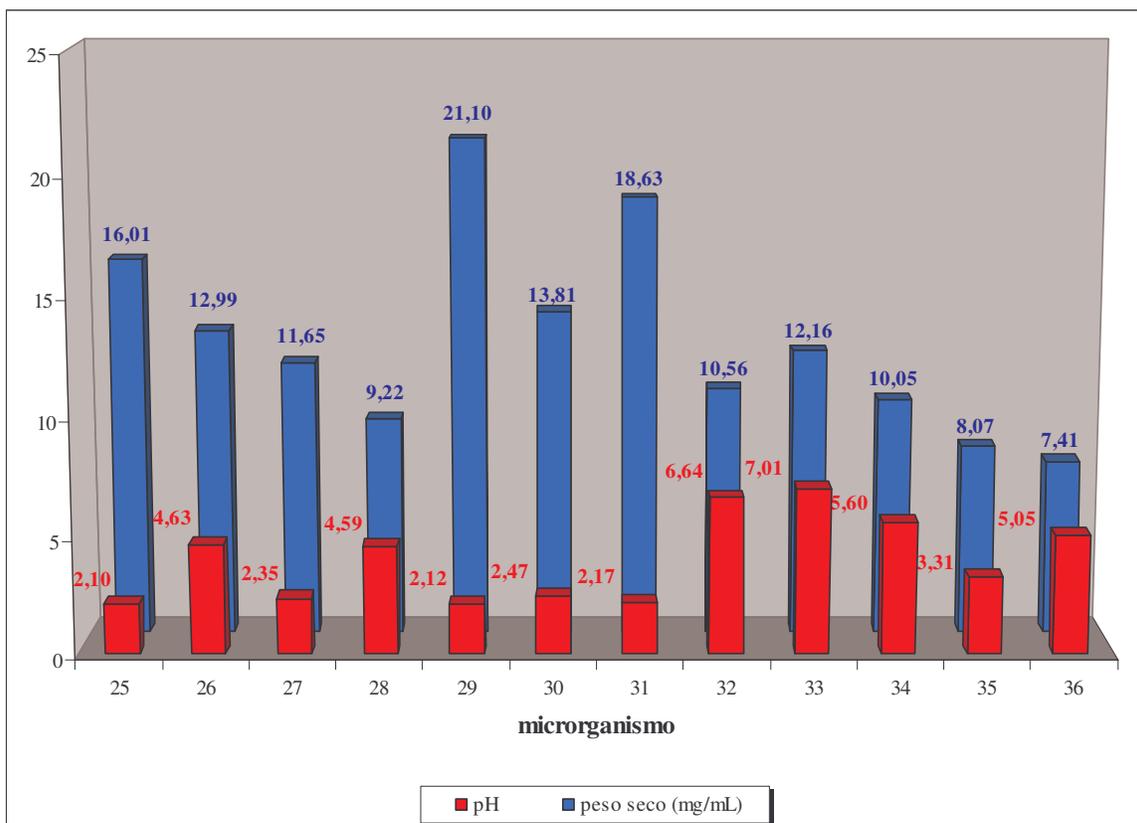


(a)

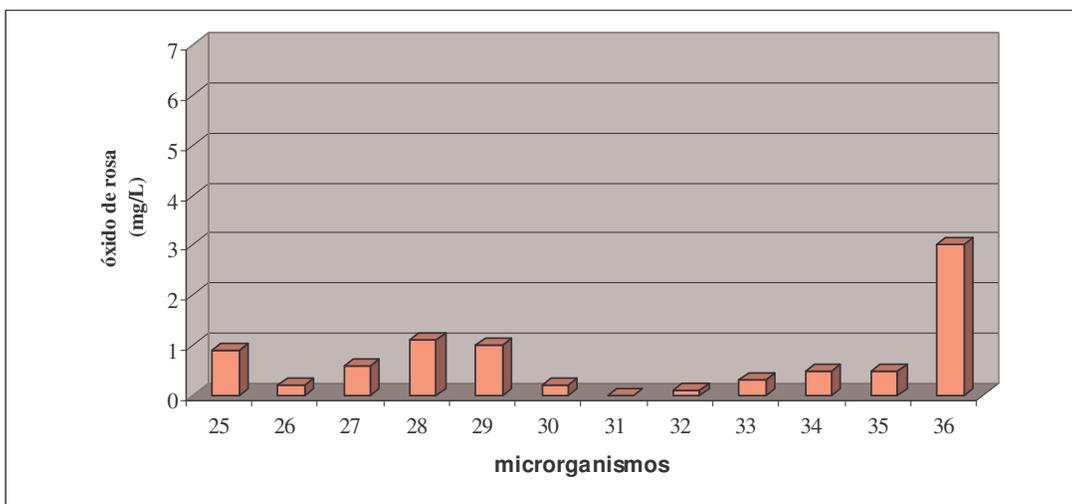


(b)

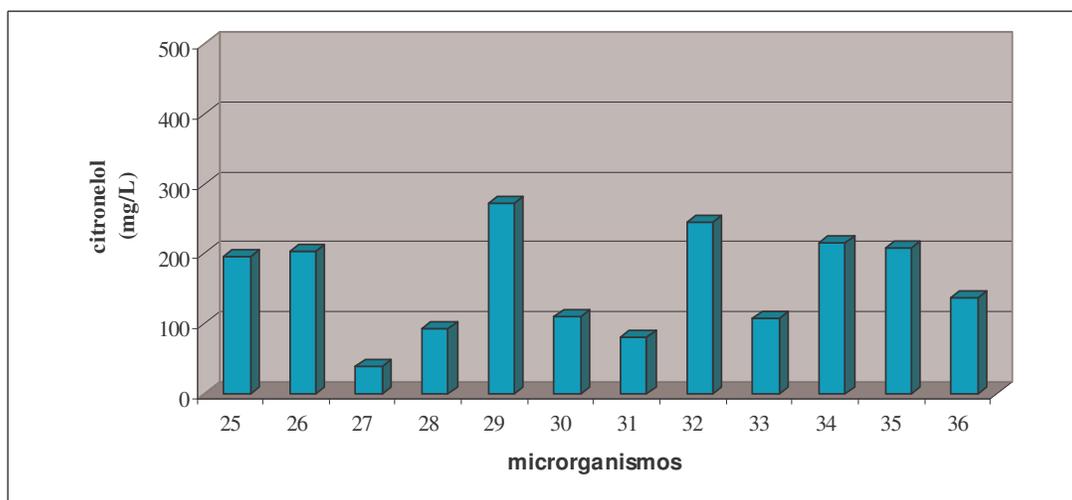
**Figura 42.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citronelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do citronelol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).



**Figura 43.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do citrionelol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038).



(a)



(b)

**Figura 44.** Concentração de óxido de rosa (mg/L) (a) e concentração de citronelol remanescente no meio de cultura (mg/L) (b) para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do citronelol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000; linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038).

A linhagem LB-2000 (no. 31) se mostrou uma exceção, uma vez que o pH final foi de 2,17 e a concentração de óxido de rosa próxima a zero, 0,1 mg/mL (Figura 43).

Em relação ao peso seco observamos que esses microrganismos isolados foram capazes de crescer em diferentes pHs, desde a faixa ácida até a neutralidade (Figura 39, 41 e 43).

Apenas o linhagem LB-2002 (no.1), que apresentou pH final mais básico (8,71), foi que apresentou uma massa menor do que os demais (5,15 mg/mL).

Quanto ao óxido de rosa (Figura 40a, 42a e 44a) as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) foram capazes de obter maior concentração de óxido de rosa a partir da biotransformação do o citrionelol.

Cabe ressaltar que o óxido de rosa apresenta um valor de mercado 25 vezes maior do que o do citrionelol (Tabela X)

**Tabela X.** Comparação do valor do óxido de rosa, produto da biotransformação, em relação ao citrionelol

<b>COMPOSTO</b>	<b>PREÇO/QUANTIDADE</b> <b>(U\$/mL)</b>
Citrionelol	0,27
Óxido de rosa	17,60

A concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura mostrou-se intermediária em relação às demais linhagens (Figura 40b, 42b e 44b). Neste caso, a concentração de citrionelol remanescente no meio (Figura 40b, 42b, 44b) não mostrou uma relação direta com a produção do óxido de rosa (Figura 40b, 42b, 44b) e nem com o pH e a massa celular (Figura 39, 41 e 43).

As melhores concentrações de óxido de rosa (6,5 mg/L, para a linhagem LB-2025 (no. 8) e 4,5 mg/L, para a linhagem LB-2036 (no. 9)) são inferiores as encontradas em plantas; no entanto, o fato de ter sido obtido o óxido de rosa por biotransformação, é muito

importante. O óxido de rosa obtido através de processos biotecnológicos é considerado natural, logo de fácil aceitação pelo consumidor. Além disso, para obter essas concentrações de óxido de rosa por plantas precisamos de quantidades muito grandes, da ordem de Kg ou toneladas, de plantas. Por microrganismos pode-se realizar a biotransformação em escalas industriais de modo a se obter maiores quantidades. Daí a importância para o trabalho de seleção em obter microrganismos capazes de realizar essa biotransformação com maior eficiência.

Após esta etapa do trabalho foram selecionadas as linhagens de número 8 e 9, que correspondem a LB-2025 e LB-2036, respectivamente, para estudar o seu comportamento ao longo da biotransformação do citrionelol bem como o comportamento da produção de óxido de rosa em diferentes meios de cultura.

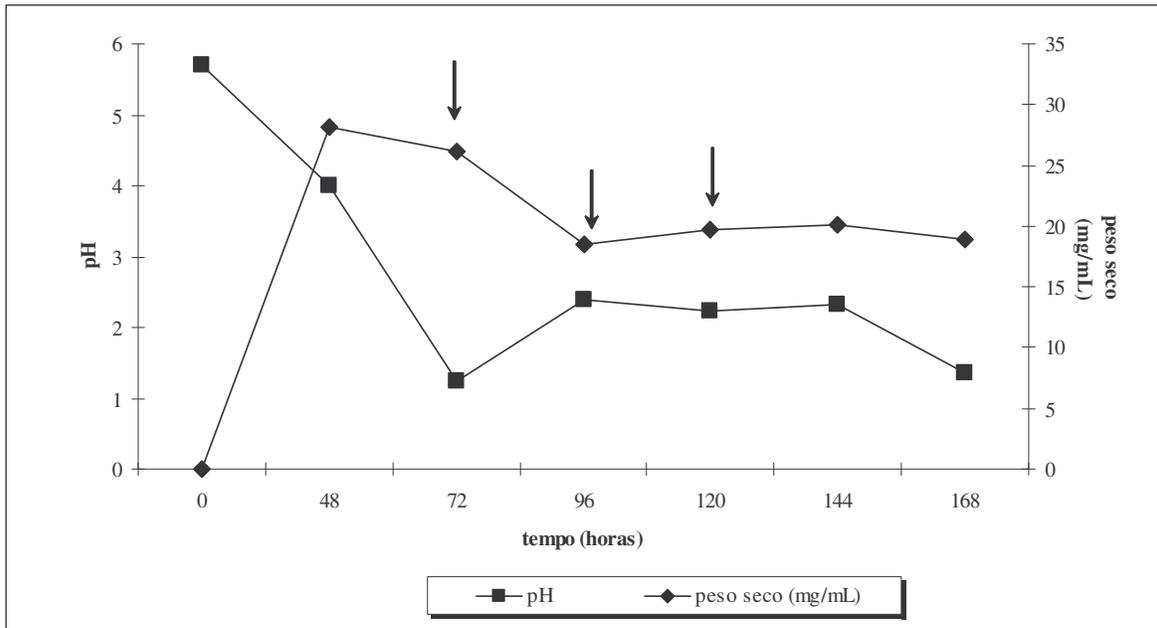
#### **5.2.1.1. Biotransformação do citrionelol de acordo com o tempo.**

Sendo as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) as que foram capazes de transformar o citrionelol em uma maior concentração de óxido de rosa a partir do citrionelol, acompanhou-se a massa celular e o pH de cada linhagem, bem como a concentração do óxido de rosa e citrionelol remanescente no meio de cultura, ao longo do tempo da biotransformação.

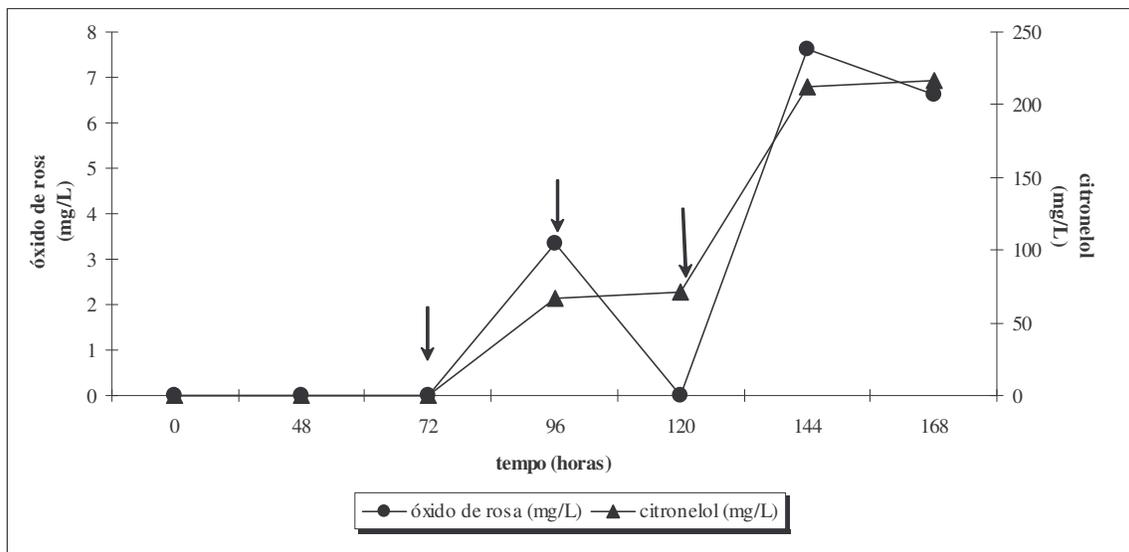
Esse comportamento para a linhagem LB-2025 (no. 8) e a linhagem LB-2036 (no. 9) são mostrados nas Figuras 45 e 46, respectivamente.

A adição de citrionelol aconteceu quando o microrganismo está no início da fase estacionária e em pH ácido (Figura 45a e Figura 46a). Dessa maneira, o microrganismo se encontra adaptado à adição de citrionelol, que é ácido.

Após a adição de citrionelol, o óxido de rosa é formado, e a seguir é metabolizado ou incorporado às células dos microrganismos (Figura 45b e Figura 46b). Somente após a terceira adição, 144 horas e 168 horas, há o acúmulo do óxido de rosa (Figura 45b e Figura 46b), com a concentração de citrionelol se mantendo constante (Figura 45b e 46b).

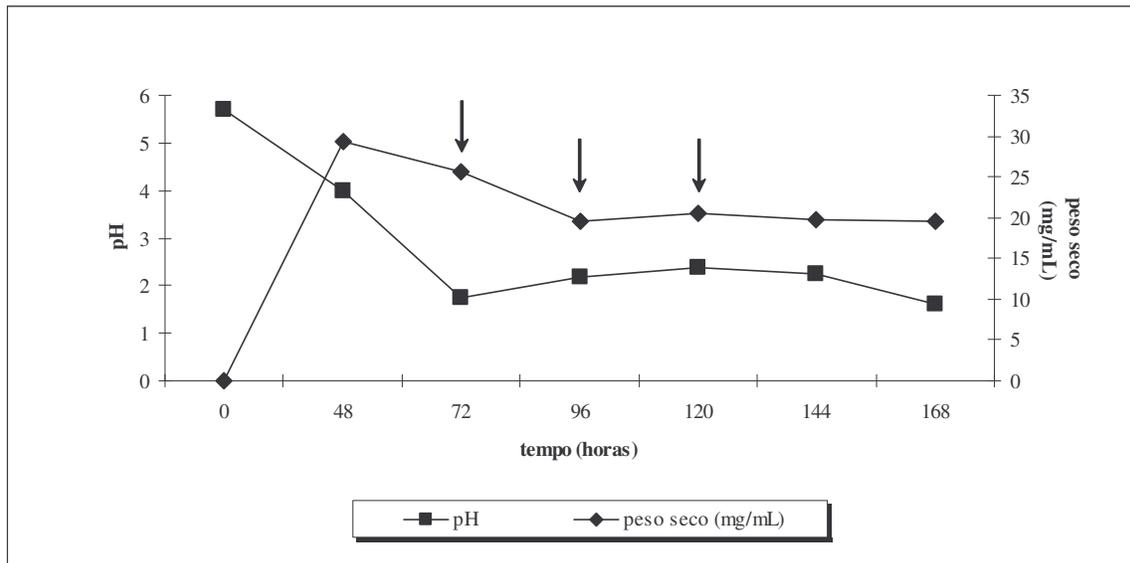


(a)

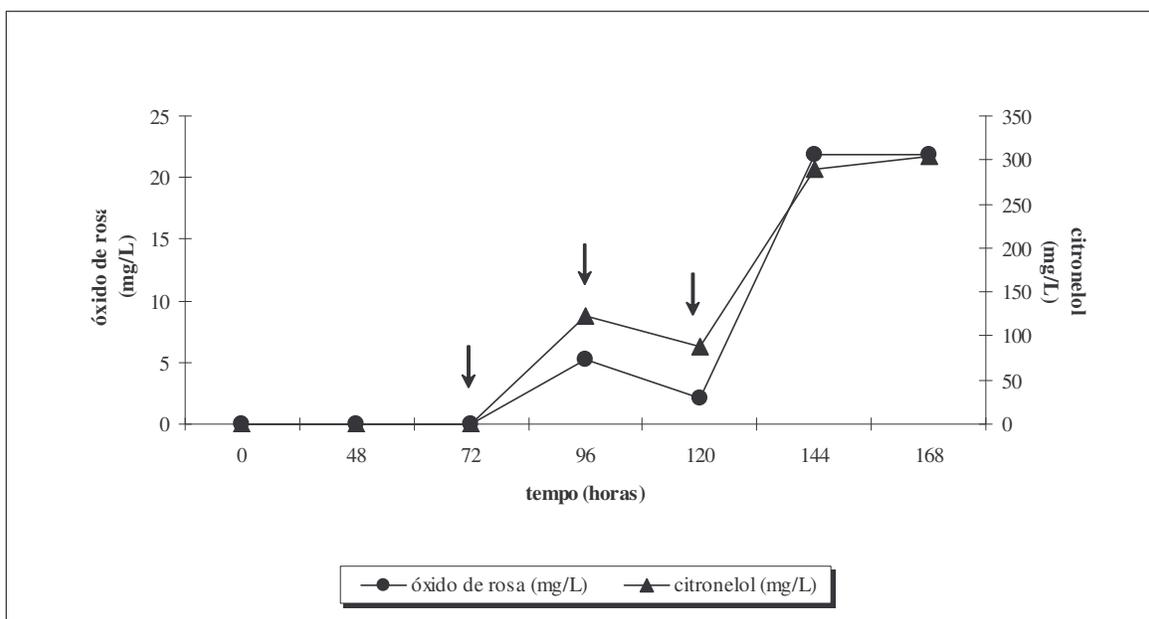


(b)

**Figura 45.** Crescimento (peso seco (mg/mL)) e o pH (a) na biotransformação do citronelol em relação a síntese de óxido de rosa, a adição de citronelol (↓) e o citronelol remanescente no meio de cultura (b), para a linhagem LB-2025 (no. 8).



(a)



(b)

**Figura 46.** Crescimento (peso seco (mg/mL)) e o pH (a) na biotransformação do citronelol em relação a síntese de óxido de rosa, a adição de citronelol (↓) e o citronelol remanescente no meio de cultura (b), para a linhagem 2036 (no. 9).

Em 168 horas de crescimento tanto o meio contendo a linhagem LB-2025 (Figura 45a) quanto o meio contendo a linhagem LB-2036 (no. 9) (Figura 46a) sofrem uma leve queda no pH, que pode estar relacionado ao acúmulo de óxido de rosa e a concentração final de citronelol (Figura 45b e 46b).

### 5.2.2. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do limoneno.

As amostras analisadas pelo CG-MS mostraram que os produtos da biotransformação do limoneno foram o carveol (p-menta-6,8-dien-2-ol), carvona (p-menta-6,8-dien-2-ona) e o alfa-terpineol ( $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-ciclo-hexeno-1-metanol). A relação m/z (%) está representada na Tabela XI e nos Anexos V e VI, dos produtos da biotransformação da linhagem 2038.

**Tabela XI.** Relação da m/z (%) de cada um dos compostos encontrados na biotransformação do limoneno (Anexo V e VI).

Composto	m/z (%)
carveol (p-menta-6,8-dien-2-ol)	A: 109 (100), 84 (92), 41 (75), 55 (54), 91 (33), 119 (17), 134 (8), 152 (8). B: 84 (100), 41 (79), 55 (63), 109 (48), 69 (42), 134 (38), 123 (25).
carvona (p-menta-6,8-dien-2-ona)	82(100), 54(58), 93 (50), 39(42), 108 (23), 67 (8)
Terpineol ( $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol)	59 (100), 43 (54), 93 (46), 81 (29), 121 (25), 136 (25), 67 (21), 107 (4).
limoneno	68 (100), 79 (50), 39 (46), 53 (25), 119 (21), 93 (17), 166 (13), 149 (8), 138 (4).

O índice de retenção foi calculado para a carvona e para o  $\alpha$ -terpineol uma vez que estes eram os padrões disponíveis no laboratório. Esse índice para a coluna cromatográfica CP SIL 5 CB (semelhante a DB-1, a HP-1 ou a OV101), apresentou para a carvona, o valor de 1169 (Anexo VI d); sendo o do padrão de carvona (Anexo VII), também de 1169. Para o alfa-terpineol, o valor foi de 1133 (Anexo VI a), e para o padrão (Anexo VIII) de 1138. Esses dados estão próximos com os dados do banco de dados que para a carvona é de 1219 e para o alfa-terpineol é de 1174. O limoneno, nas amostras, apresentou o índice de retenção igual a 1162 (Anexo VI e), enquanto que o padrão (Anexo IX) apresentou o valor de 985 enquanto que o do banco de dados foi de 1024. Já para a biotransformação do limoneno na ausência do microrganismo (controle da oxidação ou degradação química do limoneno), não se encontrou nem a carvona e nem o alfa-terpineol (Anexo X)

Conforme esse banco de dados a carvona e o alfa-terpineol podem ser encontrados em diversas plantas (Tabela XII).

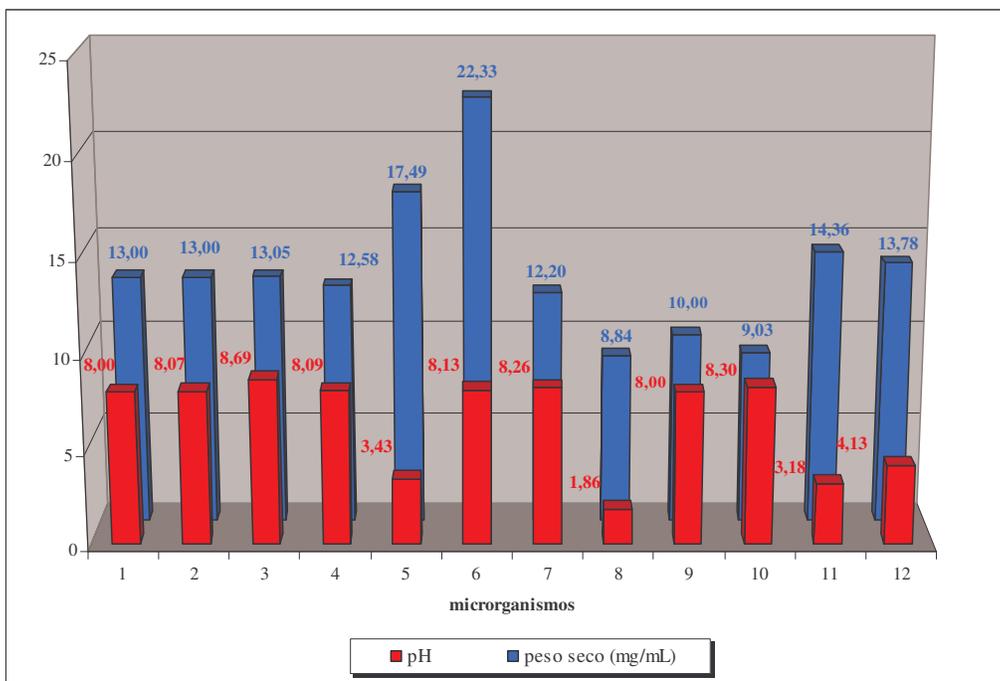
Nas Figuras 47, 48 e 49 temos o perfil de peso seco e do pH final para cada uma das linhagens aqui estudadas. Os fungos cresceram bem em pH alcalinos, (aproximadamente 8,0) na presença de limoneno, diferente do que ocorreria com a biotransformação do citrionelol (Figura 39). Isto nos leva a crer que esses microrganismos crescem tanto em pH alcalinos quanto ácidos, dependendo apenas da estrutura do terpeno, que se encontra presente.

Em relação a produção de  $\alpha$ -terpineol e carvona (Figura 47b, 48b e 49b) as linhagens que apresentaram maior concentração foram as de número LB-2025 (no. 8) e LB-2038 (no. 36), que se mostraram capazes de fazer essa biotransformação em pH bastante ácidos (linhagem LB-2025, com pH 1,86; e linhagem LB-2038, com pH 2,88). Mesmo em pH extremamente ácidos e na presença do limoneno, essas linhagens foram capazes de crescer (linhagem LB-2025, 8,8 mg/mL e linhagem LB-2038, 15,37 mg/mL) (Figura 47a e 49a).

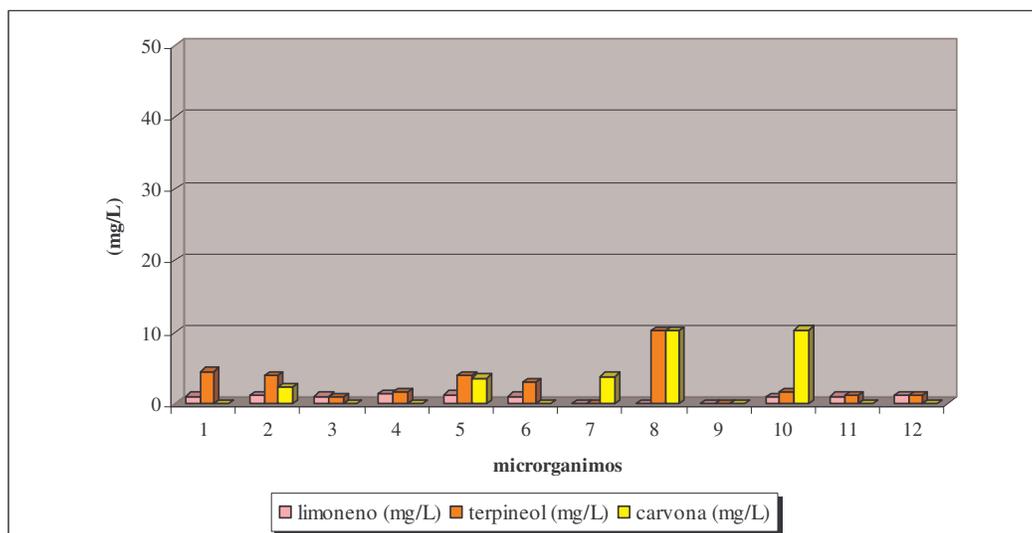
Os resultados da Figura 47, 48 e 49 não mostram uma correlação da produção de  $\alpha$ -terpineol e carvona, com o pH e a massa seca para as 36 linhagens utilizadas.

**Tabela XII.** Plantas com as concentrações de carvona e alfa-terpineol.

composto	Concen- tração (%)	Nome	Espécie botânica	Referência
Carvona	68	Dill seed 3	<i>Anethum graveolens</i> L., fam. Apiaceae (Umbelliferae)	CHARLES <i>et al.</i> , 1995.
	0,37	Lavender angustifolia (Lithuania)	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill., fam. Lamiaceae (Labiatae)	VENSKUTONIS <i>et al.</i> , 1997.
	0,01	Wormwood (Mugwort) (Italy) 2	<i>Artemisia absinthium</i> L., fam. Asteraceae (Compositae)	MUCCIARELLI <i>et al.</i> , 1995
Terpineol	4,37	<i>Lavender angustifolia</i> (Lithuania)	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill., fam. Lamiaceae (Labiatae)	VENSKUTONIS <i>et al.</i> , 1997
	2,20	Juniper berry 8	<i>Juniperus communis</i> L., fam. Cupressaceae	SCHILCHER <i>et al.</i> , 1993
	1,70	Laurel leaf (Italy) 2	<i>Laurus nobilis</i> L., fam. Lauraceae	PINO <i>et al.</i> , 1993
	0,80	Geranium, Bourbon 11	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Herit. ex Aiton ( <i>P. roseum</i> ), fam. Geraniaceae	SOUTHWELL <i>et al.</i> , 1995
	0,70	Rose (Bulgaria) 3 <sup>a</sup>	<i>Rosa damascena</i> Mill., fam. Rosaceae	BOELEN and BOELEN, 1997
	0,17	Lemon (Italy- Sicily) 10	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm., fam. Rutaceae	DELLACASSA, <i>et al.</i> , 1995
	0,05	Basil (France) 2	<i>Ocimum basilicum</i> L., fam. Lamiaceae (Labiatae)	BARITAUX <i>et al.</i> , 1992
	0,04	Laranja, doce (Italy) 5	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck, fam. Rutaceae	DUGO <i>et al.</i> , 1994
	0,01	Wormwood (Mugwort) (Italy) 2	<i>Artemisia absinthium</i> L., fam. Asteraceae (Compositae)	MUCCIARELLI <i>et al.</i> , 1995

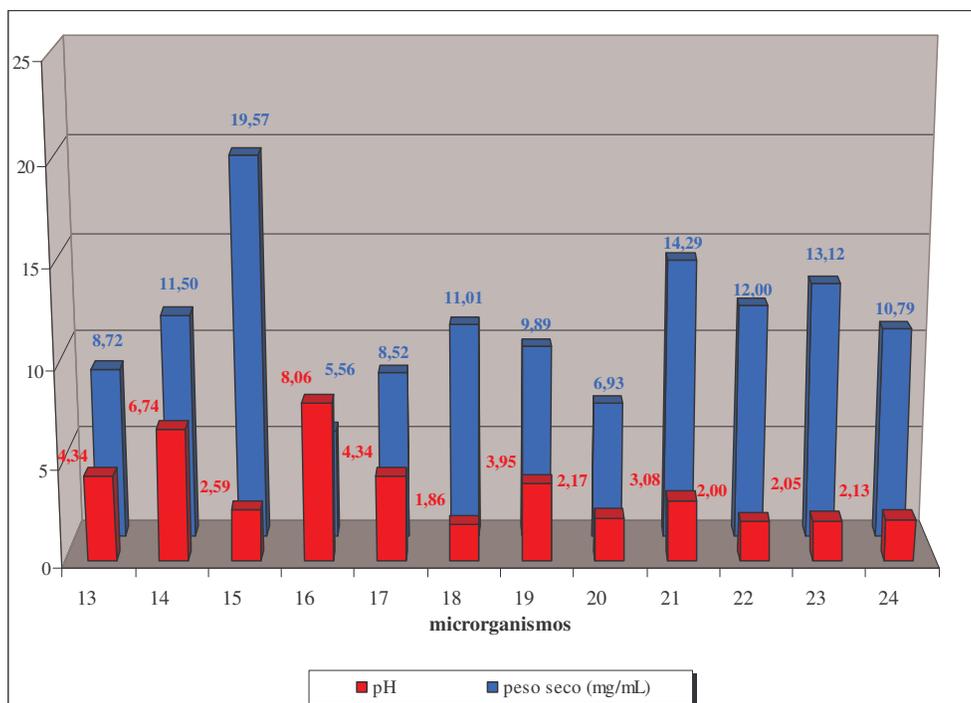


(a)

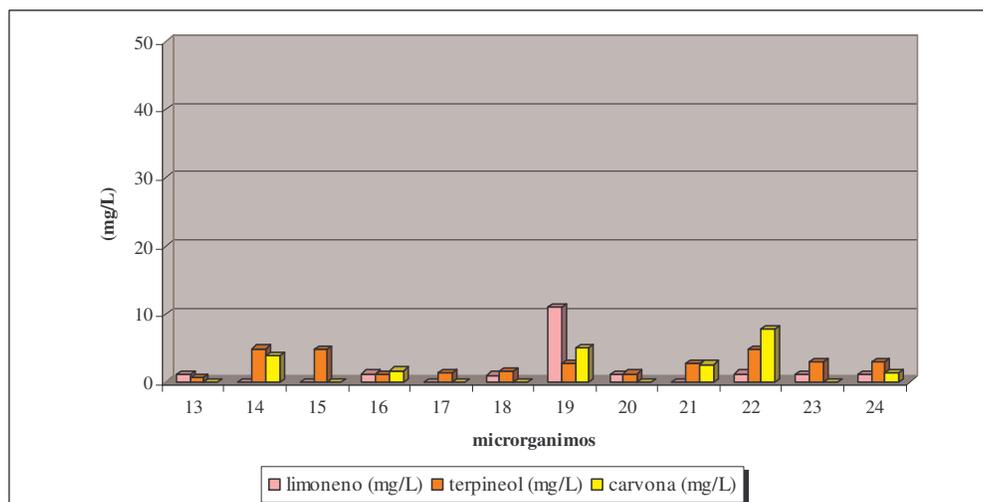


(b)

**Figura 47.** Seleção dos microrganismos (1 a 12) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 1: LB-2002, linhagem no. 2: LB-2007; linhagem no. 3: LB-2041; linhagem no. 4: LB-2060; linhagem no. 5: LB-2001; linhagem no. 6: LB-2001; linhagem no. 7: LB-2008; linhagem no. 8: LB-2025; linhagem no. 9: LB-2036; linhagem no. 10: LB-2080; linhagem no. 11: LB-2054; linhagem no. 12: LB-2044).

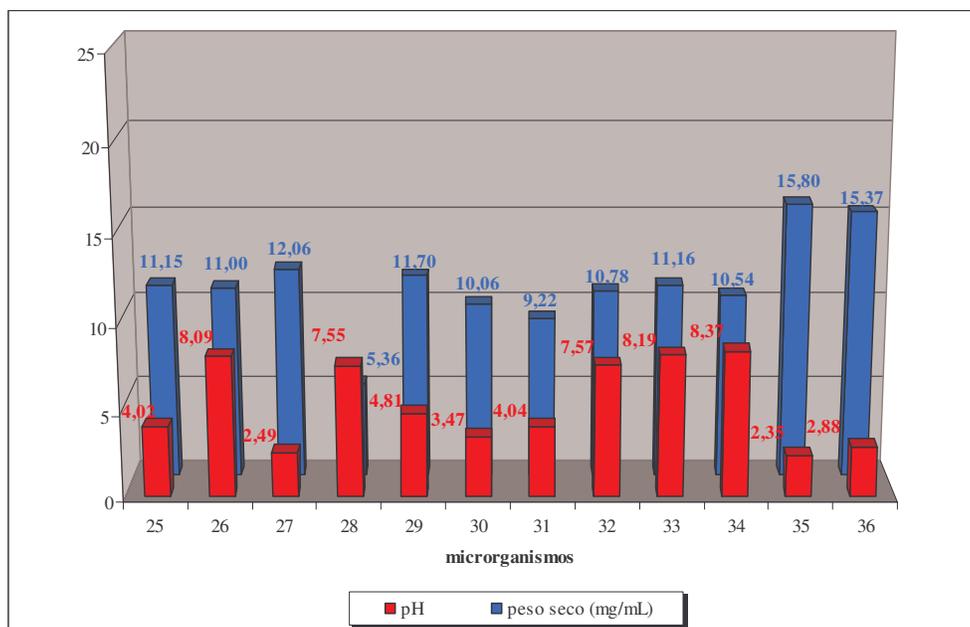


(a)

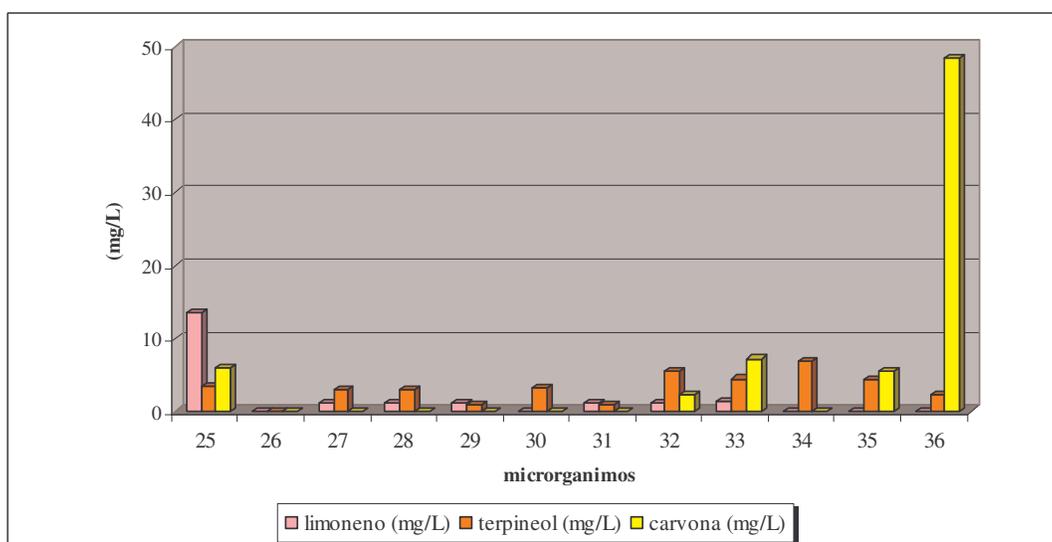


(b)

**Figura 48.** Seleção dos microrganismos (13 a 24) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).



(a)



(b)

**Figura 49.** Seleção dos microrganismos (25 a 36) para a biotransformação do limoneno: (a) curva de crescimento (peso seco (mg/mL)) e pH; (b) concentração de limoneno remanescente no meio de cultura, alfa-terpineol e carvona (mg/L) (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038).

O limoneno dificilmente aparece presente, nas diferentes amostras dos microrganismos, devido a sua alta volatilidade (Figura 47b, 48b, 49b), mas nas linhagens LB-2045 (no. 19) (11 mg/L) e LB-2013 (no. 25) (13 mg/L) observamos concentrações mais altas do que as outras amostras. Ambas as linhagens LB-2045 e LB- 2013 (no. 19 e 25), cresceram em pH ácidos próximos de 4,0 (linhagem LB-2045 (no. 19): pH 3,95 e linhagem LB-2013 (no. 25), pH 4,07) (Figura 48a e 49a).

Mas essa relação entre o limoneno remanescente no meio de cultura e o pH não pode ser observado para outras linhagens como para a linhagem LB-2044 (no. 12) (pH 4,13); LB-2037 (no. 13) (pH 4,34); LB-2019 (no. 17) (pH 4,34) e LB-2000 (no. 31) (pH 4,04) (Figura 47a, 48a e 49a). Nessas linhagens a concentração de limoneno remanescente ficou menor ou bem próximo a 1 mg/L (linhagem LB-2044 (no. 12) igual a 1,15 mg/mL; LB-2037 (no. 13) igual a 1,20 mg/mL; LB-2019 (no. 17) sem limoneno e LB-2000 (no. 31) igual a 1,1 mg/mL) (Figura 47b, 48b e 49b).

Para essas linhagens verificamos que o seu crescimento, dado pelo peso seco final, ficou praticamente na mesma faixa (Figura 47a, 48a e 49a).

A carvona pode ser obtida da planta *Anethum graveolens L.*, fam. Apiaceae (Umbelliferae), em alta concentração, o que dificilmente seria gerado numa escala biotecnológica (Tabela XII).

Mas vale a pena lembrar que o limoneno é um resíduo da indústria de cítricos e de baixo valor agregado. Dessa maneira, a carvona obtida a partir da biotransformação do limoneno, seria um produto de alto valor agregado obtido a partir de um resíduo da indústria de cítricos, de baixo valor. Isso pode ser constatado na Tabela XIII, onde verificamos que a carvona apresenta um valor de 168 vezes maior do que o do limoneno.

O preço do  $\alpha$ -terpineol também pode ser obtido a partir desse sub-produto da industria de citrus, aumentando o seu valor agregado. A sua concentração em plantas é pequena e bastante inferior a da carvona obtida por plantas (Tabela XII).

Na Tabela XIII vemos que o preço/quantidade do  $\alpha$ -terpineol é 33 vezes maior do que o do limoneno. Demonstrando que a produção por via biotecnológica, a biotransformação do limoneno, é de grande interesse.

**Tabela XIII.** Comparação do valor do alfa-terpineol e da carvona, produtos da biotransformação em relação ao seu substrato, o limoneno.

COMPOSTO	FABRICANTE	PUREZA	QUANTIDADE	PREÇO (U\$/mL)	PREÇO/QUANTIDADE (U\$/mL) <sup>(a)</sup>
<b>Limoneno*</b>	Fluka	<b>99%</b>	<b>1L</b>	<b>18.80</b>	<b>0.018</b>
$\alpha$ -terpineol	Aldrich	98,5%	50mL	29.70	0,594 (33)
Carvona*	Fluka	99%	10mL	30.20	3.02 (168)

\*www.sigma-aldrich.com em 08/06/LB-2001

(<sup>a</sup>) relação de preço/quantidade do composto biotransformado em relação ao limoneno.

### 5.2.3. Seleção dos microrganismos para a biotransformação do geraniol.

As 36 linhagens de fungos citadas anteriormente também foram cultivadas em meio líquido para a biotransformação do geraniol.

Pelos Anexos XI e XII podemos verificar a análise do CG-MS para a linhagem LB-2041 (no. 3), dentre as cinco analisadas, da biotransformação do geraniol.

Os produtos obtidos foram o 4-metil-3-penten-1-ol (97% de similaridade), 6-metil-5-hepten-2-ona (93% de similaridade), e o geraniol remanescente no meio (93% de similaridade) (Anexo XII).

Na biotransformação do geraniol, na ausência do microrganismo (Anexo XIII) não se encontrou nenhum dos compostos encontrados na biotransformação do geraniol com os respectivos microrganismos.

Os dados de m/z (%) encontram-se a seguir para cada um dos compostos. O 4-metil-3-penten-1-ol: 41 (100), 69 (46), 67 (17), 39 (17), 100 (9); 6-metil-5-hepten-2-ona: 43 (100), 41 (46), 55 (26), 39 (17), 69 (17), 108 (17), 93 (9), 83 (5), 112 (5); e o geraniol: 41 (100), 69 (77), 39 (17), 67 (17), 93 (13), 53 (9), 84 (9), 123 (6) e 111 (5).

#### 5.2.4. Seleção de microrganismos para a biotransformação do linalol.

Os produtos da biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 foram o óxido de linalol, ocimenol,  $\alpha$ -terpineol e o geraniol, conforme a identificação por CG-MS (Anexo XIV e XV).

Os fragmentos dos íons e sua abundância estão apresentados na Tabela XIV. Essa relação m/z (%) está de acordo com os resultados encontrados para SHIMIZU *et al.* (1982), BOCK *et al.* (1986) e DEMYTTENAERE e WILLEMEN (1998).

**Tabela XIV.** Relação m/z (%) para o linalol e seus produtos de biotransformação obtidos pelo CG-MS (Anexo XV).

Composto	m/z(%)
Óxido de linalol (furanoide) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-eteniltetrahidro- 2-furanometanol)	<b>A:</b> 59 (100), 43 (71), 94 (35), 68 (25), 111 (17), 81 (13), 137 (2), 155 (2). <b>B:</b> 59 (100), 43 (63), 94 (38), 68 (25) 41 (17), 81 (13), 137 (2), 155 (2).
Linalol (3,7-dimetil-1,6- octadien-3-ol)	71 (100), 41 (92), 55(79), 93 (63), 80 (29), 121 (13), 107 (4), 136 (4).
Ocimenol	<b>A:</b> 93 (100), 59 (85), 43 (67), 81 (58), 121 (25), 212 (25), 77 (13), 107 (8) <b>B:</b> 93 (100), 59 (75), 43 (65), 59 (75), 136 (25), 121 (21), 67 (13), 107 (8)
alfa-terpineol (p-1-menten-8- ol)	59 (100), 43 (54), 93 (46), 81 (29), 121 (25), 136 (25), 67 (21), 104 (4).
Geraniol (3,7-dimetil-2,6- octadien-1-ol)	41 (100), 69 (67), 53 (8), 84 (8), 93 (8), 123 (4), 111 (2), 136 (2).

Os dados apresentam similaridade com o banco de dados do CG-MS em 94% para os óxidos do linalol; 93% para o linalol; 93% para o geraniol e 95% para o  $\alpha$ -terpineol (Anexo XV).

O índice de retenção obtido para o padrão de isômeros do óxido de linalol (furano) (Anexo XVI) foi de 1041 e 1053; para o linalol (Anexo XVI) de 1056, para o geraniol de 1176 (Anexo XVII) e para o  $\alpha$ -terpineol (Anexo VIII) de 1138. Enquanto que nas amostras os índices de retenção foram 1045 e 1051, para os isômeros do óxido do linalol (furano); 1057 para o linalol; 1183 para o geraniol e 1134 para o  $\alpha$ -terpineol.

O Anexo XVIII mostra que na ausência do microrganismo o óxido do linalol (furano) foram formados em baixas concentrações.

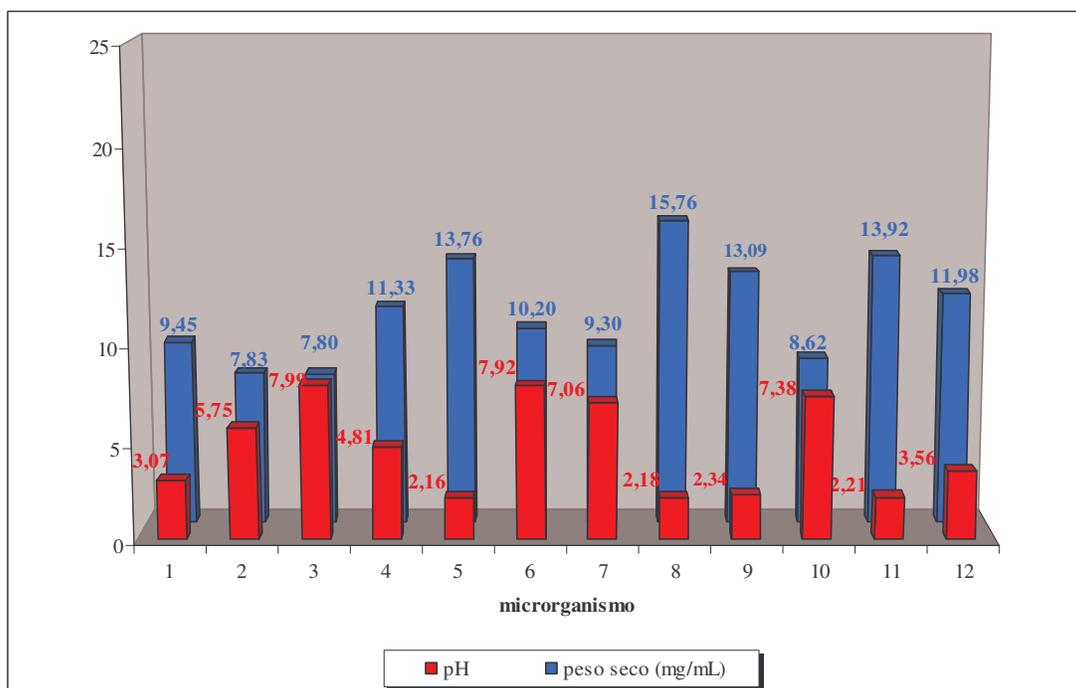
O índice de retenção foi calculado apenas para o óxido de linalol, geraniol e  $\alpha$ -terpineol, de acordo com os padrões disponíveis no laboratório.

A Tabela XV apresenta a concentração de cada um dos isômeros do óxido de linalol em plantas.

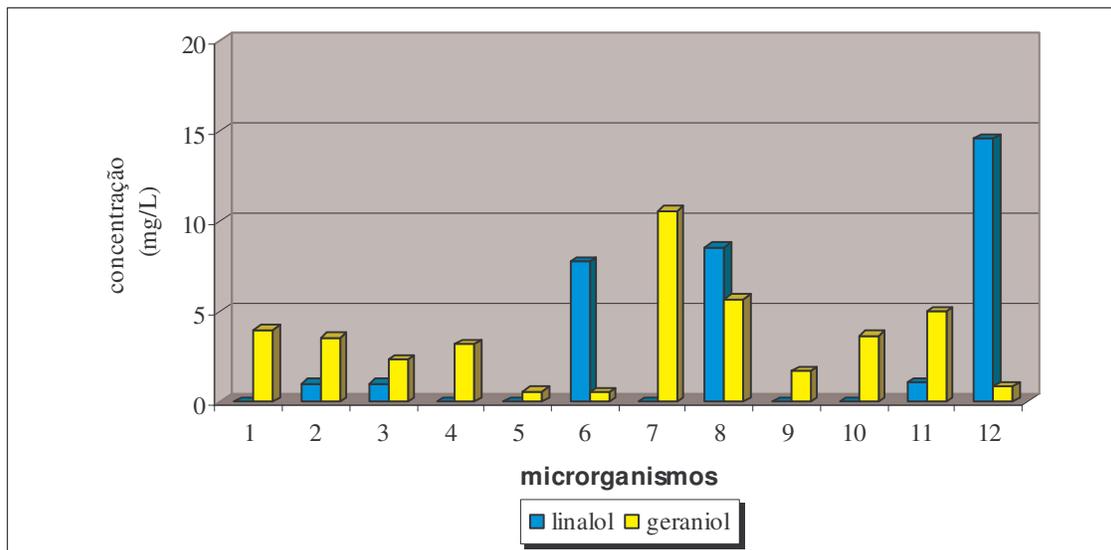
**Tabela XV.** Concentração dos óxidos de linalol (furano).

composto	Concentração (%)	Nome	Espécie botânica	Referência
Trans-óxido de linalol (furanoide)	1,98	Lavender angustifolia (Lithuania)	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill., fam. Lamiaceae (Labiatae)	VENSKUTONIS <i>et al.</i> , 1997
	0,01	Zizyphus jujuba fruit (Malaysia)	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>inermis</i> , fam. Rhamnaceae	WONG <i>et al.</i> , 1996
Cis-óxido de linalol (furanoide)	2,44	<i>Lavender angustifolia</i> (Lithuania)	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill., fam. Lamiaceae (Labiatae)	VENSKUTONIS <i>et al.</i> , 1997

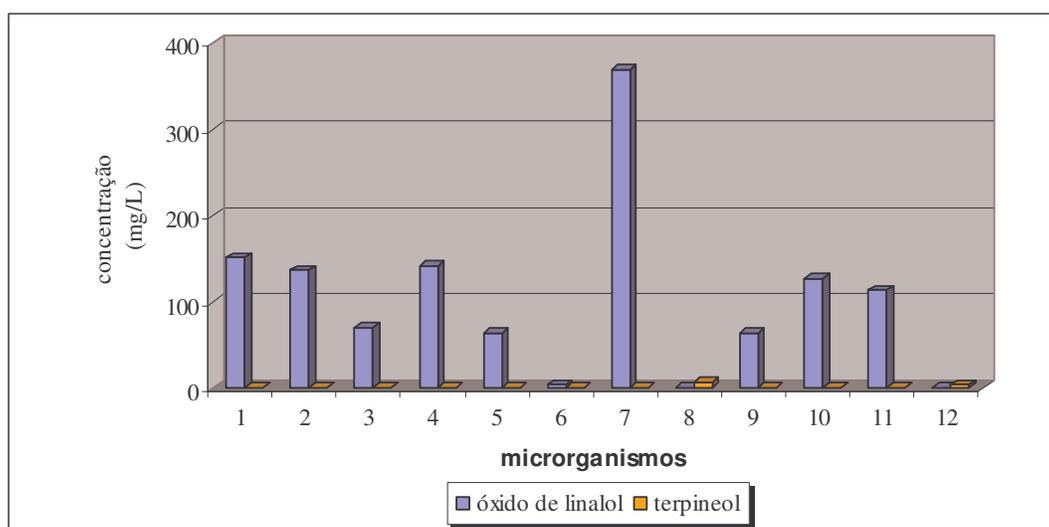
Nas Figuras de 50 a 55 encontramos os resultados para a biotransformação do linalol em relação ao pH final, peso seco final e as concentrações de linalol remanescente no meio de cultura, geraniol, óxido de linalol e  $\alpha$ -terpineol, para cada uma das 36 linhagens estudadas.



**Figura 50.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do linalol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044).

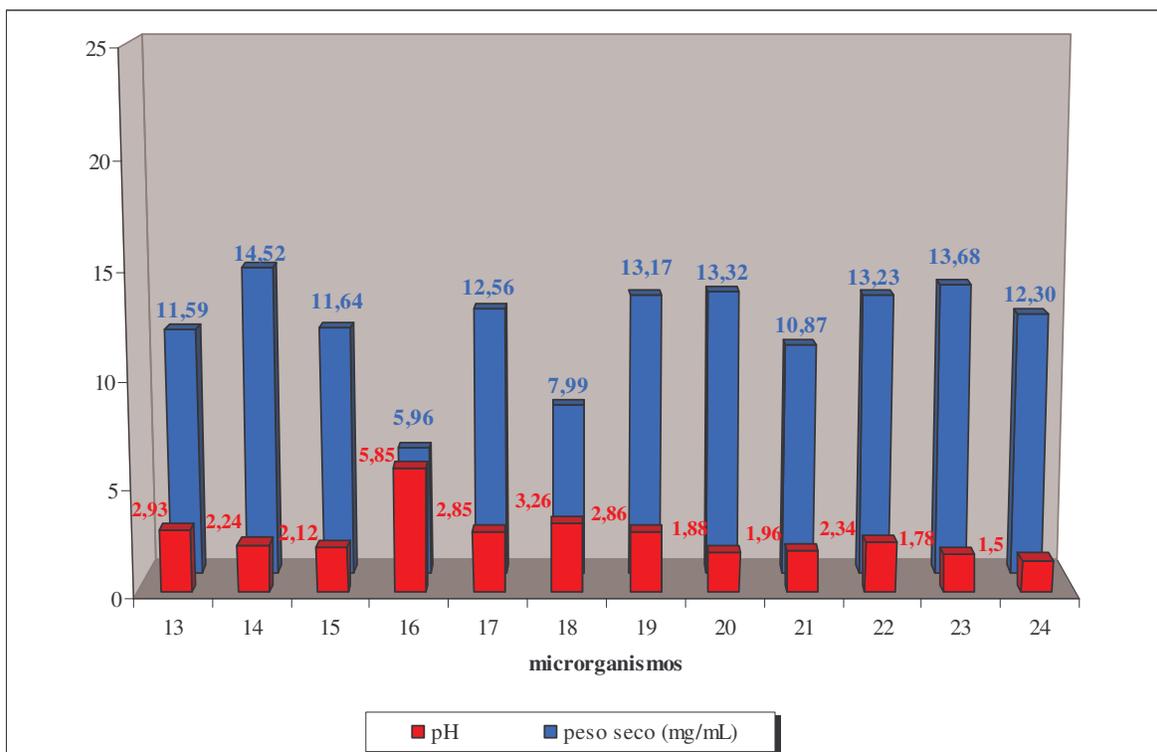


(a)

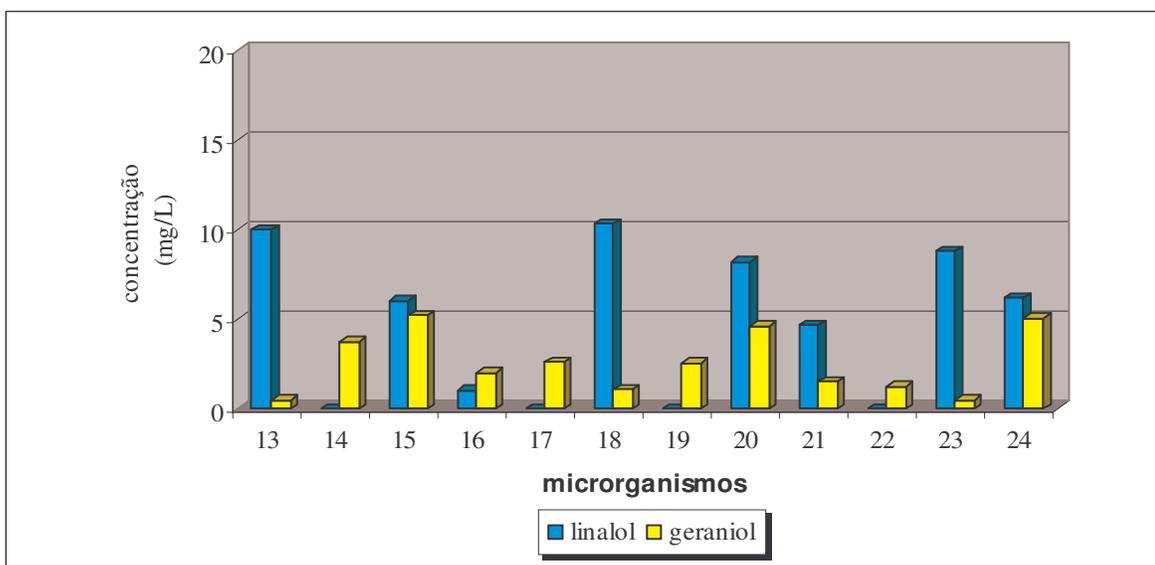


(b)

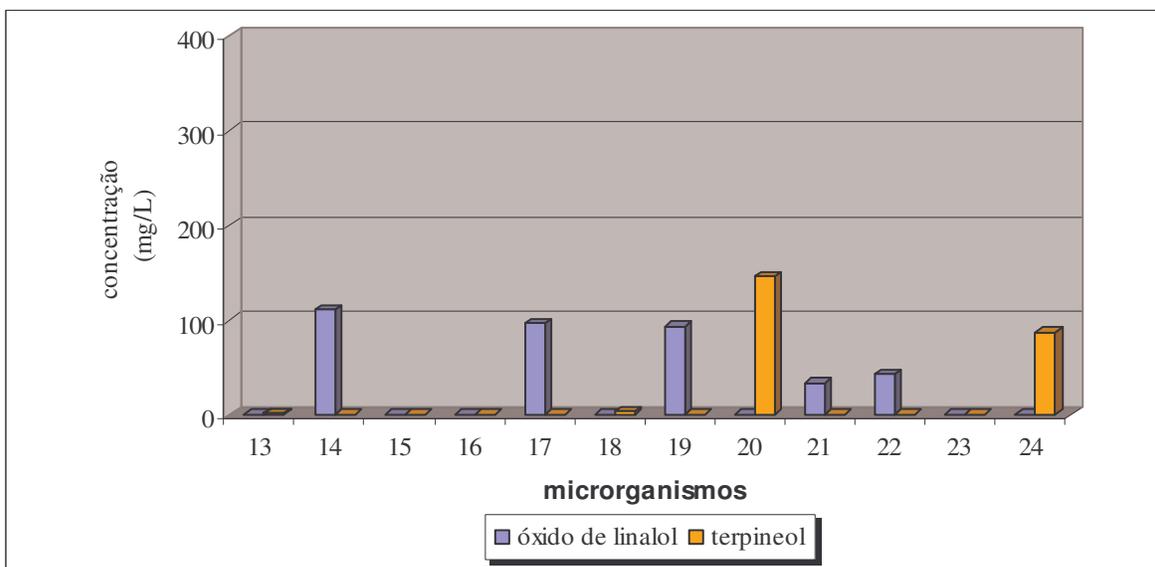
**Figura 51.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 1 a 12 na biotransformação do linalol (linhagem no 1: LB-2002, linhagem no.2: LB-2007; linhagem no 3: LB-2041; linhagem no.4: LB-2060; linhagem no 5: LB-2001; linhagem no.6: LB-2057; linhagem no 7: LB-2008; linhagem no.8: LB-2025; linhagem no 9: LB-2036; linhagem no.10: LB-2080; linhagem no 11: LB-2054; linhagem no.12: LB-2044).



**Figura 52.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do linalol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).

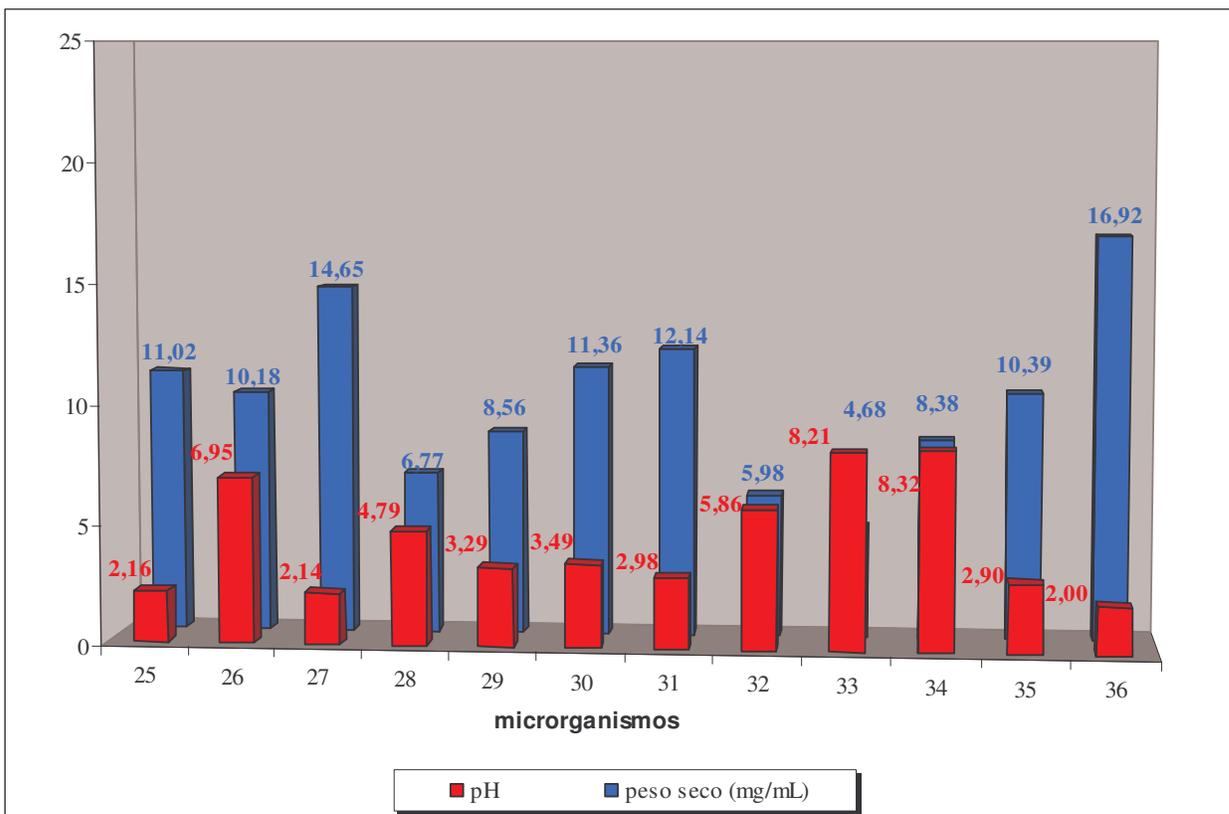


(a)

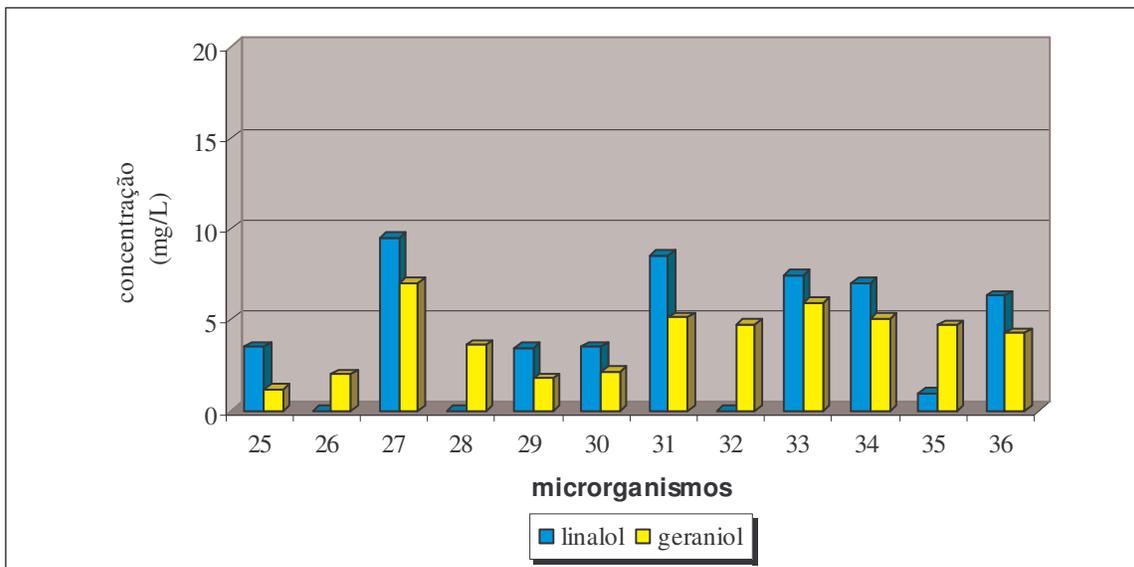


(b)

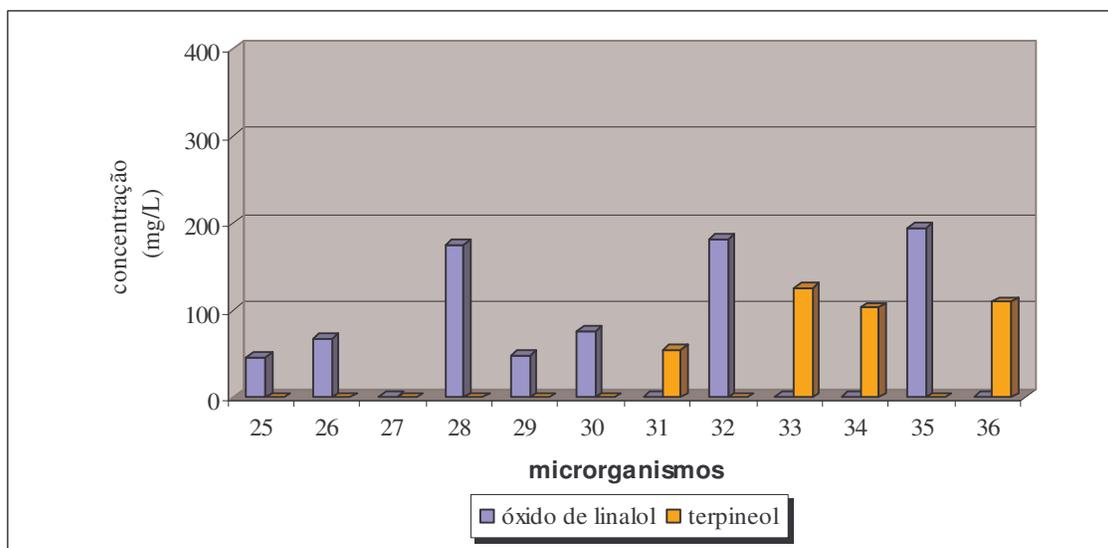
**Figura 53.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 13 a 24 na biotransformação do linalol (linhagem no. 13: LB-2037; linhagem no. 14: LB-2029; linhagem no. 15: LB-2074; linhagem no. 16: LB-2084; linhagem no. 17: LB-2019; linhagem no. 18: LB-2085; linhagem no. 19: LB-2045; linhagem no. 20: LB-2010; linhagem no. 21: LB-2034; linhagem no. 22: LB-2042; linhagem no. 23: LB-2015; linhagem no. 24: LB-2086).



**Figura 54.** Massa final (peso seco (mg/mL)) e pH, para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do linalol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000, linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038).



(a)



(b)

**Figura 55.** Concentração de linalol remanescente no meio de cultura e geraniol (a); e a concentração do óxido de linalol e alfa-terpineol (mg/L) (b) para as linhagens de 25 a 36 na biotransformação do linalol (linhagem no. 25: LB-2013; linhagem no. 26: LB-2040; linhagem no. 27: LB-2077; linhagem no. 28: LB-2082; linhagem no. 29: LB-2033; linhagem no. 30: LB-2026; linhagem no. 31: LB-2000; linhagem no. 32: LB-2004; linhagem no. 33: LB-2050; linhagem no. 34: LB-2075; linhagem no. 35: LB-2068; linhagem no. 36: LB-2038).

As 36 linhagens testadas foram capazes de crescer em pH ácido, mas em pH básico, a linhagem LB-2050 (no. 33) (pH 8,21) e LB-2075 (no. 34) (pH 8,32) (Figuras 54) apresentaram menor massa (linhagem LB-2050 (no. 33) igual a 4,68; e a linhagem LB-2075 (no. 34) igual a 8,38). Este fato também ocorreu para a linhagem 1 quando da biotransformação do citrionelol (Figura 39).

O óxido de linalol e o  $\alpha$ -terpineol não foram produzidos por todos os microrganismos (Figura 51b, Figura 53b, Figura 55b).

Para o  $\alpha$ -terpineol apenas 6 linhagens foram capazes de produzi-lo (Figura 51b, 53b, 55b).

A biotransformação do linalol em seus óxidos (furano) foi realizada por 21 linhagens das 36 testadas. É interessante observar ainda que as linhagens que produziram o  $\alpha$ -terpineol não foram capazes de produzir o óxido de linalol (furano) em quantidades significativas.

A linhagem LB-2008 (no. 7) foi capaz de produzir mais óxido de linalol (furano) assim como o geraniol a partir da biotransformação com linalol (Figura 51).

A obtenção do geraniol e do óxido de linalol (furano) a partir do linalol pela linhagem LB-2008 (no. 7) ocorreu em pH neutro (7,06) (Figura 51).

No caso da biotransformação do linalol não foi observado uma correlação entre a produção do óxido (furano), geraniol,  $\alpha$ -terpineol, o linalol remanescente no meio (Figura 51, 53, 55), o pH final e a massa seca final (Figura 50, 52, 54).

As concentrações aqui obtidas tanto para o óxido de linalol (furano) quanto para o  $\alpha$ -terpineol são inferiores às encontradas em plantas (Tabela XV e XII). Mas devemos ressaltar que os compostos aqui obtidos são considerados naturais devido à metodologia empregada.

### **5.3. Microrganismos selecionados: LB-2025, LB-2036 e LB-2038.**

Os microrganismos selecionados na biotransformação do citrionelol foram as linhagens LB-2025 (no. 8) e a LB-2036 (no. 9), para a produção do óxido de rosa a partir do citrionelol; e as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2038 (no.36) para a produção de carvona e  $\alpha$ -terpineol a partir da biotransformação do limoneno.

Os estudos de taxonomia de FISCHER e COOK (2001) levam a indicação que os microrganismos selecionados pertençam ao seguinte Gênero: a linhagem LB-2038 (Figura 56a) trata-se do *Aspergillus* sp., a linhagem LB-2025 (no. 8) de *Penicillium* sp. (Figura 56b) e a linhagem LB-2036 (no. 9) de *Penicillium* sp. (Figura 56c).

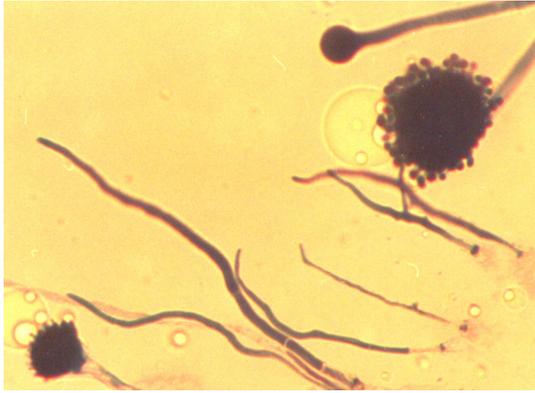
### **5.4. Composição dos diferentes meios de cultura líquidos para a biotransformação do citrionelol e do limoneno.**

Nos experimentos de seleção dos microrganismos para a biotransformação com citrionelol, limoneno, geraniol e linalol utilizaram-se o meio classificado nesse item como meio de número 1.

Nessa etapa as linhagens estudadas foram as que apresentaram maior taxa de biotransformação do citrionelol (LB-2025 (no. 8), LB-2036 (no. 9) e LB-2038 (no. 36)) e do limoneno (LB-2025 (no. 8) e LB-2038 (no. 36)).

Essas linhagens foram induzidas pelos substratos específicos (citrionelol ou limoneno) e pelos respectivos produtos (óxido de rosa, ou carvona ou alfa-terpineol), conforme o item 4.2.4, de maneira que essas linhagens se adaptassem tanto aos substratos quanto aos produtos obtidos.

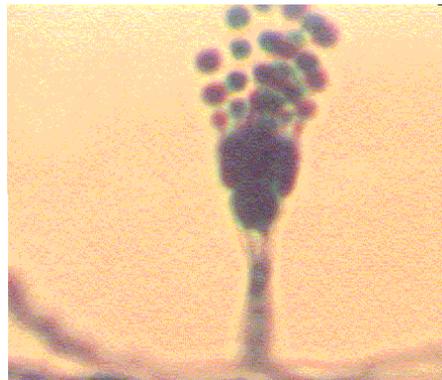
Aqui também foram realizados os experimentos controle conforme citado em 4.2. Nos experimentos controle para a biotransformação do citrionelol não se encontrou concentrações de óxido de rosa. Nos experimentos da biotransformação do limoneno os resultados do controle encontram-se mostrados nas respectivas Figuras.



(a)



(b)



(c)

**Figura 56.** Foto em microscópio ótico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem LB-2038: *Aspergillus* sp., (b) linhagem LB-2025: *Penicillium* sp., e (c) LB-2036: *Penicillium* sp..

#### **5.4.1. Estudo da biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de citrônolol, após indução.**

Conforme citadas anteriormente as linhagens aqui estudadas foram induzidas e o meio de referência utilizado nos experimentos foi o meio de número 1.

Dessa maneira podemos observar que para a linhagem LB-2025 (no. 8) houve uma diminuição do pH, do experimento da etapa da seleção da biotransformação do citrônolol (Figura 39) para o experimento em diferentes meios (Figura 57a), no meio 11, antes da indução o pH era de 3,00 e após a indução o pH foi de 2,2.

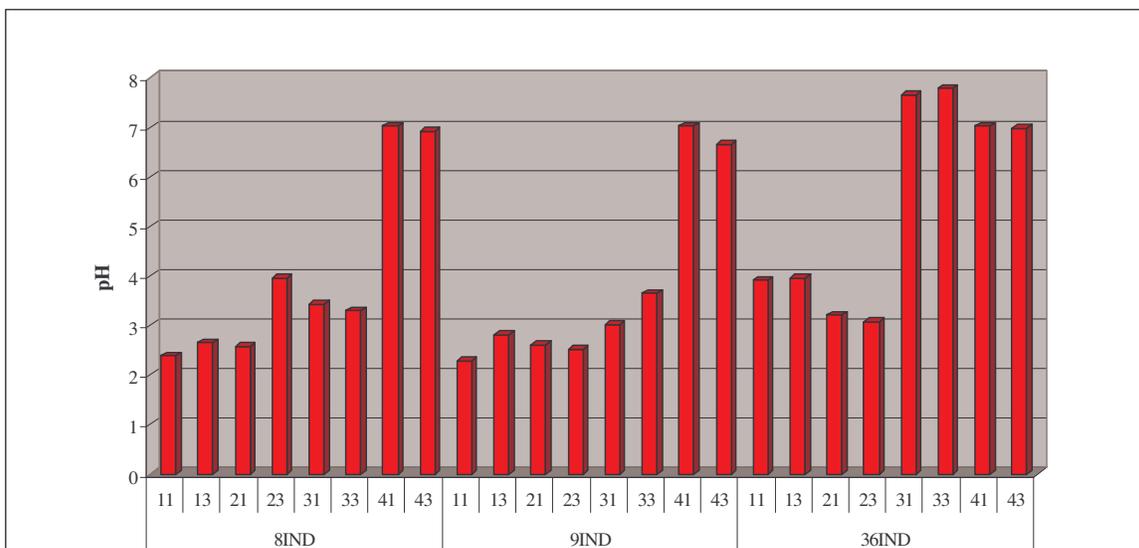
Além disso, a massa celular obtida foi de 20 mg/mL (Figura 39) sendo agora de 14 mg/mL (Figura 57b).

A linhagem LB-2036 (no. 9) antes da indução foi capaz de crescer em pH final de 3,0 com massa celular final de 20,3 mg/mL (Figura 39) e após a indução houve uma ligeira queda tanto no pH final, pH 2,2, e massa celular final de 16 mg/mL (Figura 57).

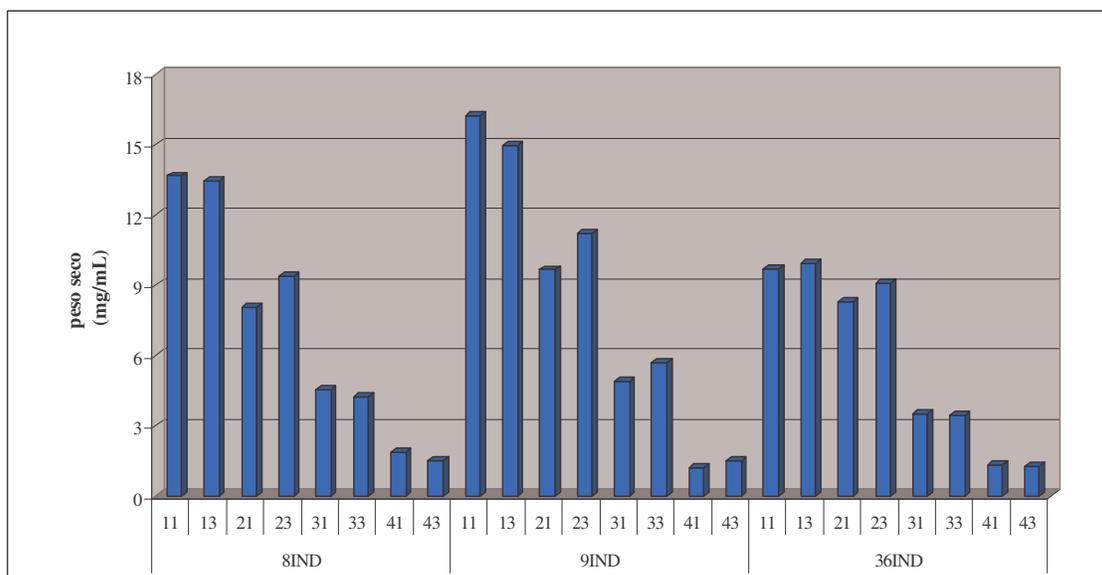
A linhagem LB-2038 (no. 36) antes da indução apresentou um pH final não tão ácido quanto as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) que foi de pH 5,05, e uma massa celular final relativamente pequena de 7,41 mg/mL (Figura 43), também em relação as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9). Após a indução a linhagem LB-2038 (no. 36) teve o seu pH final mais ácido, pH 3,9, mas uma massa celular final ligeiramente maior de 9,5 mg/mL (Figura 57).

No caso das linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) observamos uma diminuição do pH e também da massa celular (Figura 39 e Figura 57). Na linhagem LB-2038 (no. 36) há também uma queda no valor de pH após a indução, mas há um aumento na massa celular final (Figura 43 e Figura 57).

Em relação ao óxido de rosa produzido por biotransformação pela linhagem LB-2025 (no. 8) antes da indução foi de 6,5 mg/L (Figura 40a) e após a indução esse valor passou para 30 mg/L (Figura 58a), o que representa um aumento de aproximadamente 5 vezes.

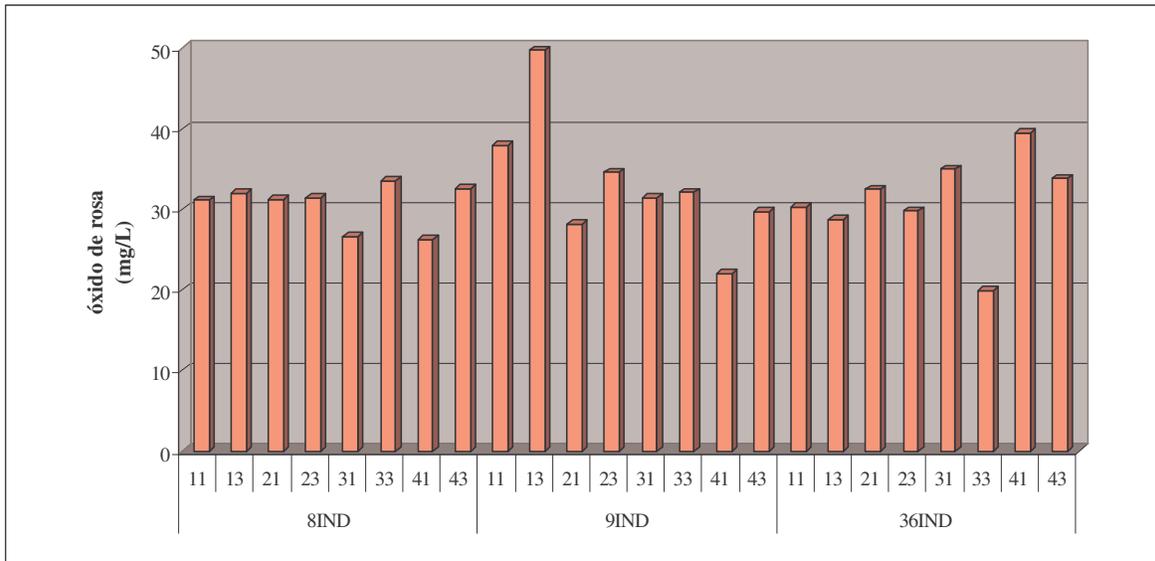


(a)

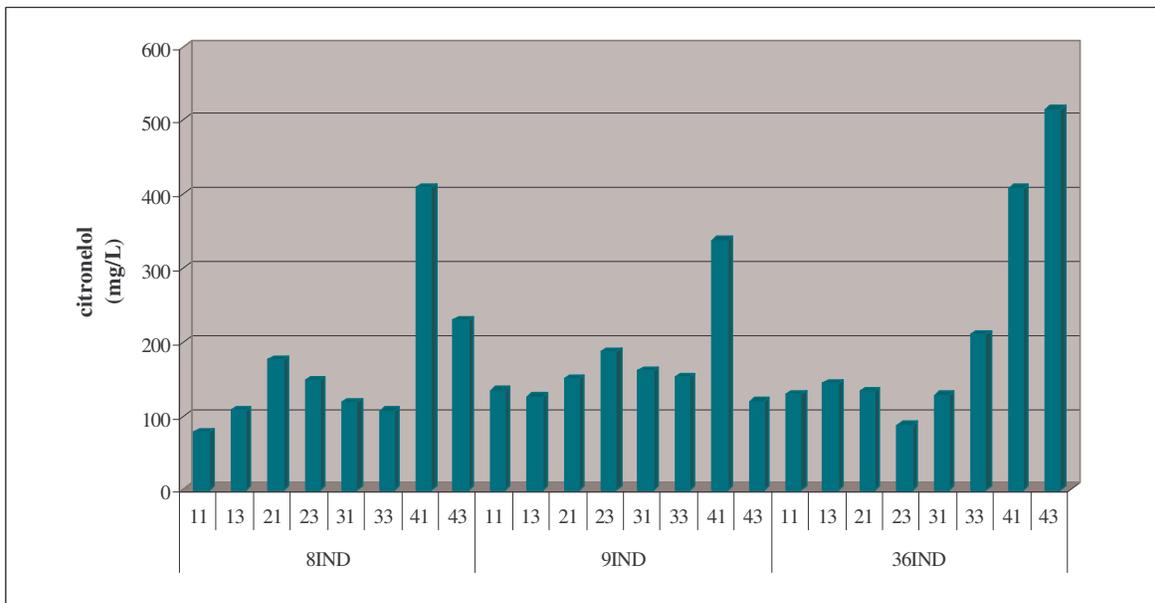


(b)

**Figura 57.** Comportamento do pH (a) e do peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para 3 linhagens após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



(a)



(b)

**Figura 58.** Concentração do óxido de rosa (a) e do citronelol (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

As linhagens LB-2036 (no. 9) e LB-2038 (no. 36) também apresentaram aumentos nas concentrações de óxido de rosa obtidas. No caso da linhagem LB-2036 (no. 9), a produção de óxido de rosa antes da indução que foi de 4,5 mg/L (Figura 40a) passou para 38 mg/L (Figura 57a) que representa um aumento de 8 vezes.

A linhagem LB-2038 (no. 36) também foi capaz de produzir mais óxido de rosa, de 3 mg/L (Figura 44a), antes da indução, para 29 mg/L (Figura 58a), após a indução, sendo um aumento de quase 10 vezes.

As concentrações de citrônolol remanescente no meio de cultura para a linhagem LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) também foram menores, o que representa um maior consumo com maior produção de óxido de rosa (Figura 40b e Figura 58b).

Antes da indução a linhagem LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) tinham como citrônolol remanescente no meio de cultura 220 mg/L e 300mg/L (Figura 40b), respectivamente. Enquanto que após a indução o citrônolol remanescente no meio de cultura passou para 80 mg/L para a linhagem LB-2025 (no. 8) e 120 mg/L para a linhagem LB-2036 (no. 9) (Figura 58b).

Para a linhagem LB-2038 (no. 8) a quantidade de citrônolol não mostrou nenhuma alteração (Figura 40b e Figura 58b).

As Figuras 57 e 58 mostram os resultados nos 4 meios testados, para as três linhagens após a indução (LB-2025 (no. 8IND), LB-2036 (9IND) e LB-2038 (36IND)) (item 4.2.4.) com o citrônolol, com duas concentrações de inóculo diferentes, para cada um deles, quanto ao pH (Figura 57a), massa celular (Figura 57b), concentração de óxido de rosa (Figura 58a) e concentração de citrônolol remanescente no meio de cultura (Figura 58b).

Quando analisamos a Figura 57 observamos que quanto maior o pH do meio de cultura, menor a massa celular final encontrada. Esse pH mais neutro (meio 4) (Figura 57a) apresenta a maior concentração de citrônolol remanescente no meio de cultura (LB-2025 (8IND): meio 41 e 43; LB-2036 (9IND): meio 41; LB-2038 (36IND): meio 41 e 43) (Figura 58b).

Quanto à concentração de óxido de rosa não observamos nenhuma relação entre as duas concentrações de esporos inoculadas para cada uma das linhagens (Figura 58a). Sendo

que a maior concentração de óxido de rosa foi encontrada para a linhagem 2036 após a adição (9IND), no meio 1, com inoculo de  $3 \times 10^7$  esporos, aproximadamente de 48 mg/L.

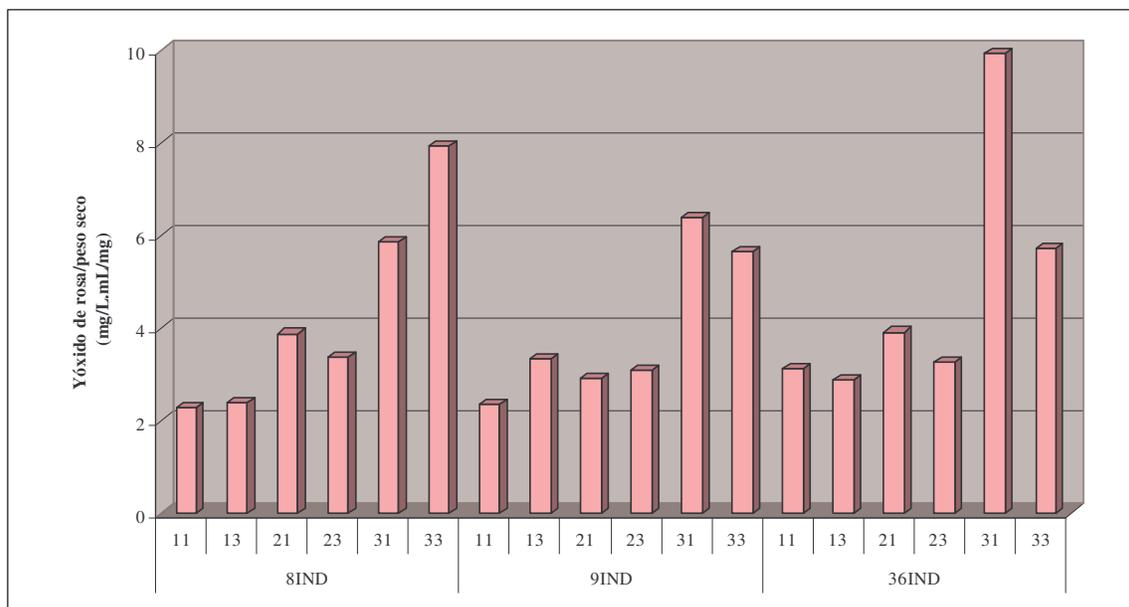
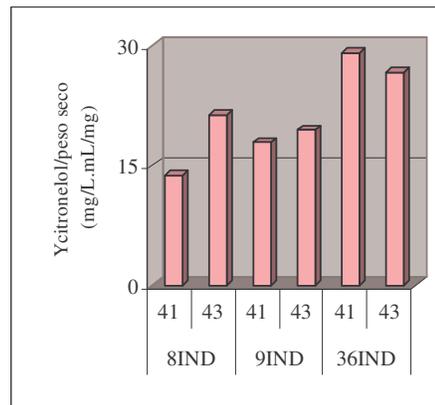
Na Figura 57b verificamos que as linhagens tinham uma massa celular menor no meio de número 4, do que nos demais meios. Portanto essas linhagens teriam que utilizar o citrionelol como fonte de carbono, muito embora essa fonte de carbono seja de difícil metabolização para os microrganismos como pode ser constatado pela massa celular final destes.

Dessa maneira, quando calculamos o rendimento do óxido de rosa, transformado a partir do citrionelol, pela massa celular, os maiores rendimentos foram encontrados para o meio 4 (Figura 59). Essa observação também foi válida para o citrionelol remanescente no meio de cultura em relação a massa celular (Figura 60).

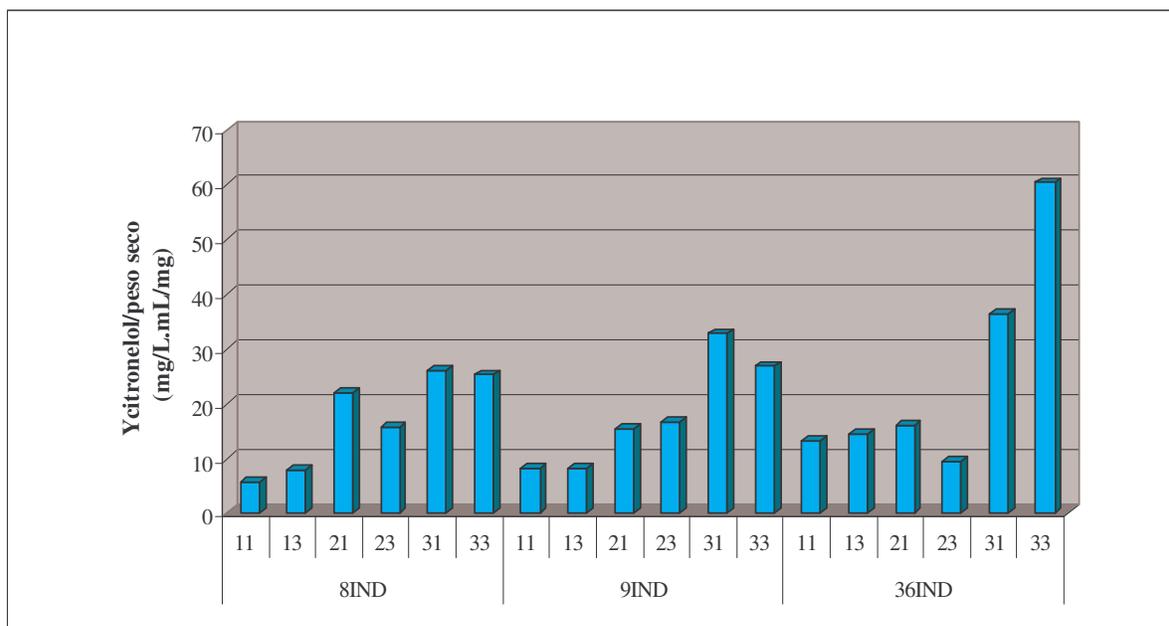
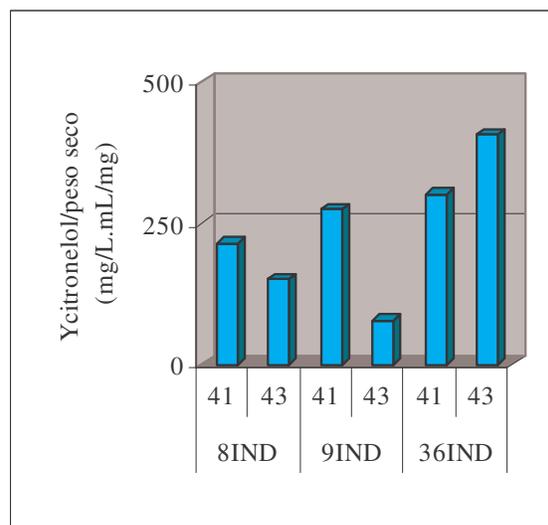
Além disso, os rendimentos tanto do óxido de rosa produzido pela biotransformação quanto do citrionelol remanescente no meio de cultura, pela massa celular mostraram que o meio número 4 foi superior aos demais meios (Figura 59 e Figura 60). Isso porque a massa celular dos microrganismos (Figura 57b) foi extremamente pequena, menor ou igual a 2 mg/mL (Figura 57a).

Pela Figura 57 a e b podemos observar ainda, que os maiores crescimentos foram encontrados em pH extremamente ácidos, pH de 2 a 3, o que já tinha sido observado quando da seleção dos microrganismos para a biotransformação do citrionelol (Figura 39, 41 e 43).

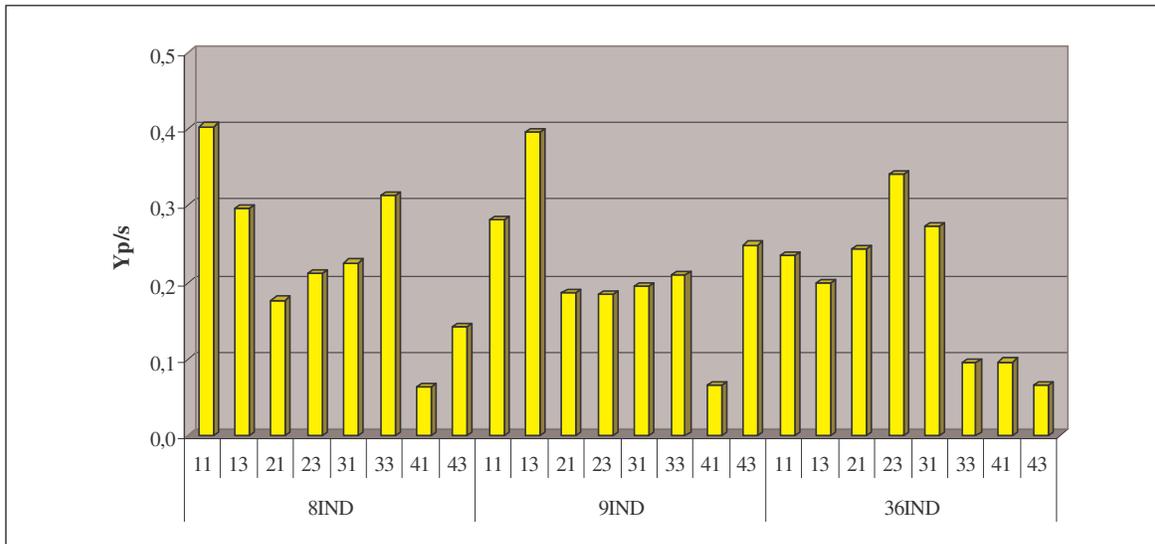
No meio de número 4 há as maiores concentrações do citrionelol remanescente no meio de cultura, em relação aos demais meios de cultura, mas não há uma formação diretamente proporcional de óxido de rosa (Figura 58a e Figura 58b). Portanto quando calculamos os rendimentos do produto (óxido de rosa) pelo substrato remanescente (citrionelol) encontramos como melhores rendimentos os do meio de número 1 (Figura 61), que em relação aos demais apresentam as menores concentrações de citrionelol remanescente no meio de cultura (Figura 58b).



**Figura 59.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



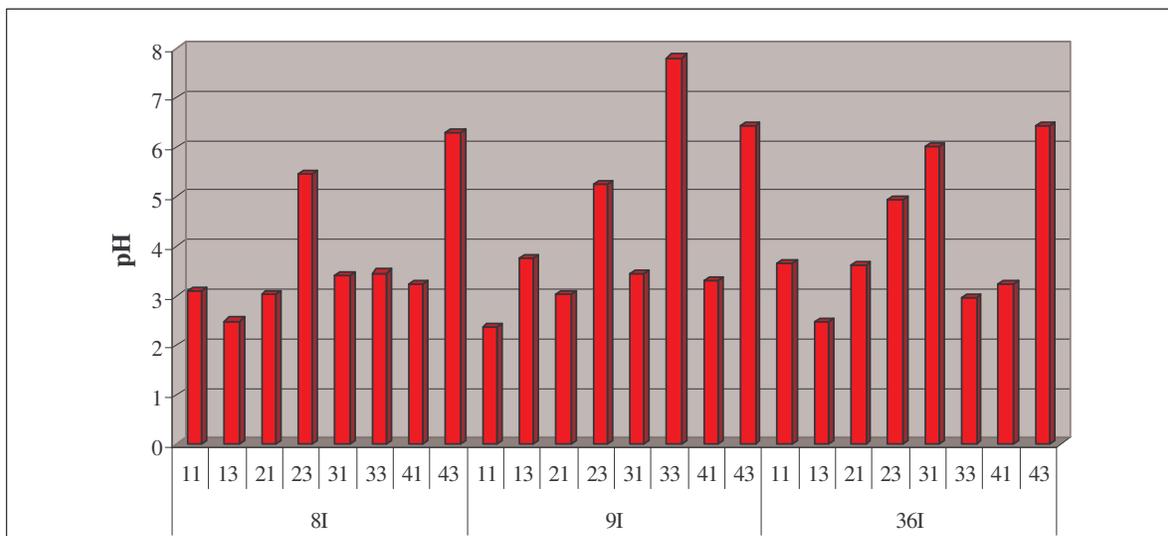
**Figura 60.** Rendimento (Y) da concentração do citronelol remanescente no meio de cultura pelo peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



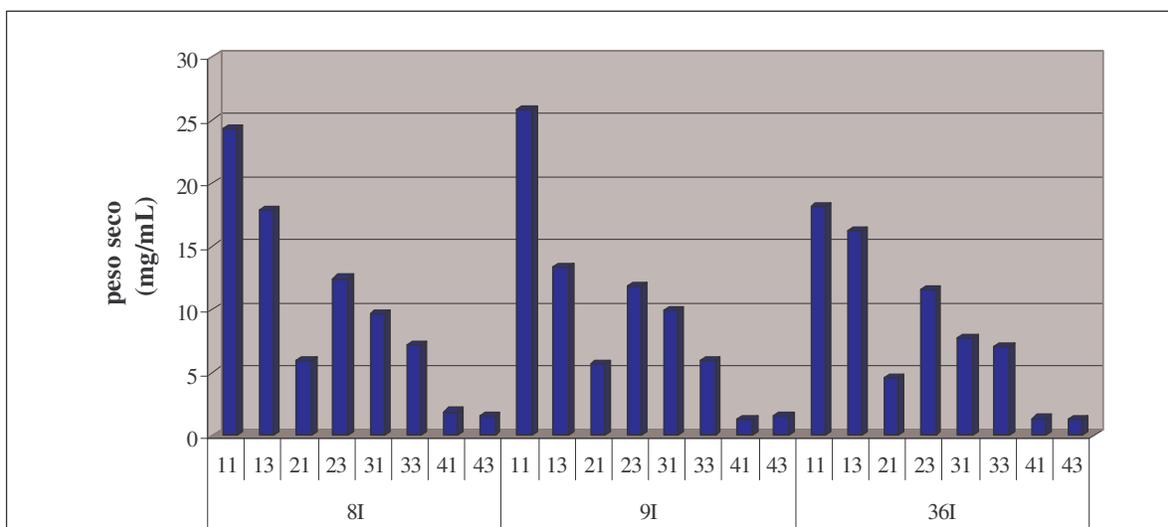
**Figura 61.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo citronelol remanescente no meio de cultura em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2036: 9IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

#### 5.4.2. Estudo da biotransformação pela adição de 0,5% (v/v) de citronelol, após indução.

Na Figura 62 encontramos o comportamento do pH final e peso seco final para as linhagens após a indução, com uma quantidade cinco vezes maior de citronelol adicionado do que a do experimento anterior (item 5.4.1.) (Figura 57).



(a)



(b)

**Figura 62.** Comportamento do pH (a) e do peso seco (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citrônio, com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2036: 9I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

O pH final observado com a adição de 0,5% de citronelol foi menor para as linhagens LB-2025 (no. 8), LB-2036 (no. 9) e LB-2038 (no. 36), após a indução (Figura 62a) em relação a adição de 0,1% de citronelol (Figura 57a).

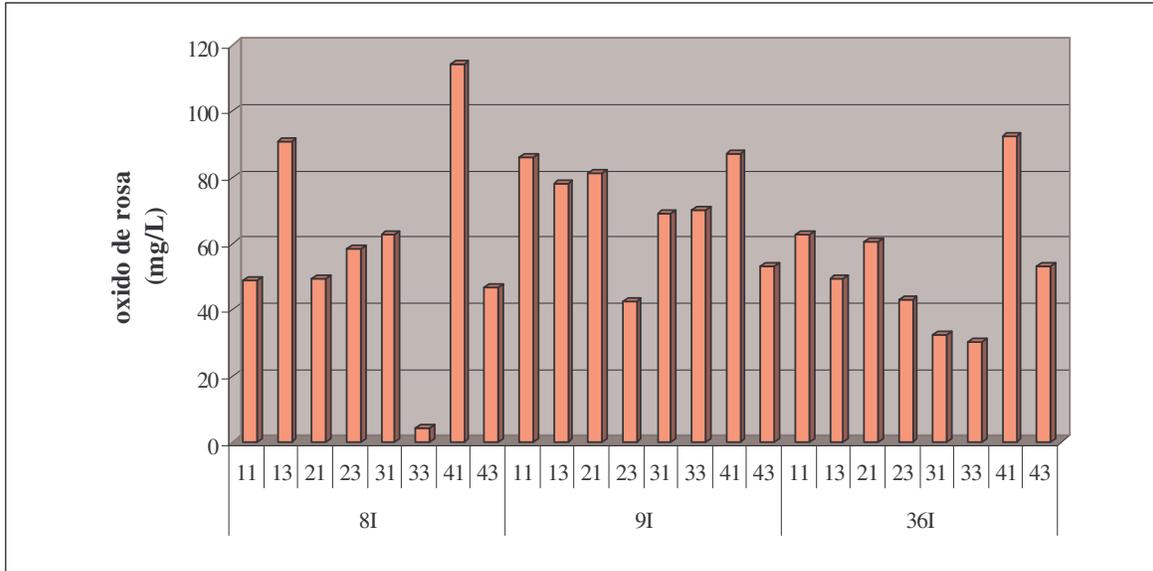
O crescimento (peso seco final) foi bem maior com 0,5% de citronelol (Figura 62b) do que com 0,1% de citronelol (Figura 57b), muitas vezes próximo do dobro obtido com a adição de 0,1% de citronelol (Figura 57b).

Na Figura 62 observamos também que quando adicionamos mais esporos (meios 23, 33, 43), obtivemos pH final maior do que os meios correspondentes com menores concentrações de esporos.

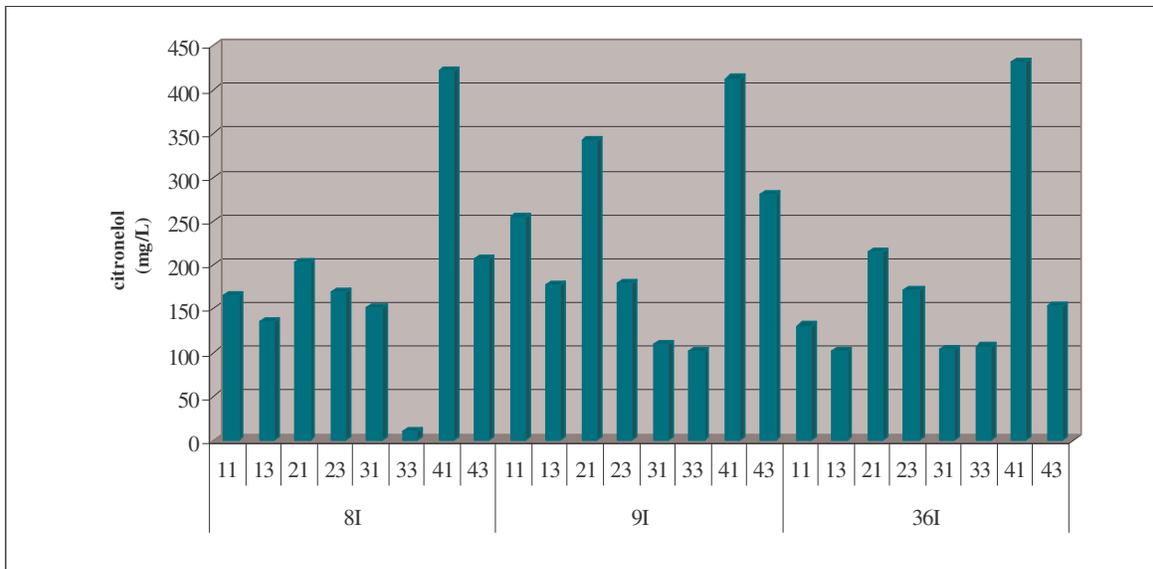
Na Figura 62a e Figura 62b não encontramos a mesma relação entre o pH e o peso seco do que o encontrado para a adição de 0,1% (v/v) de citronelol (Figura 57a e Figura 57b), aonde um maior crescimento foi obtido em menores pHs.

Na Figura 63a vemos que as maiores concentrações de óxido de rosa foram para o meio 4, com  $1 \times 10^7$  esporos de esporos inoculados (meio 41), para as três linhagens, embora esse também tenha sido o meio que se tenha mais citronelol remanescente no meio de cultura (Figura 63b).

Pela Figura 62b verificamos que para os três linhagens testados, no meio 4, temos um crescimento pequeno, embora esse crescimento seja superior ao obtido com a menor adição de citronelol (0,1%) (Figura 57b). Como esse meio não apresenta fonte de carbono, e só poderá utilizar o citronelol como essa fonte, daí esse aumento no peso seco. Isso também se refletirá no citronelol remanescente no meio de cultura uma vez que temos a mesma concentração de esporos tanto na adição com 0,1% de citronelol (Figura 58b) e na adição com 0,5% de citronelol (Figura 63b). Ou seja, aumentamos a concentração de citronelol em cinco vezes, mas não aumentamos o crescimento na mesma proporção, na maioria dos casos o dobro (Figura 57b e 62b). Então grande parte desse citronelol permanece no meio, não sendo metabolizado pelos microrganismos e muito menos sendo transformado em óxido de rosa.



(a)



(b)

**Figura 63.** Concentração do óxido de rosa (a) e do citronelol (b) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2036: 9I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

Aqui tem também os maiores rendimentos de óxido de rosa pelo peso seco (Figura 64) foram significantes maiores no meio número 4, do que nos outros meios, também pelo fato de que as linhagens no meio 4 têm um crescimento bem inferior.

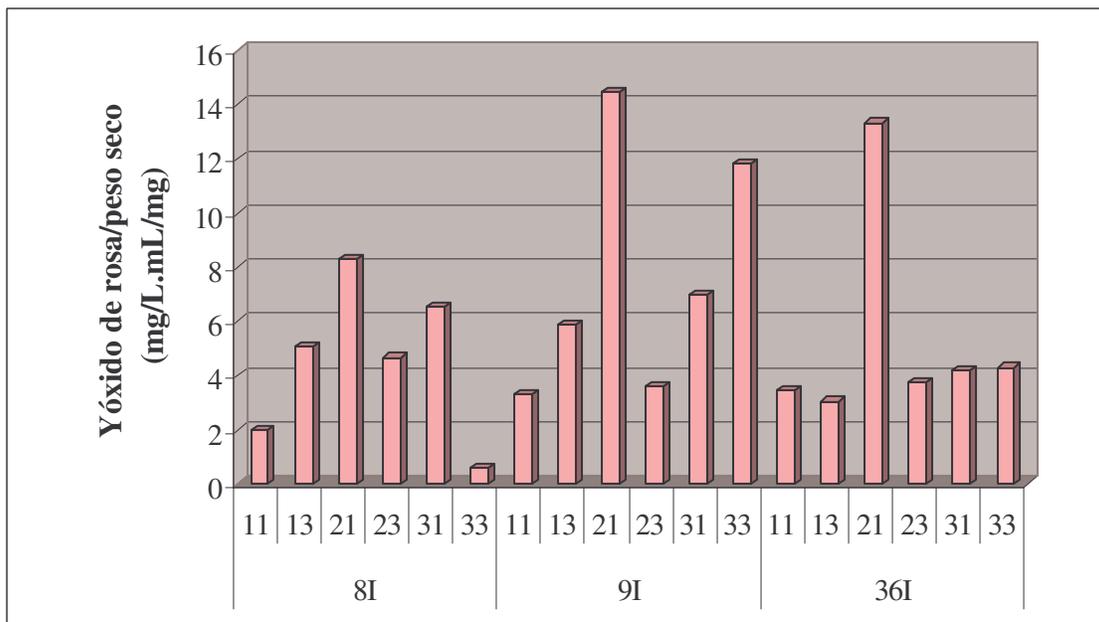
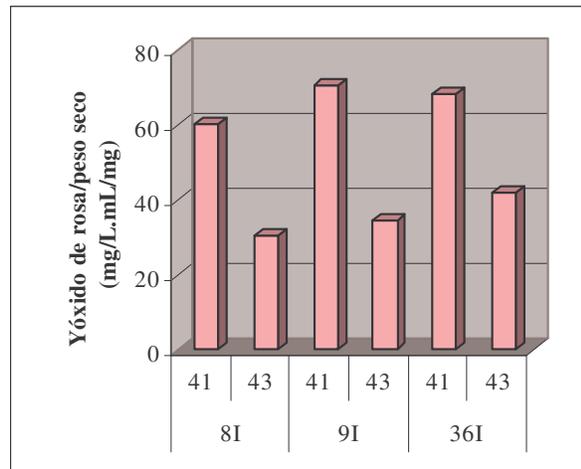
Para o rendimento do citronelol remanescente no meio de cultura pelo peso seco, também, observamos que no meio número 4 obtivemos os maiores rendimentos (Figura 65). Isto está relacionado com dito anteriormente, ao crescimento neste meio de cultura (meio número 4, Figura 62b) ser muito pequeno.

Já o rendimento do produto (óxido de rosa) pelo substrato remanescente (citronelol) (Figura 66), verificamos, como para o experimento com 0,1 % (v/v) de adição do citronelol (Figura 61) que os maiores rendimentos foram encontrados para o meio 3, para as linhagens LB-2036 (no. 9I) e LB-2038 (no. 36I). Para a linhagem LB-2025 (8I) o maior rendimento foi obtido com o meio 1 (Figura 66).

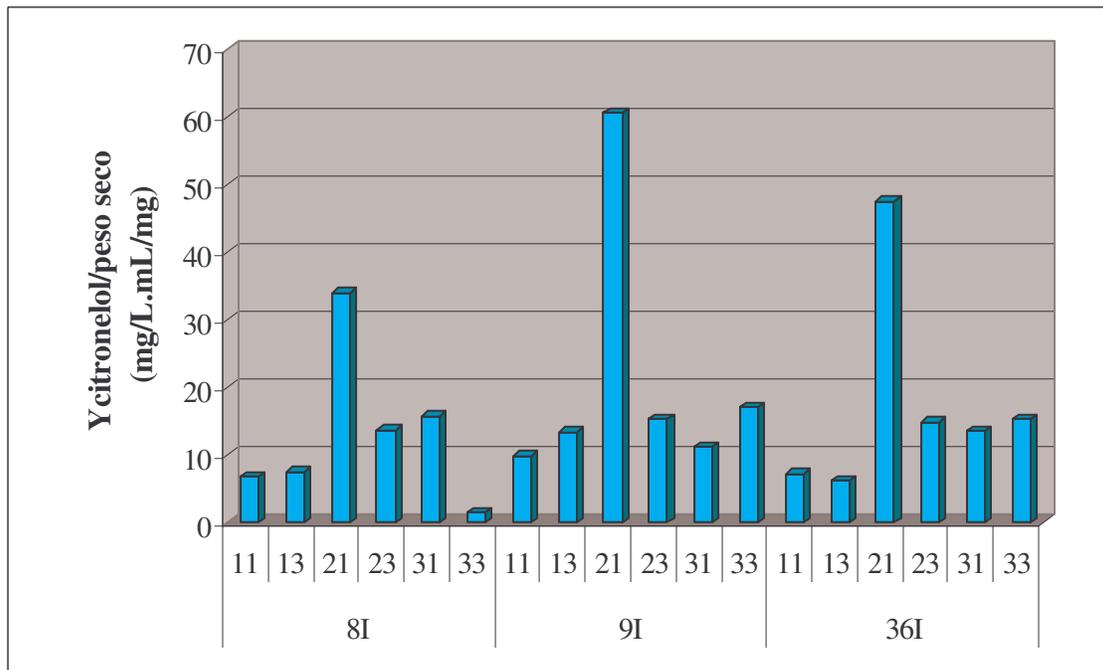
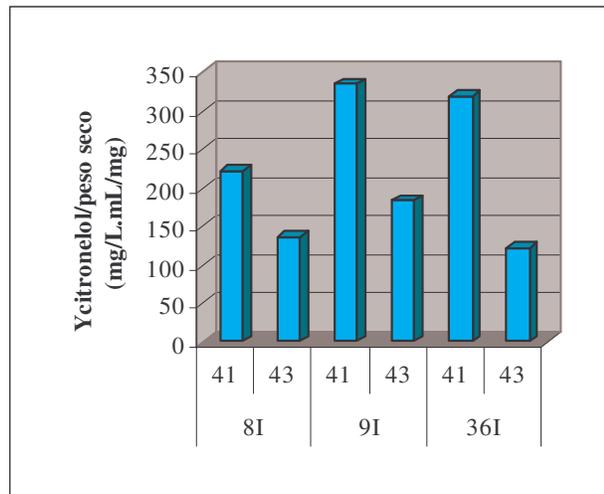
#### **5.4.3. Estudo da Biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de limoneno, após indução.**

De acordo com a Figura 67, verificamos que não há grandes modificações no pH e peso seco entre os inoculo contendo  $1 \times 10^7$  esporos e com  $3 \times 10^7$  esporos da suspensão de cada fungo.

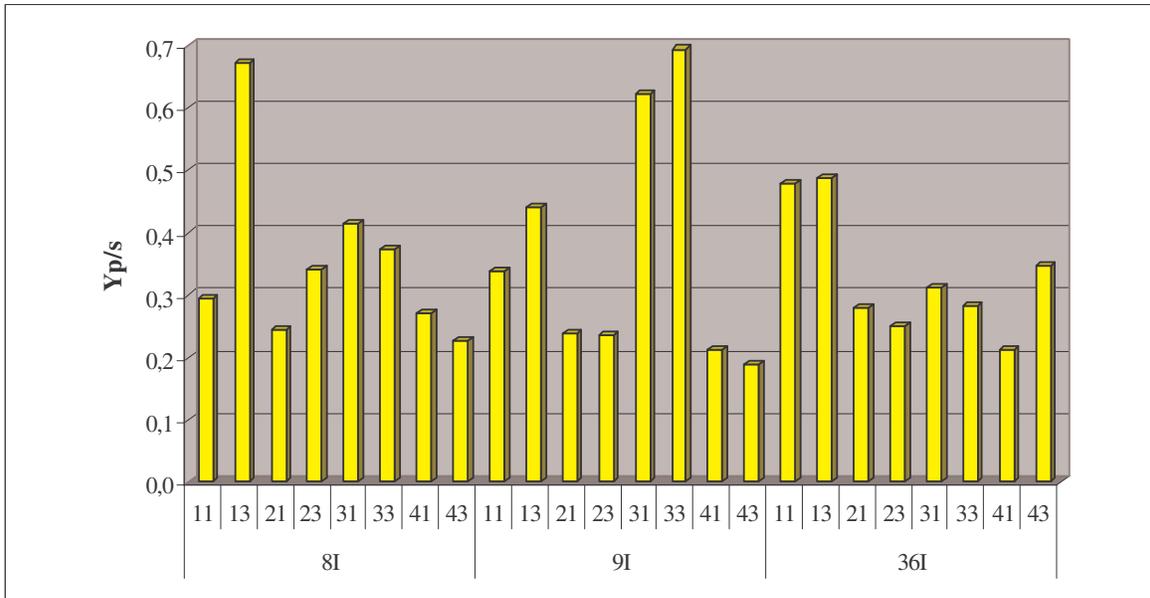
Em relação ao pH obtivemos resultados semelhantes ao já citados aonde os microrganismos com pH final mais ácido são capazes de crescer mais (Figura 67). Assim como para com a biotransformação com o citronelol, a do limoneno no meio 41 e 43, o crescimento foi muito pequeno, o que irá refletir nos rendimentos de produtos em relação ao peso seco final (Figura 69 e 71).



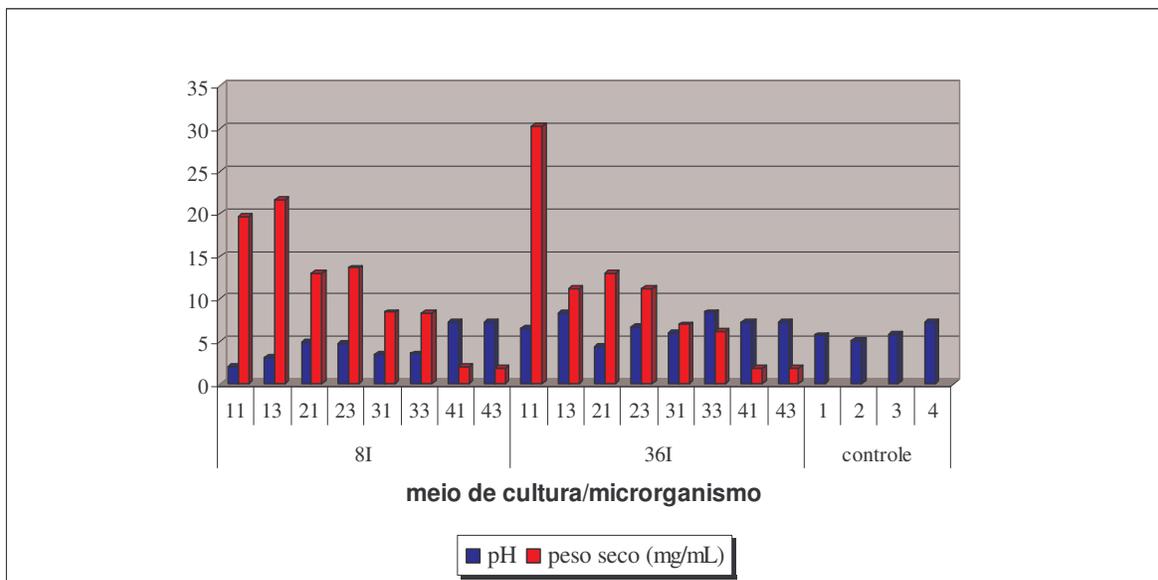
**Figura 64.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2036: 9I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



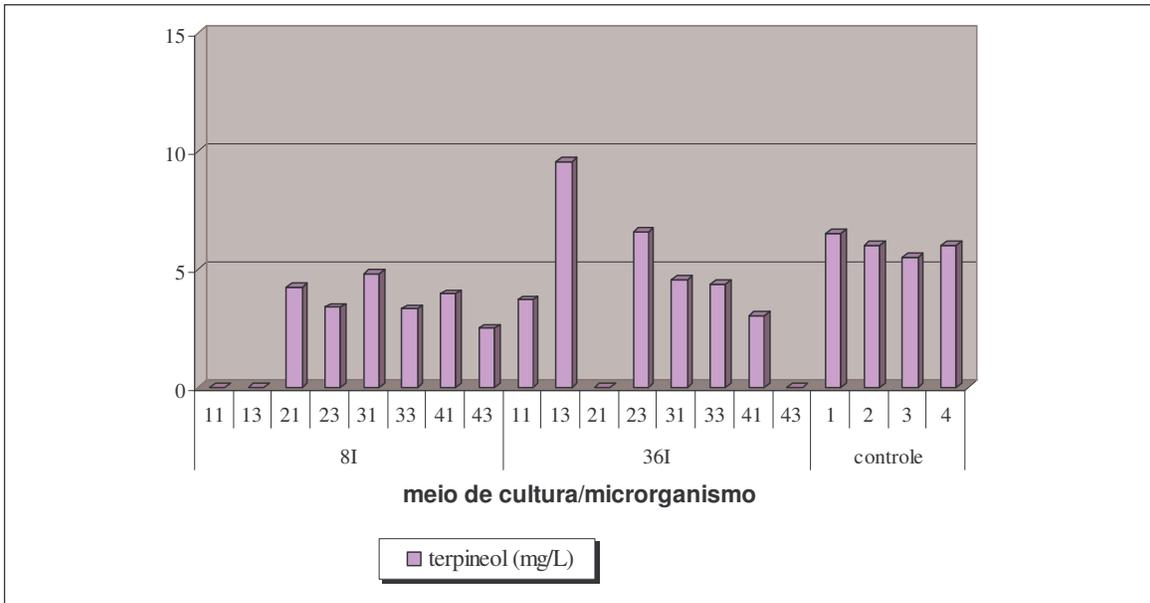
**Figura 65.** Rendimento (Y) da concentração do citronelol remanescente no meio de cultura pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2036: 9I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



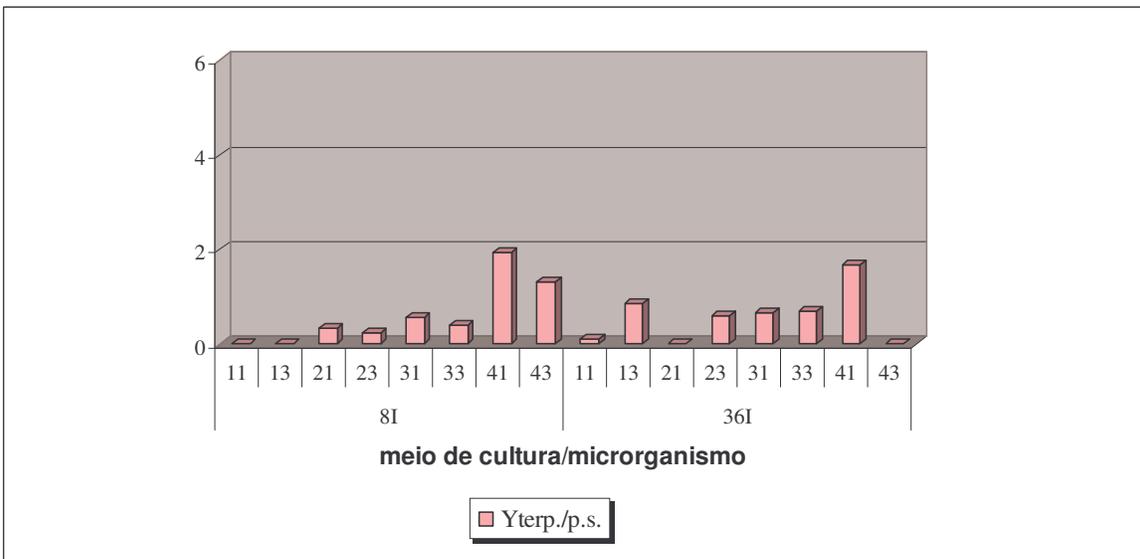
**Figura 66.** Rendimento (Y) da concentração do óxido de rosa pelo citronelol remanescente nos quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,5% (v/v) de citronelol (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025, LB-2036 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2036: 9I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



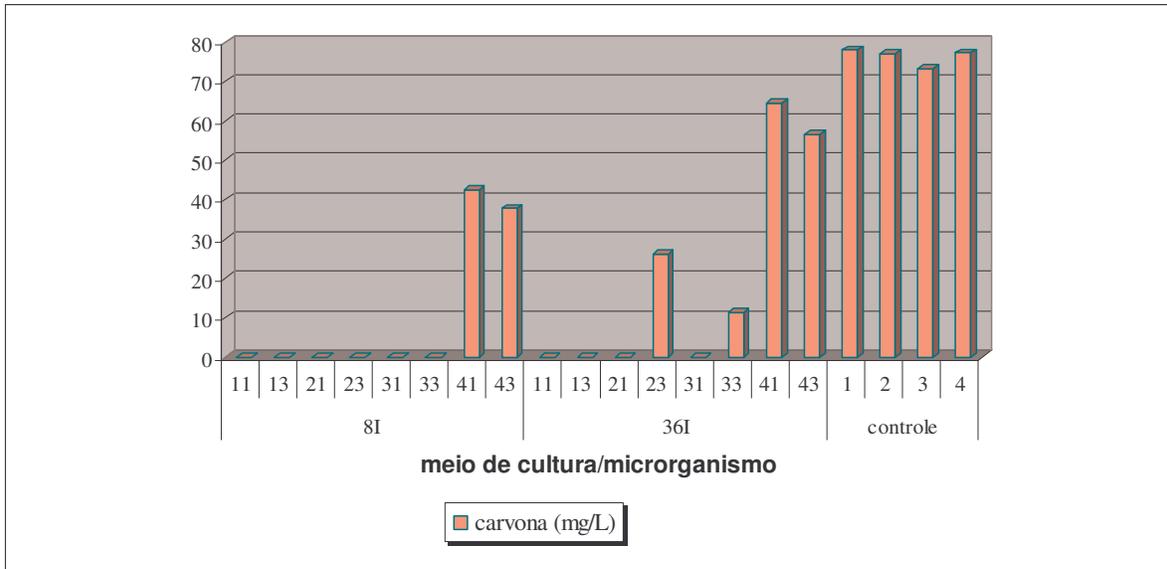
**Figura 67.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



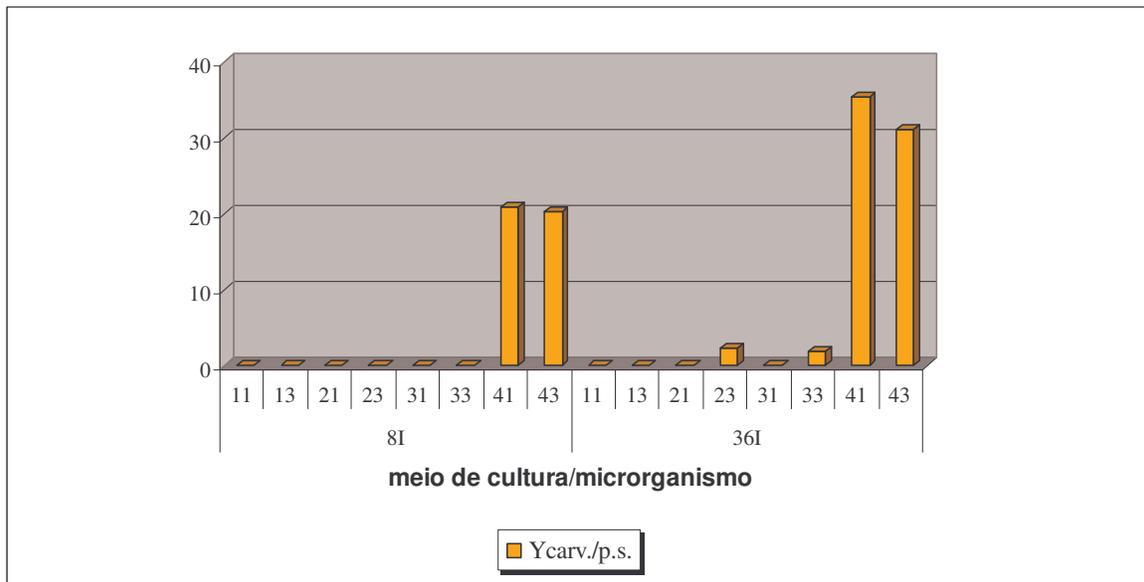
**Figura 68.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 69.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 70.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 71.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

Nos controles mostrados na Figura 68 e 70 verificamos que os níveis de concentração de alfa-terpineol e carvona são superiores aos resultados encontrados, indicando que não há biotransformação, mas sim biodegradação desses dois compostos. Isso pode ser observado na Figura 68 para a obtenção de alfa-terpineol aonde a linhagem LB-2025 (no. 8) após a indução foi capaz de degradar completamente este composto no meio 1. O mesmo acontecendo para o mesmo linhagem em relação a carvona no meio 1, 2 e 3 (Figura 70), aonde houve degradação completa enquanto que no meio 4 houve degradação parcial (Figura 70).

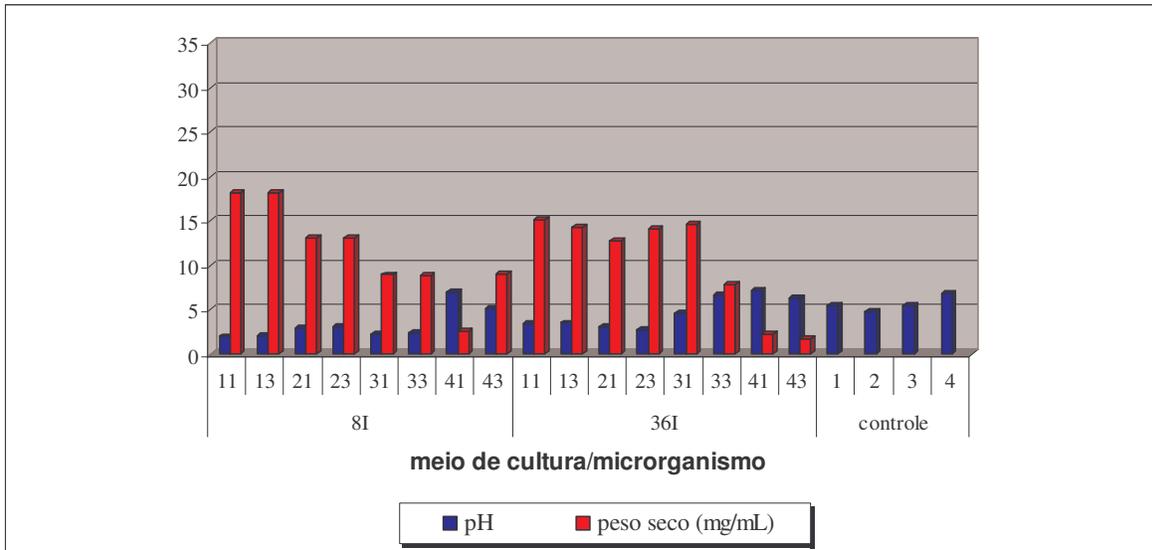
A linhagem LB-2038 (no. 36) também foi capaz de biodegradar completamente a carvona no meio 1; e no meio 2 e 3, nas menores concentrações de inóculo (Figura 70). Nas maiores concentrações de inóculo para o meio 2 e 3 (23 e 33 – Figura 70), houve degradação, mas não completamente como no meio 1 (Figura 70).

#### **5.4.4. Biotransformação pela adição de 1% (v/v) de limoneno, após indução.**

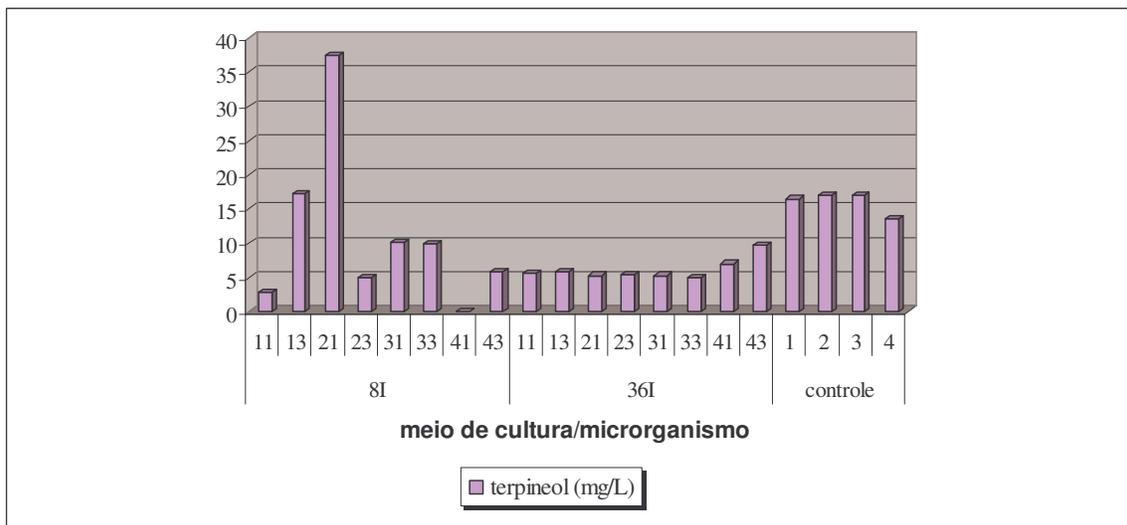
Assim como para os resultados com menores concentrações de limoneno (item 5.4.3.) (Figura 67), quanto menor o pH maior o crescimento dos microrganismos (Figura 72).

Nas Figuras 73 e 75 observamos que nesta concentração de limoneno adicionada (1% (v/v)), não foi possível realizar a degradação completa em todos os meios como para com a menor concentração (0,1% (v/v)) (Figura 68 e 70). Mas observamos que houve degradação parcial de alfa-terpineol e carvona.

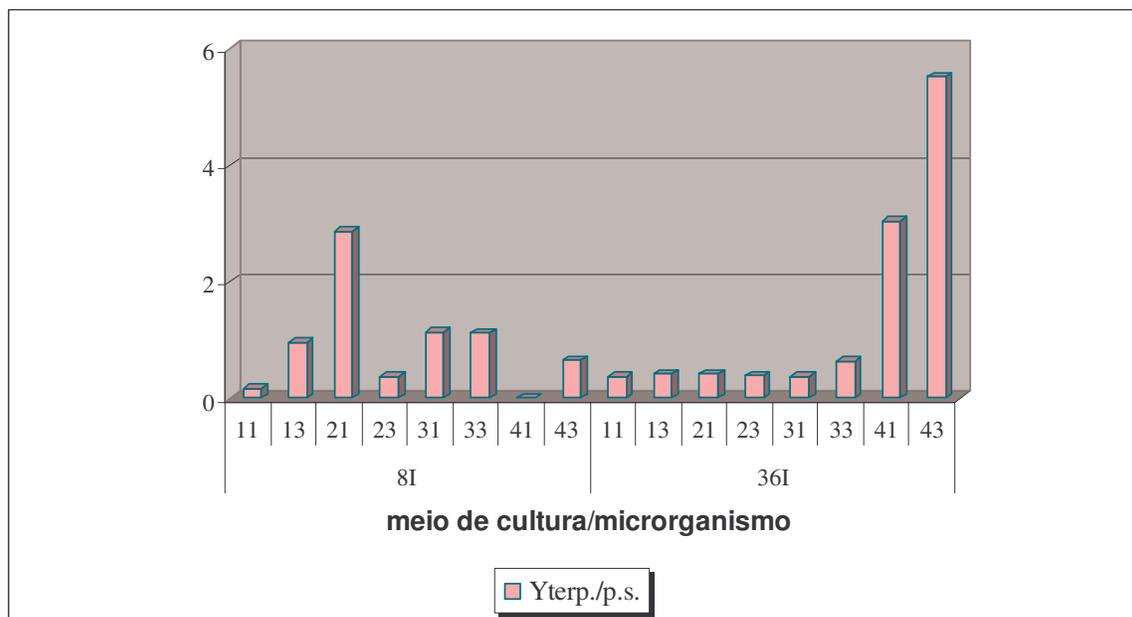
Para o alfa-terpineol houve a degradação completa no meio 41 para a linhagem LB-2025 (no. 8) (Figura 73). Ainda para esse mesmo linhagem observamos que no meio 21 houve uma transformação do limoneno em alfa-terpineol, ao invés da degradação.



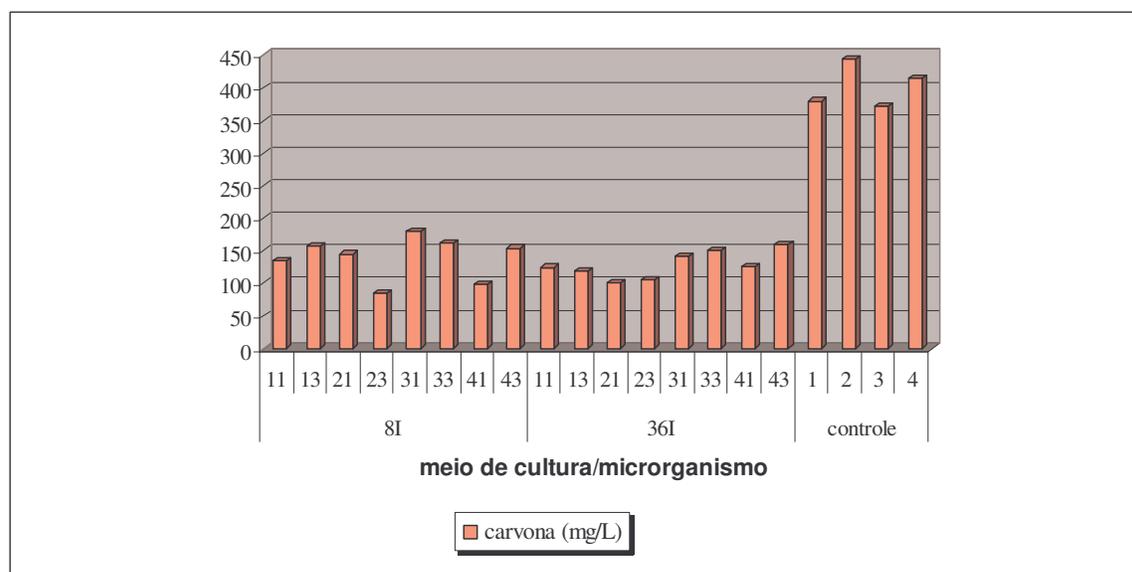
**Figura 72.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8IND, LB-2038: 36IND) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 73.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 74.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

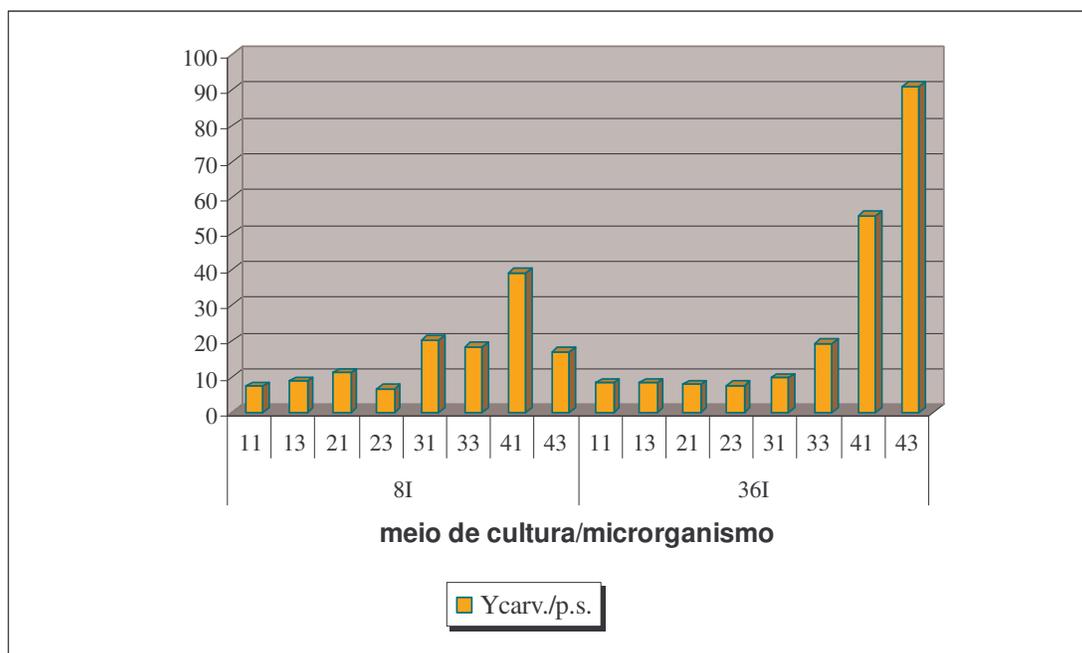


**Figura 75.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

As degradações de carvona ficaram em aproximadamente 50% da concentração de carvona nos controles (Figura 75).

Os rendimentos de alfa-terpineol em relação ao peso seco foram pequenos, de um modo geral, por apresentarem concentrações de alfa-terpineol e peso seco semelhantes entre os 4 meios de cultura utilizados. Há apenas uma exceção para a linhagem LB-2038 (no. 36), após indução (36I), no meio 41 e 43 (Figura 74), aonde os rendimentos foram altos devido a baixa massa celular nesses meios (Figura 72).

Na Figura 76 encontramos o rendimento da carvona em relação a massa celular, sendo os maiores rendimentos obtidos para o meio 4, aonde a massa celular (Figura 72), da linhagem LB-2025 (no. 8) (meio 41) e da linhagem LB-2038 (no. 36) (meios 41 e 43), após a indução (LB-2025: 8I e LB-2038: 36I), foram superiores aos demais meios de cultura.



**Figura 76.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 1% (v/v) de limoneno (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

#### **5.4.5. Biotransformação pela adição de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial 6,0; após indução.**

Na Figura 77 temos os resultados de peso seco e pH, em meio de cultura com pH inicial fixo de 6,0, e após a adição de limoneno nos controles, notamos que apenas o meio 4 teve um valor menor de pH final, enquanto que os demais permaneceram aproximadamente em 6,0.

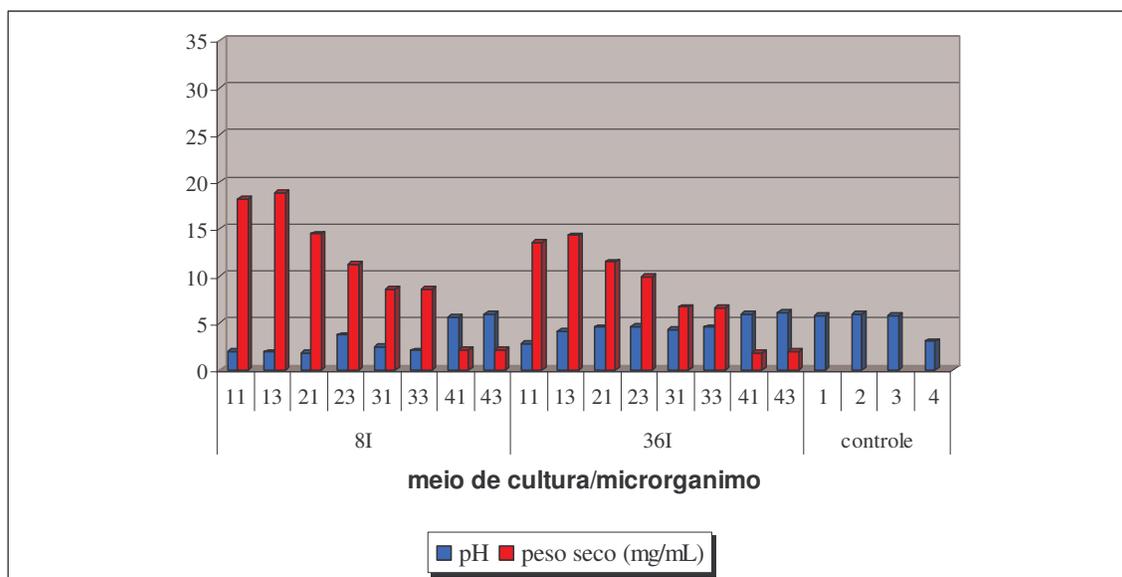
Neste experimento também encontramos que quanto o menor o pH maior a massa celular encontrada (Figura 77).

Mesmo nesse meio com pH inicial fixo, obtivemos a degradação de alfa-terpineol (Figura 78) e carvona (Figura 80), sendo que a carvona foi degradada completamente em um número maior de meios de cultura (meio 13, 21, 23 e 31, para a linhagem LB-2025 (8I); e para a linhagem LB-2038 (36I) nos meios 23 e 33 – Figura 80).

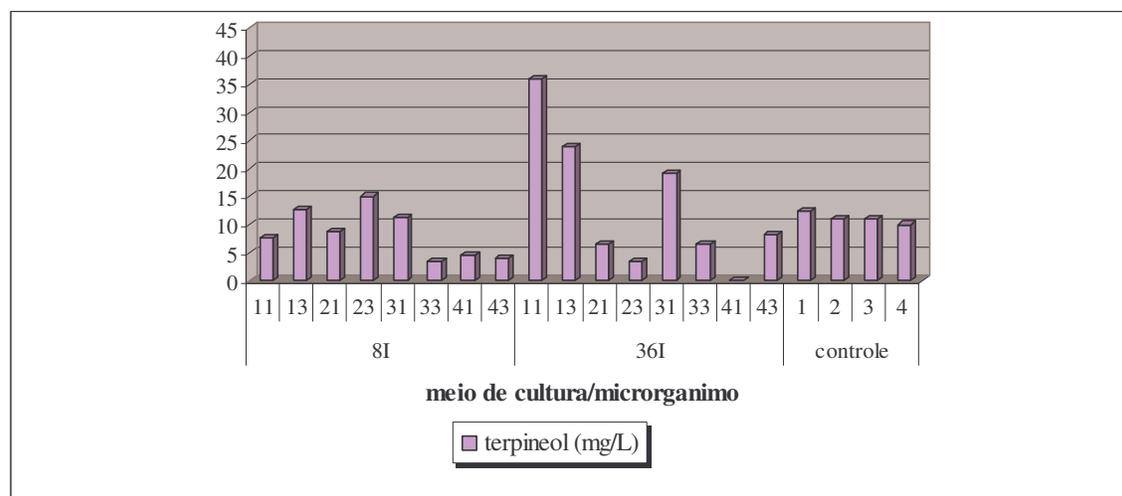
Para o alfa-terpineol encontramos a degradação apenas para o meio 41 da linhagem LB-2038 (36I), enquanto que para outros meios, como 23, para a linhagem LB-2025 (8I), e o meio 11, 13 e 31 para a linhagem LB-2038 (36I), encontram-se concentrações maiores de alfa-terpineol do que o encontrado nos controle, o que indica que o limoneno foi transformado em alfa-terpineol (Figura 78).

Nos meios 33, 41 e 43 para a linhagem LB-2025 (8I); e nos meios 31, 41 e 43, obteve-se uma maior concentração de carvona do que o obtido nos controle (Figura 80).

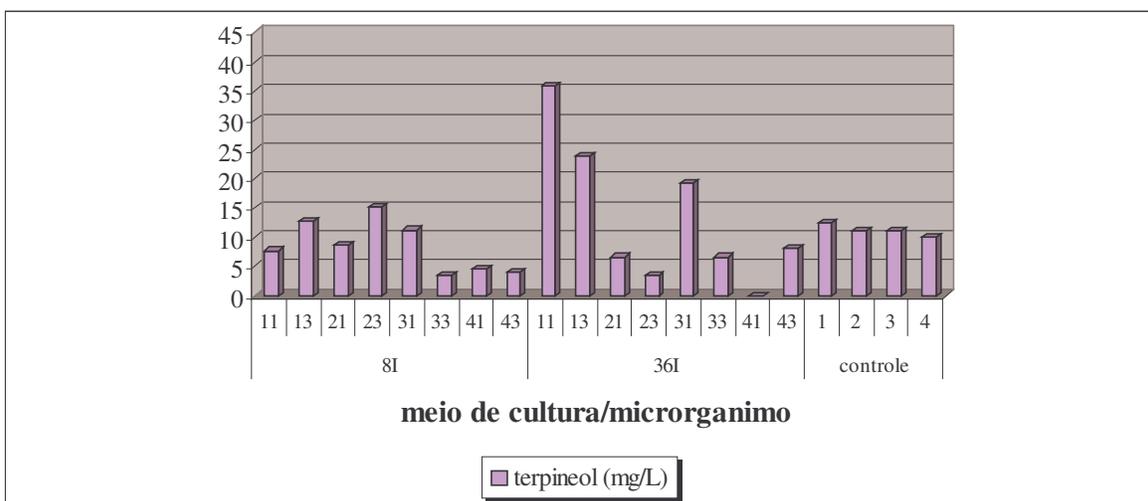
Os rendimentos tanto de alfa-terpineol (Figura 79) quanto de carvona (Figura 81) em relação ao peso seco foram maiores para o meio 4, devido a menor massa celular encontrada para cada um dos microrganismos. Havendo uma exceção para a linhagem LB-2038 (36I) no meio 41 aonde não há alfa-terpineol mais, por ele ter sido completamente degradado (Figura 78).



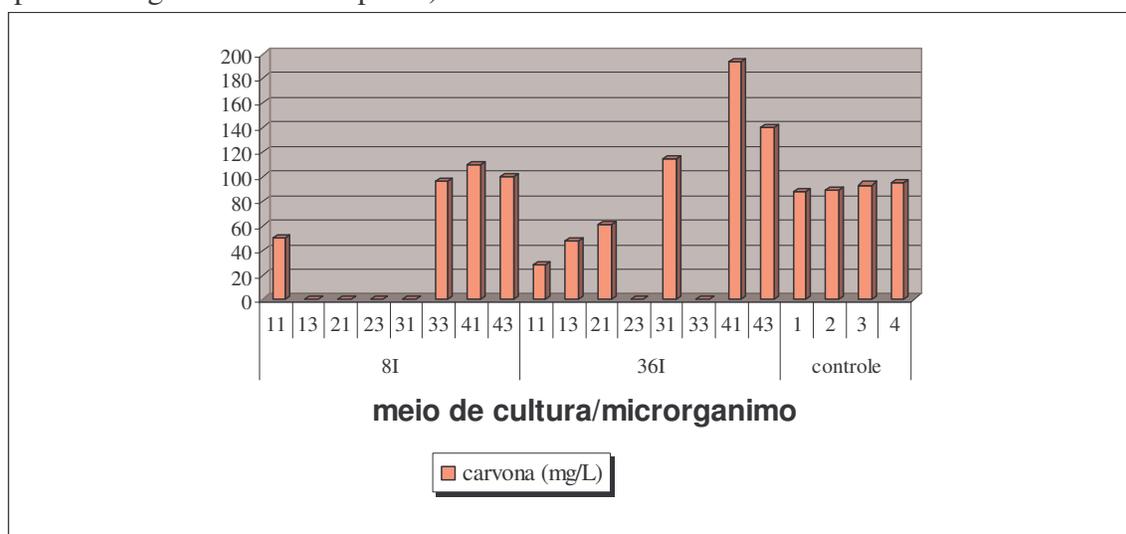
**Figura 77.** Comportamento do pH e do peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



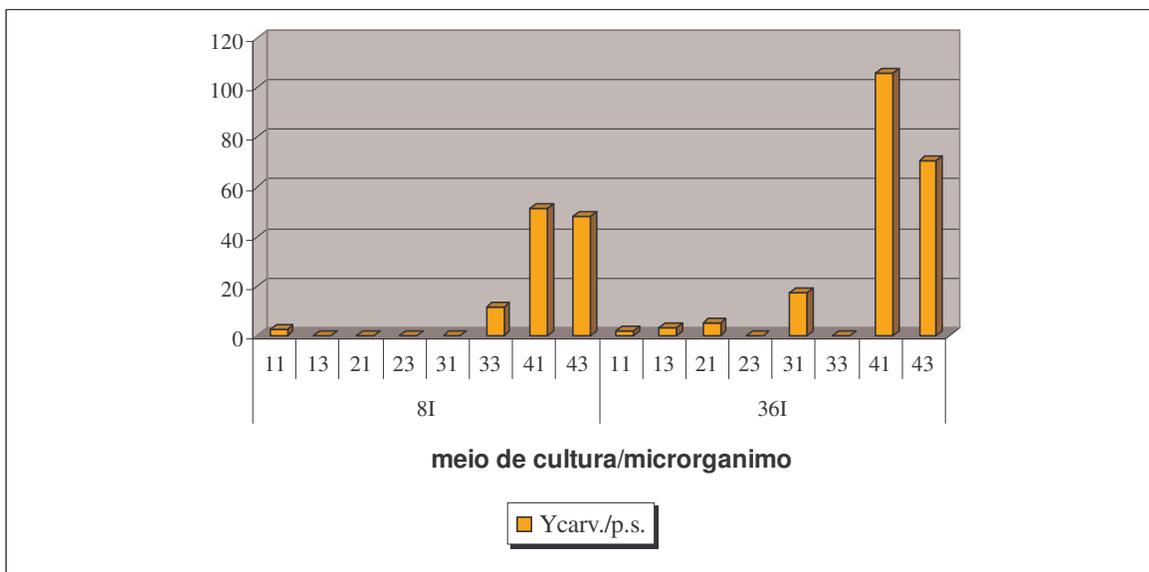
**Figura 78.** Concentração de alfa-terpineol em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 79.** Rendimento (Y) da concentração do alfa-terpineol pelo peso seco em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 80.** Concentração de carvona em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).



**Figura 81.** Rendimento (Y) da concentração de carvona pelo peso seco (a) em quatro meios de cultura líquido diferentes, com três adições de 0,1% (v/v) de limoneno, com pH inicial calibrado a 6,0 (item 4.2.5.), com duas concentrações de esporos, para as três linhagens (LB-2025 e LB-2038) após a indução (item 4.2.4.) (LB-2025: 8I, LB-2038: 36I) (xy; x = meio 1, 2, 3 e 4; e y = concentração de esporos inoculadas, sendo 1 igual a  $1 \times 10^7$  esporos e 3 igual a  $3 \times 10^7$  esporos).

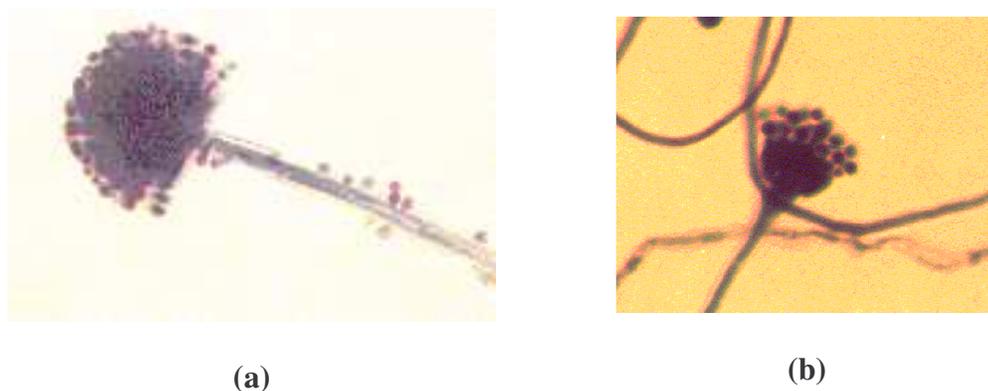
## 5.5. Rota Metabólica para Obtenção do Óxido de Rosa.

### 5.5.1. Microrganismos utilizados.

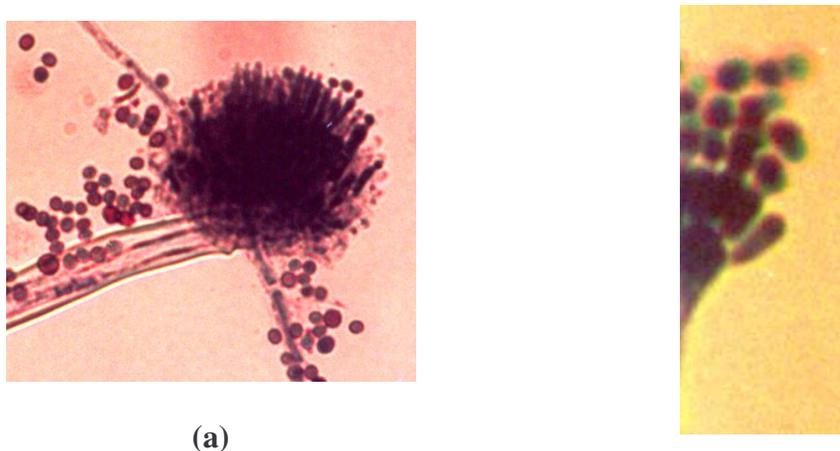
Nessa etapa foram utilizadas as linhagens LB-2000 (no. 31), LB-2060 (no. 4), LB-2010 (no. 20), LB-2015 (no. 23), LB-2042 (no. 3), LB-2025 (no. 8), LB-2029 (no. 14) e LB-2038 (no. 36). Na Tabela IX encontramos a origem de cada uma das linhagens e na Figura 82 e a Figura 83 encontramos as fotos da morfologia de cada um deles.

A linhagem LB-2038 (no. 36) (Figura 56a) trata-se do *Aspergillus* sp. e a linhagem LB-2025 (no. 8) de *Penicillium* sp. (Figura 56b), conforme visto anteriormente (item 5.3.).

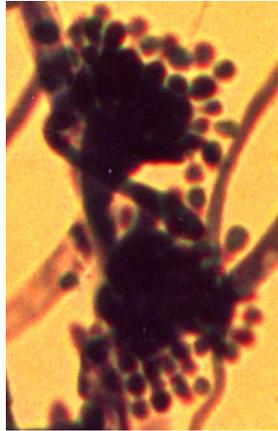
As linhagens da Figura 82 e Figura 83 são: linhagem LB-2042 (no. 3), *Aspergillus* sp.; linhagem LB-2015 (no. 23), *Penicillium* sp.; a linhagem LB-2000 (no. 31), *Aspergillus* sp.; a linhagem LB-2010 (no. 20), *Penicillium* sp.; linhagem LB-2029 (no. 14), *Penicillium* sp.; e a linhagem LB-2060 (no. 4), *Penicillium* sp. Esta classificação preliminar quanto ao gênero foi baseado de acordo com o estudo taxonômico de FISCHER e COOK (2001).



**Figura 82.** Foto em microscópio óptico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem 2042 (no. 3): *Aspergillus* sp. e (b) linhagem 2015 (no. 23): *Penicillium* sp.



(b)



(c)



(d)

**Figura 83.** Foto em microscópio óptico com aumento de 400x, dos linhagens (a) linhagem LB-2000 (no. 31): *Aspergillus* sp.; (b) linhagem LB-2010 (no. 20): *Penicillium* sp.; (c) linhagem LB-2029 (no. 14), *Penicillium* sp.; (d) linhagem LB-2060 (no. 4) *Penicillium* sp.

#### 5.5.2. Biotransformação no meio de cultura líquido número 4.

A partir das oito linhagens estudadas nos experimentos em meio de cultura líquido número 4, adicionando-se de uma única vez o citrionelol (0,3%), obtivemos o epóxido, 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, com índice de retenção de 2086 e 2098, e o diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol, com índice de retenção de 2272 (Anexo XIX e Anexo XX).

Estes compostos não têm padrões comerciais disponíveis, mas ONKEN (1998) sintetizou-os, calculando o índice de Kovats para cada um deles. O 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol apresenta dois isômeros, sendo o primeiro isômero com índice de retenção de 2026 e o segundo isômero, com índice de 2038. Há também no Anexo XXI o espectro de massa

obtido por ONKEN (1998) quando da síntese do epóxido para a comparação com os espectros obtidos nos experimentos aqui analisados (Anexo XX).

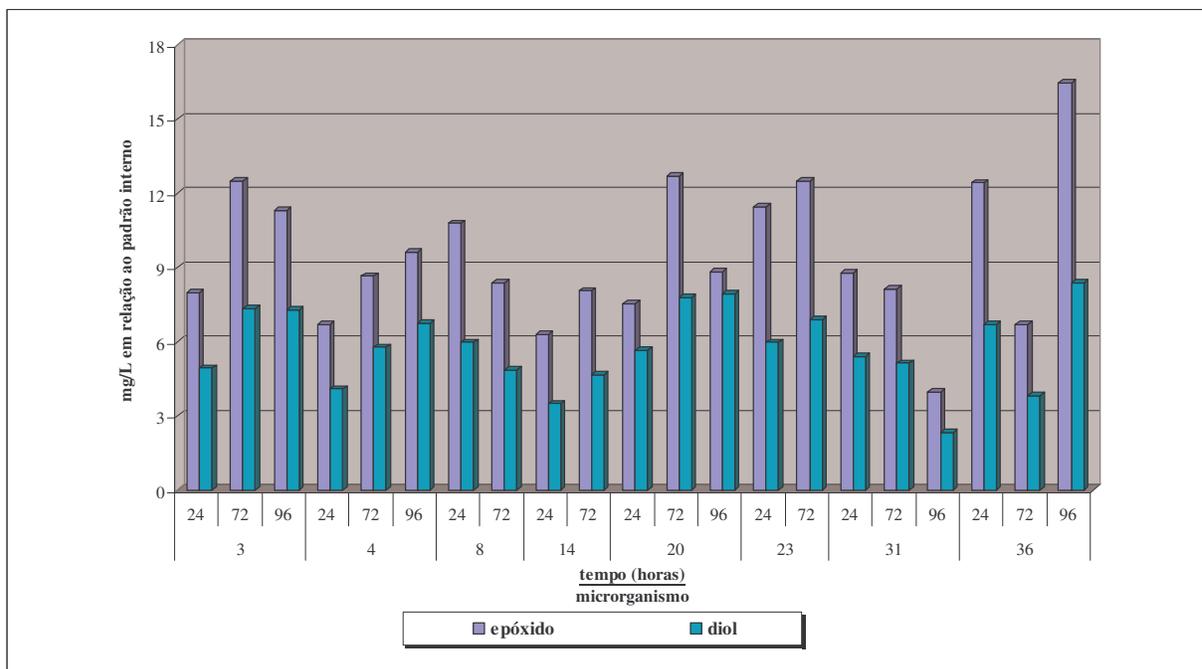
Além disso, há uma comparação dos dois espectros de massa do diol obtido neste trabalho, o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol, e o obtido por ONKEN (1998) (Anexo XX e Anexo XXII). Juntamente com esses foi anexado o espectro de massa do 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol e do 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol (Anexo XXIII e Anexo XXIV), obtidos também por ONKEN (1998). Dessa maneira podemos observar que os espectros de massa desses últimos compostos são bastante diferentes dos do epóxido, 7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol; e do diol, o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol, obtido nos experimentos realizados nessa dissertação.

O dados de m/z (%) encontram-se na Tabela XVI do espectro de massa da amostra (Anexo XX). A formação do epóxido e do diol aqui obtidos para as diferentes cepas, em diferentes tempos, encontra-se na Figura 84.

**Tabela XVI.** m/z (%) dos dois compostos identificados na biotransformação utilizando o meio líquido número 4.

Composto	m/z (%) obtidos	m/z (%) (ONKEN, 1998)
3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol	59 (100), 55 (44), 71 (35), 41 (33), 43 (32), 81 (32), 57 (26), 85 (25), 68 (24), 96 (6), 113 (2), 111 (2), 139 (2), 121 (1), 157 (1), 154 (1).	59 (100), 55 (64), 41 (61), 43 (59), 71(51), 81 (47), 57 (42), 85 (39), 68 (36), 96 (9), 113 (3), 111 (2), 139 (2), 121 (1), 157 (1), 154 (1).
3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol	43 (100), 139 (79), 69 (55), 55 (42), 41 (32), 85 (34), 121 (29), 109 (26), 95 (22), 154 (5).	43 (100), 139 (91), 69 (68), 55 (61), 41 (53), 85 (49), 121 (47), 109 (28), 95 (27), 154 (9).

Podemos afirmar, então, que as oito linhagens aqui testadas foram capazes de produzir o 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (Figura 84). Na Figura 61 podemos verificar o perfil de produção de cada um das linhagens, e na Figura 62 encontramos o citrionelol remanescente no meio de cultura.

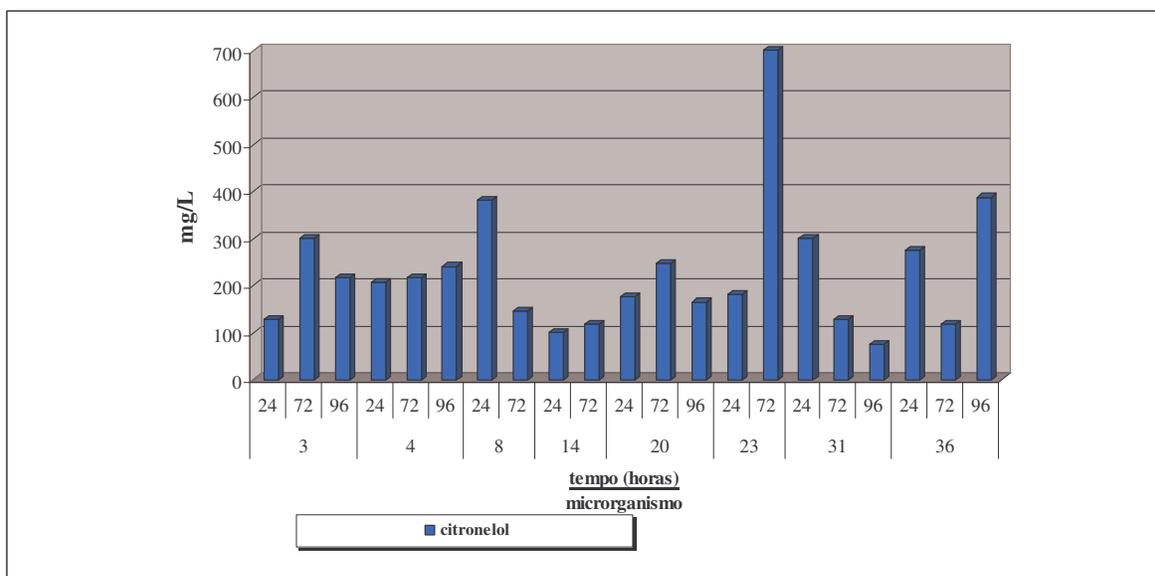


**Figura 84.** Formação do 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol (epóxido) e 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol (diol), no meio de cultura líquido número 4 (item 4.2.6.3.), para as oito linhagens (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)).

De acordo com a Figura 84 observamos, que de uma maneira geral, encontramos concentrações do 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol (epóxido) muito maior do que o do 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.

Uma outra importante observação está no fato de que durante o tempo de cada linhagem para a metabolização do citronelol, há em algumas linhagens (LB-2017, LB-2025, LB-2010, LB-2000) uma diminuição da concentração do epóxido, mas isso não é convertido para a formação do diol (Figura 84). Sugerindo que a via de formação do epóxido para a transformação em triol seja a rota metabólica mais fácil para o microrganismo, neste meio de cultura.

Estas linhagens (LB-2017, LB-2025, LB-2010, LB-2000) que apresentaram uma diminuição da concentração do epóxido ao longo do tempo (Figura 84), também tiveram uma diminuição da concentração do citronelol com o tempo (Figura 85). Sugerindo que a diminuição da formação do epóxido ao longo do tempo está relacionada à concentração de citronelol.



**Figura 85.** Citronelol remanescente no meio de cultura em cada uma das amostras de fungos do meio líquido número 4 (item 4.2.6.3.), para as oito linhagens (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36))

Além disso, a rota metabólica sugerida e proposta para *Cystoderma carcharias* (Figura 27) (ONKEN, 1998; ONKEN e BERGER, 1999; SCHARDER e BERGER, 2001), parece se confirmar para essas linhagens também.

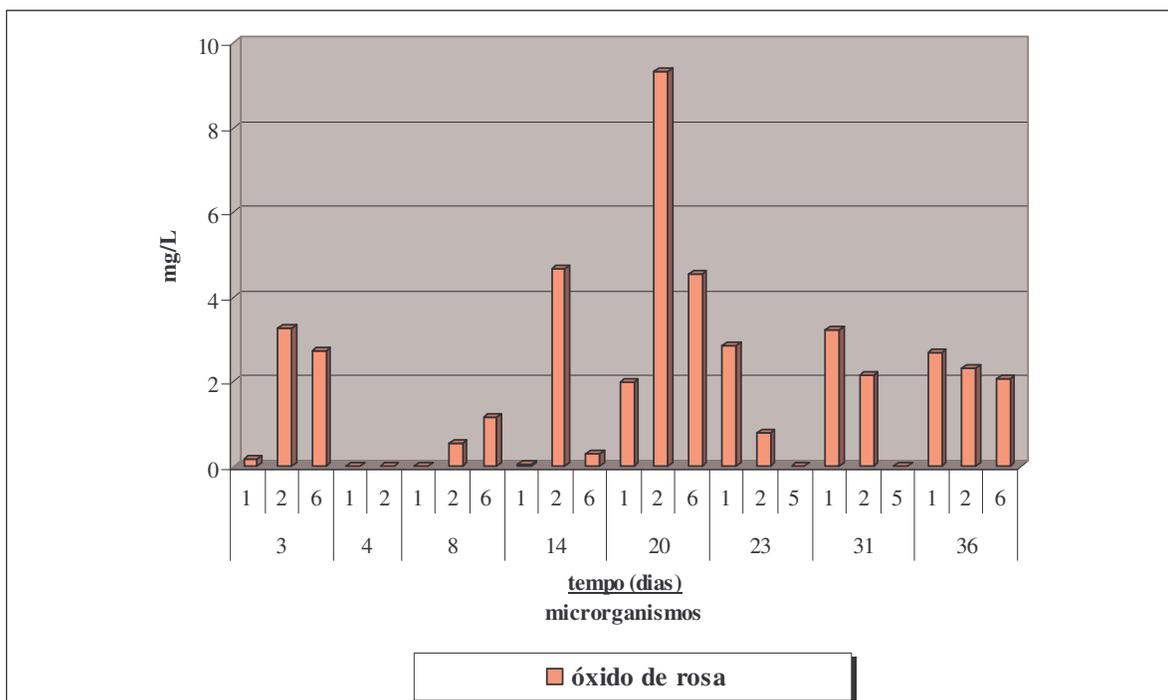
O cultivo no meio líquido número 4 (item 4.2.6.3.) que não apresenta fonte de carbono mostrou que o metabolismo para a possível obtenção do óxido de rosa talvez fosse possível, se esses microrganismos fossem cultivados durante um maior tempo ou se houvesse a presença da fonte de carbono.

Por isso o experimento seguinte foi realizado nas condições em que ONKEN (1998) obteve o óxido de rosa.

### 5.5.3. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2.

Das oito linhagens utilizados, apenas sete deles foram capazes de produzir o óxido de rosa (Figura 86) no meio líquido número 2, com pH 6,0, adicionando-se de uma única vez o citrionelol (0,125 % (v/v)).

O óxido de rosa foi determinado pelo CG e CG-MS, sendo o seu índice de retenção correspondente a cada isômero, de 1356 e 1370 (Anexo XXV e Anexo XXVI). Esse índice de retenção foi bastante próximo ou igual ao encontrado e citado por ONKEN (1998), que seria, 1336 e 1350 para o cis/trans-óxido de rosa, respectivamente; e 1354 e 1370 o encontrado na literatura de acordo com o mesmo autor.

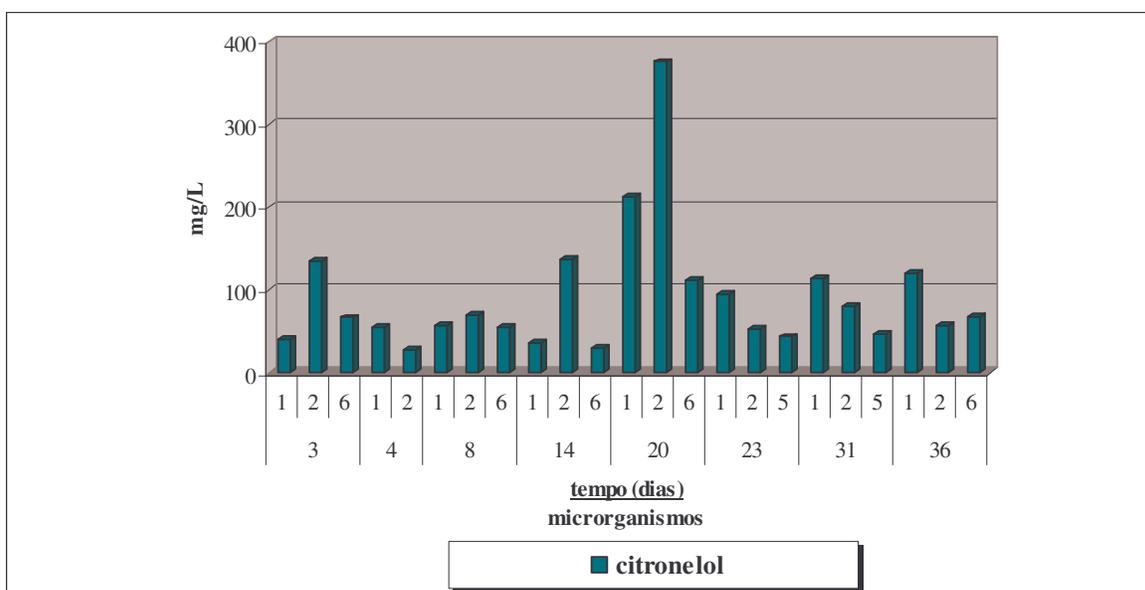


**Figura 86.** Produção de óxido de rosa dos oito linhagens testados no meio de cultura líquida número 2, com pH 6,0 (item 4.2.6.3), das oito linhagens testados (linhagem LB-2041 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)).

Segundo o ESO 00 Database of essential oils ([www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)), na coluna carbowax 20M, utilizada tanto no CG quanto no CG-MS, o índice de retenção para o o cis-óxido de rosa seria de 1354; e para o trans-óxido de rosa, 1366.

Portanto, neste meio líquido número 2, com pH 6,0; as sete linhagens foram capazes de transformar o citrionelol em cis/trans-óxido de rosa (Figura 86).

A linhagem número LB-2010 (no. 20) foi capaz de produzir a maior concentração de óxido de rosa dentre as oito linhagens utilizadas (Figura 86). Essa linhagem foi também a que apresentou a maior concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura (Figura 87).



**Figura 87.** Citrionelol remanescente no meio de cultura líquido número 2, com pH 6,0 (item 4.2.6.3), dos oito linhagens testadas (linhagem LB-2041 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)).

ONKEN e BERGER (1999) quando estudaram a produção de citrionelol por *Cystoderma carcharias*, em reator de membrana, adicionaram a cada 24h, durante 5 dias, 40 mg/L de citrionelol, e obtiveram a concentração máxima do triol, 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol, e do diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.

Na Figura 86 e Figura 87 podemos verificar que a diminuição da concentração do óxido de rosa está diretamente ligada a diminuição da concentração de citrionelol, o que está

de acordo com o encontrado por ONKEN e BERGER (1999), para o 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol, e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.

Além disso, esse experimento foi capaz de provar que esses microrganismos são capazes de formar o óxido de rosa e que a rota bioquímica proposta por ONKEN e BERGER (1999) pode ser válida não somente para *Cystoderma carcharias*, mas também para outros microrganismos. Esta rota bioquímica é bastante diferente da rota metabólica encontrada para *Botrytis cinerea* (Figura 29) (BRUNERIE *et al.*, 1987).

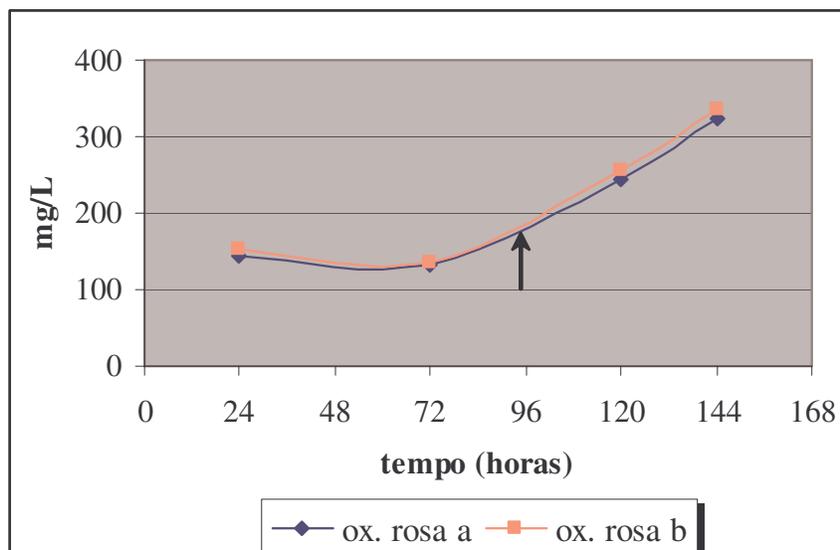
#### **5.5.4. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2 do óxido de rosa para a linhagem LB-2038 (no. 36).**

De acordo com a rota bioquímica proposta por ONKEN E BERGER (1999) e ONKEN (1998), e confirmada para as linhagens aqui utilizadas, o óxido de rosa seria o composto final para a biotransformação do citrionelol. Para confirmar essa hipótese adicionamos óxido de rosa (0,125% (v/v)) ao meio de cultura líquido número 2, com pH 6,0 (item 4.2.6.3.), após 24 horas de crescimento, de uma única vez.

De acordo com os CG-MS (Anexo XXVII) podemos verificar que não houve nenhum outro composto presente, além do óxido de rosa. Dessa maneira podemos dizer que não houve metabolização desse óxido de rosa, nas 144h da análise do experimento.

Em 96 horas houve uma nova adição de óxido de rosa (0,125% (v/v)) (Figura 88), permanecendo o experimento por mais 48 horas. Ainda assim o óxido de rosa não foi transformado em nenhum composto.

A diferença de concentração do óxido de rosa, 120h e 144h (Figura 88) deve-se ao fato de que este composto não é solúvel em água. Dessa maneira quando retiramos uma alíquota do meio temos dispersão de concentração do óxido de rosa.



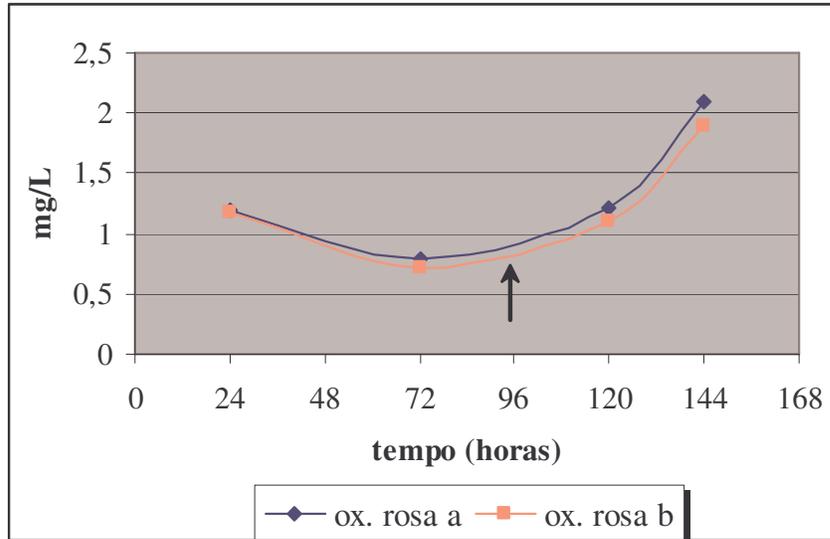
**Figura 88.** Biotransformação do óxido de rosa pela linhagem LB-2038, a seta indica a adição de óxido de rosa (0,125 % (v/v)).

#### 5.5.5. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2 do limoneno e do limoneno como co-adjuvante do citrônolol pela linhagem LB-2038 (no. 36).

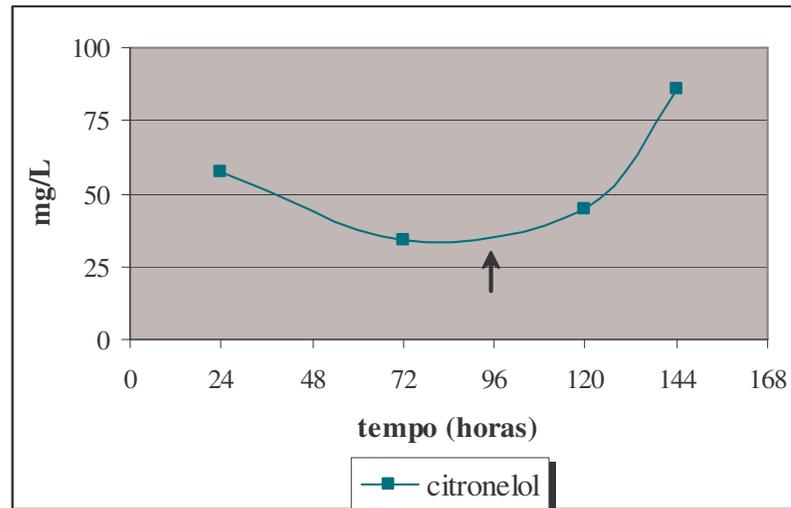
Neste experimento gostaríamos de avaliar a possibilidade do limoneno atuar como co-solvente do citrônolol.

O branco do meio utilizando a adição de limoneno (0,0063% (v/v)) e citrônolol (0,125% (v/v)) foi realizado não apresentando nenhum composto.

Na Figura 89 verificamos que houve um aumento da concentração do óxido de rosa embora essa concentração seja ainda pequena. Podemos verificar ainda que esse aumento do óxido de rosa está diretamente relacionado a quantidade de citrônolol disponível no meio de cultura (Figura 90).



**Figura 89.** Biotransformação do citronelol, utilizando o limoneno como co-solvente, em óxido de rosa, pela linhagem LB-2038, no meio líquido número 2, pH 6,0 (item 4.2.6.3.).



**Figura 90.** Citronelol remanescente no meio líquido número 2, pH 6,0, utilizando o limoneno como co-solvente do citronelol, pelo linhagem LB-2038 (item 4.2.6.3.).

### **5.5.6. Biotransformação do citrônolol, no meio de cultura líquido número 2, com células adaptadas, pela linhagem LB-2038.**

Alguns autores mencionam a possibilidade de aumentar a concentração dos compostos biotransformados a partir de uma adaptação das células ao composto a ser biotransformado.

A linhagem LB-2038 foi inoculada (item 4.2.6.3.), a partir de uma suspensão de esporos, no meio líquido número 2, pH inicial 6,0; e após 8h de crescimento foi adicionado citrônolol (0,125 % (v/v)) ao meio.

Após 20h de crescimento em shaker, 30°C e 160 rpm, verificamos no microscópio ótico a existência de esporos, e então, transferimos (18 mL) para um novo meio de cultura de mesma composição, e colocamos novamente no shaker, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Verificamos que depois de 48 horas de crescimento neste novo meio, não houve a formação de pellets, conforme o esperado e o obtido em todos os experimentos. Mas pelo microscópio podemos observar novamente que havia esporos.

Dessa maneira realizamos um outro tipo de adaptação, onde após 72 horas de inoculados os esporos, e com formação dos pellets adicionamos citrônolol (0,125% (v/v)). Após 24 horas da adição transferimos (18 mL) desse meio para um novo meio de cultura.

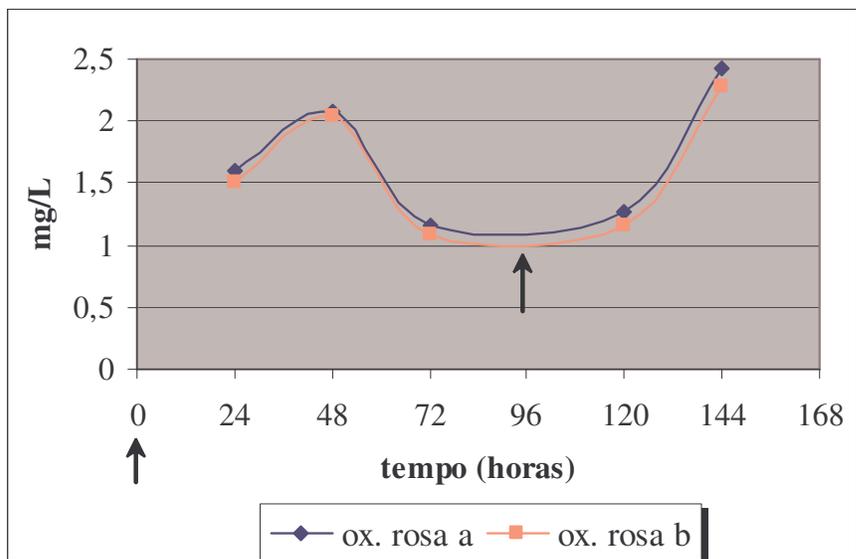
Encontramos 0,42 mg/L do óxido de rosa a e 0,41 mg/L do óxido de rosa b, e 90 mg/L de citrônolol.

### **5.5.7. Biotransformação no meio de cultura líquido número 2, com duas adições de citrônolol, com a linhagem LB-2038 (no. 36).**

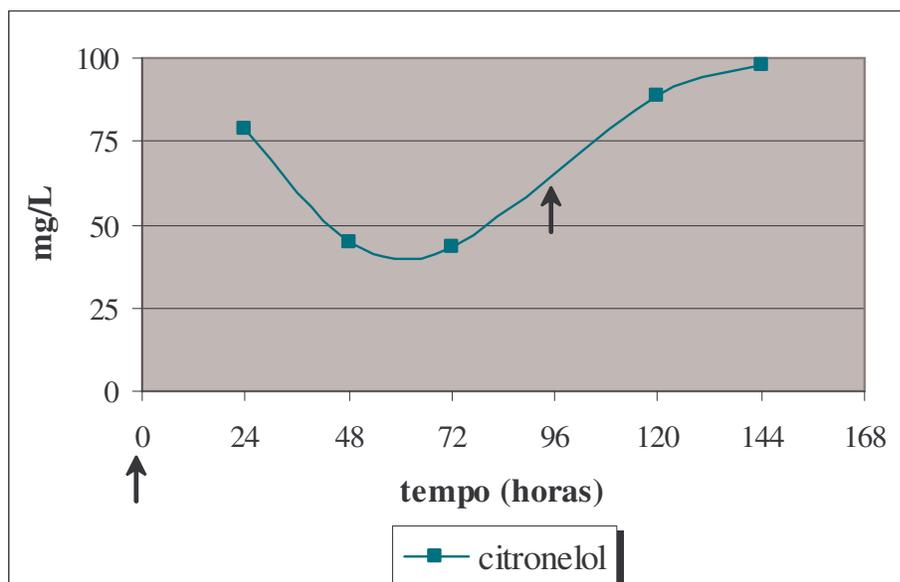
Conforme mencionado anteriormente, quando há uma diminuição do citrônolol, há concomitante diminuição da concentração do óxido de rosa (Figura 92 e Figura 91).

Após a adição de uma segunda dose de citrônolol (Figura 91), na mesma concentração do que a primeira obteve-se uma adaptação e um aumento da concentração de óxido de rosa (Figura 92).

Isso pode ser corroborado pelos resultados encontrados por ONKEN (1998) e ONKEN e BERGER (1999), aonde após a adição de citronelol houve um aumento na concentração do 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol, e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol.



**Figura 91.** Biotransformação do citronelol em óxido de rosa, no meio de cultura líquido número 2 (item 4.2.6.3.), com duas adições de citronelol (indicadas pelas setas).



**Figura 92.** Citronelol remanescente no meio de cultura líquido número 2 (item 4.2.6.3.), com duas adições deste (indicadas pelas setas).

## 6. CONCLUSÕES

- Na seleção de microrganismos para a biotransformação do citrionelol visando a obtenção do óxido de rosa, obtivemos dois microrganismos como as melhores linhagens: LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9). As linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) são de *Penicillium* sp.; e o LB-2038 (no. 36), *Aspergillus* sp.. A curva de crescimento e da biotransformação do citrionelol, ao longo do tempo de incubação, nos mostrou que tanto para a linhagem LB-2025 (no. 8) quanto para a linhagem LB-2036 (no. 9), que somente após a terceira adição de citrionelol é que obtemos o acúmulo do óxido de rosa. Este acúmulo ainda está relacionado a concentração de citrionelol remanescente no meio de cultura e ao fato do pH ser ácido.
- A seleção de microrganismos para a biotransformação do limoneno visando a obtenção de alfa-terpineol e carvona resultou em duas linhagens, LB-2025 (no. 8) e LB-2038 (no. 36). A linhagem LB-2025 (no. 8) produziu 10 mg/L para a carvona e o alfa-terpineol; e a linhagem LB-2038 (no. 36) produziu 2 mg/L de alfa-terpineol e 48 mg/L de carvona.
- Os produtos obtidos na biotransformação do geraniol foram: o 4-metil-3-penten-1-ol e o 6 metil-5-hepten-2-ona.
- A biotransformação do linalol resultou nos óxidos do linalol (furano), o alfa-terpineol e o geraniol. A linhagem LB-2008 (no. 7) foi capaz de produzir o óxido de linalol, 380 mg/L; e o geraniol, 11 mg/L. A linhagem LB-2010 (no. 20) foi capaz de produzir 130 mg/L de alfa-terpineol a partir do linalol.
- As linhagens LB-2025 (no. 8), LB-2036 (no. 9) e LB-2038 (no. 36) tiveram uma diminuição do pH final de cultivo, após a indução com citrionelol e o óxido de rosa; e para as linhagens LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) uma diminuição também da massa celular. Para a linhagem LB-2038 (no. 36) a massa celular final teve um aumento. O óxido de rosa produzido pela biotransformação do citrionelol, pela linhagem LB-2025 (no. 8) antes da indução foi de 6,5 mg/L, aumentando, após a indução, para 30 mg/L, o que representa uma transformação do citrionelol

de aproximadamente 5 vezes. Para a linhagem LB-2036 (no. 9), a produção de óxido de rosa antes da indução que foi de 4,5 mg/L passou para 38 mg/L, aumento de 8 vezes. A linhagem LB-2038 (no. 36) produziu quase dez vezes mais óxido de rosa após a indução, de 3 mg/L antes da indução, para 29 mg/L após a indução. As concentrações de citrionelol remanescente no meio de cultura para a linhagem LB-2025 (no. 8) e LB-2036 (no. 9) também foram menores, o que representou um maior consumo com maior produção de óxido de rosa. Para a linhagem LB-2038 (no. 36) a quantidade de citrionelol remanescente no meio de cultura não foi alterada pela indução.

- As oito linhagens estudadas (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)), no meio de cultura líquido no. 4, sem fonte de carbono, e com adição de citrionelol (0,3% (v/v)), de uma única vez foram capazes de formar o epóxido, 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, e o diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol. Das oito linhagens (linhagem LB-2042 (no. 3); LB-2060 (no. 4); LB-2025 (no. 8); LB-2029 (no. 14); LB-2010 (no. 20); LB-2015 (no. 23); LB-2000 (no. 31); e LB-2038 (no. 36)) utilizadas, apenas sete delas foram capazes de produzir o óxido de rosa no meio líquido número 2, com pH 6,0, adicionando-se de uma única vez o citrionelol na concentração de 0,125 % (v/v).
- A linhagem LB-2038 (no. 36) não metabolizou o óxido de rosa, nas 144 horas de biotransformação, mostrando que esse composto deve ser o composto final da biotransformação do citrionelol.
- A linhagem LB-2038 foi adaptada ao citrionelol a partir de uma suspensão de esporos, no meio líquido número 2, pH inicial 6,0; sendo que estes esporos não foram capazes de crescer em um novo meio líquido. Mas quando adicionamos pellets para a biotransformação e 24h após o crescimento, fez-se a adição de citrionelol (0,125 % (v/v)) ao meio, encontramos 0,42 mg/L do óxido de rosa A e 0,41 mg/L de óxido de rosa B.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ABECITRUS, [www.abecitrus.com.br/subprobr.html](http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html). Agosto/2003.
- ACOSTA, M., MAZAS, N., MEJÍAS, E., PINO, J. Obtencion de aromatizantes mediante biotransformacion del limoneno por *Pseudomonas aeruginosa*, **Alimentaria**, p. 73-75., 1995.
- ALEU, J. e COLLADO, I. G. Biotransformation by *Botrytis* species, **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, p. 77-93, 2001.
- ASAKAWA, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOTA, M. e NOMA, Y. Biotransformation of monoterpenoids, (-)-and (+)-menthols, terpinlene and carvotanacetone by *Aspergillus* species, **Phytochem.**, v. 30, n. 12, p3981-3987, 1991.
- BARITAU, O., et al. Sechage et conservation des plantes aromatiques. (Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. *Basil, O. basilicum L.*), **Flavour Fragr. J.**, v. 7, p. 267-271, 1992. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <[http: www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- BAUER, K.; GARBE, D. **Common Fragrance and Flavour Materials, Preparations, Properties and Uses**. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985.
- BERGER, R. G. **Aroma Biotechnology**, Berlim. Springer Verlag, 1995, 240p.
- BERGER, R. G.; DE BONT, J. A. M.; EGGINK, G.; FONSECA, M. M.; GEHRKE, M.; GROS, J. -B.; VAN KEULEN, F.; KRINGS, U.; LARROCHE, C.; LEAK, D. J. e VAN DER WERF, M. J. Biotransformations in the flavour industry, In: Current Topics in Flavour and Fragrances, Ed. Swift, K. A. D. , Kluwer Academic Publishers, Holanda, cap. 8, p. 139-170, 1999.
- BOCK, G.; BENDA, I. e SCHREIER, P. Biotransformation of linalool by *Botrytis cinerea*, **J. Food Sci.** v. 51, n.3, p.659-662, 1986.
- BOELEN, M.H., AND BOELEN, H.H. Differences in Chemical and Sensory Properties of Orange Flower and Rose Oils Obtained from Hydrodistillation and from Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction, **Perf. Flav.**, v. 22, p. 31-35, May/June, 1997. Apud: ESO

- 00 Database of Essential oils. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- BRADDOCK, R. J.; CADWALLADER, K. R., 1995, Bioconversion of citrus D-limonene. In fruits Flavours Biogenesis, Characterization, and Authentication, ed. R. L. Rouseff and M. M. Leahy. Washington DC: American Chemical Society, ACS Symposium, series 596, pp. 142-148.
- BRITISH-AMERICAN TOBACCO Co. LTD. MITCHELL, T. G.; BARNES, A. G.; JACKSON, J. S. e BEVAN, P.C. **Smoke flavor enhancing agents**. US 4441514, 1984.
- BRUNERIE, P.; BENDA, I.; BOCK, G. ; SCHREIER, P. Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 6-10, 1987.
- BUSMANN, D. & BERGER, R. G. Conversion of mircene by submerged cultured basidiomycetes; **Journal of Biotechnology**, v. 37, pp. 39-43, 1994.
- CADWALLADER, K. R.; BRADDOCK, R. J. ; PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, **J. of Food Sci.**, v.54, p. 1241-1245, 1989.
- CANHOS, V. P. Estratégia Nacional de Diversidade Biológica – Microrganismos e Biodiversidade de Solos, <http://www.bdt.fat.org.br/publicações/politica/gtt/gtt10>, 26/01/2003, 35 pp.).
- CASEY, J. e DOBB, R. Mircobial routes to aromatic aldehydes-benzaldehyde and vanilin preparation by 3 different methods using *Proteus vulgaris*, **Enz. Micro. Technol.**, v. 14, p. 739-747, 1992.
- CERTIK, M. e SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production, **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, p. 1-14, 1999.
- CHARLES, D.J., SIMON, J.E., AND WIDRLECHNER, M.P. Characterization of Essential Oil of Dill (*Anethum graveolens L.*), **J. Essent. Oil Res.**, v. 7, p.11-20, Jan/Feb, 1995. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- CHEETHAM, P. S. J. In: Handbook of enzyme biotechnology , ed. Wiseman A., Ellis Horwood Academic Publishers, Henel Hampstead, UK, 3rd ed., 1995.

- CHEETHAM, P. S. J. Combining the Technical push and the business pull for natural products. In: BERGER, R. G. *Biotechnology of Aroma Compounds*. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 1:1-49.
- COOPER, B. **Preparation of coniferylaldehyde by a microorganism**. US Patent no. 4,874,701, 1989.
- DELLACASSA, E., et al. Uruguayan Essential Oils. Part III. Composition of the Volatile Fraction of Lemon Essential Oil, **J. Essent. Oil Res.**, v. 7, p. 25-37, 1995. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <[http: www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- DEMYTTENAERE, J. C. R. e WILLEMEN, H. M. Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*, **Phytochemistry**, v. 47, n.6, 1029-1036, 1998.
- DEMYTTENAERE, J. C. R. , ADAMS, A.; VANOVERSCHELDE, J. e KIMPE, N. D. Biotransformation of (S)-(+)-linalool by *Aspergillus niger*: an investigation of the culture conditions, **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 5895-5901, 2001a.
- DEMYTTENAERE, J. C. R. , BELLEGHEM, K. V. e KIMPE, N. D. Biotransformation of (R)-(+)- AND (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening, **Phytochem.**, v. 57, p. 199-208, 2001b.
- DEVI, J. R. E BHATTACHARYYA, P.K., **Indian J. Biochem. Biophys**, v. 14, p. 359, 1977. Apud: KIESLICH, K. 1984. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Capítulo 4, p.97-125. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed.
- DHAVLIKAR, R. S.; RANGACHARI, P. N.; BHATTACHARY, P. K. Microbial transformation of terpenes IX. Pathway of Degradation of Limonene in a soil pseudomonad, **Ind. J. Biochem.**, v. 3, p. 158, 1966. Apud KIESLICH, K.; ABRAHAM, W. R.; STUMPF, B.; THEDE, B. e WAHAUSEN, P. 1986. Transformations of terpenoids In: **Progress in Essential Oil Research – Proceedings of the International Symposium on Essential Oils Ed. Brunke, E.J.** p.367-394, Walter de Gruyter, Berlin.

- DIAS, B.F.S. Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas – A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades – <http://www.bdt.fat.org.br/publicações/padct/bio/cap1/bráulio.html>, 26/01/2003.
- DUGO, G., et al. On the Genuineness of Citrus Essential Oils. Part XLIII. The Composition of the Volatile Fraction of Italian Sweet Orange Oils (*C. sinensis Osbeck*), **J. Essent. Oil Res.**, v. 6, p. 101-137, Mar/Apr, 1994. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com>>. Acesso em: 2 Março 2003.
- EICHHORN, E.; RODUIT, J. P.; SHAW, N.; HEINZMANN, K. E KIENER, A. Preparation of (S)-piperazine-2-carboxylic acid, (R)-piperazine-2-carboxylic acid, and (S)-piperidine-2-carboxylic acid by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells, **Tetrahedr. Asym.**, v. 8, p. 2533-2536, 1997.
- FARBOOD, M. I.; MORIS, J. A.; SPRECKER, M. A.; BIENKOWSKI, L. J.; MILLER, K. P. Process for preparing compositions containing unsaturated lactones, products produced thereby and organoleptic uses of said products. US Patent no. 4,946,782, 1990.
- FISCHER, F. E COOK, N. B. In: Micologia: Fundamentos e Diagnóstico, Ed. Revinter, Brasil, 337p., 2001.
- GATFIELD, I. L. Production of flavour and aroma compounds by biotechnology, **Food Technology**, p.110-123, 1988.
- GROS. B.; ASTHER, M.; CORRIEU, G.; BRUNERIE, P. **Production of vanillin by bioconversion of benzenic precursors**. EP 453,368, 1991
- HAGEDORN, S.; KAPHAMMER, B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals, **Annu.Rev. Microbiol**, v.48, p.773-800, 1994.
- HAARMANN & REIMER GmbH, A Sense of the scents, [www.haarmann-reimer.com](http://www.haarmann-reimer.com); 31/01/2003, 31 pp.)

- HOFFMANN-LA ROCHE Microbiological hydroxylation of patchouli alcohol – to give intermediates for nor-patchouli synthesis, Belg. Pat.858326, 1978.
- HOPP, R. Some highlights of H & R research. A review of nearly 120 years of research at Haarmann & Reimer. In: *Recent Developments in Flavor and Fragrance Chemistry*, ed. R. Hopp, K. Mori, New York, VCH, 1993.
- HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 7, p. 2244-2250, 1993.
- JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms, **Process Biochemistry**, v.27, p. 195-215, 1992.
- JONES, J. B.; WONG, C-H. Biocatalysis and Biotransformation. Exploiting Nature's Magic, **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 2, p.67-89, 1998.
- KIESLICH, K. Introduction In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed., 1984a. Capítulo 0, p.1-8.
- KIESLICH, K.. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed., 1984b. Capítulo 4, p.97-125
- KIESLICH, K.; ABRAHAM, W. R.; STUMPF, B.; THEDE, B. e WAHAUSEN, P. 1986. Transformations of terpenoids In: **Progress in Essential Oil Research – Proceedings of the International Symposium on Essential Oils** Ed. Brunke, E.J. p.367-394, Walter de Gruyter, Berlin.
- KIMBALL, J. W. Olfaction, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/biologypages/o/olfaction.html>, 2003
- KOIZUMI, S.; ENDO, T.; TABATA, K. e OZAKI, A. A large scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria, **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 847-850, 1998.
- KRANOSBAJEV, V. e HELMLINGER, D. **Helv. Chim. Acta**, v. 65, p. 1590, 1982. Apud: KIESLICH, K. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed., 1984. Capítulo 4, p.97-125

- KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 1-8, 1998.
- KULLA, H. G. Enzymatic hydroxylations in industrial application, **Chimia**, v. 45, p. 81-85, 1991
- LAMBASCOLO, A.; STENTELAIRE, C.; ASTHER, M. e LESAGE-MEESSEN, L. Basidiomycetes as New Biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavours for the Food industry, **Tibtech**, v.17, p. 282-289, 1999.
- LEFFINGWELL, J. C., Olfaction - Uptade no. 5, Leffingwell Report, v.2, n. 1, maio 2002, Ed. Leffingwell & Associates, [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com), 31/01/2003a)
- LEFFINGWELL, J. C., Leffingwell & Associates, Ed. Leffingwell & Associates, [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com), 18/03/2003b)
- LEUBERGERM H. G.; BOGUTH, W.; WIDMER, E. e ZELL, R. **Helv. Chim. Acta**, v. 59, p. 1832, 1976. Apud: KIESLICH, K. 1984. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Capítulo 4, p.97-125. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed.
- MADYASTHA, K. M. e MURTHY, N. S. R. K., Regiospecific hydroxylation of acyclic monoterpene alcohols by *Aspergillus niger*, **Tetrahedron Lett.**, v. 9, n. 5, p. 579-580, 1988a.
- MADYASTHA K. M. e MURTHY, N. S. R. K.. Transformations of acetates of citronellol, geraniol and linalool by *Aspergillus niger* – regioespecific hydroxylation of citronellol by a cell system . **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, n. 4/5, p. 324-329, 1988.
- MANOSROI, J.; ABEED, M. e MANOSROI, A. Biotransformation of steroidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand, **Bioresource Technology**, v. 69, p. 67-73, 1999.
- MATHEIS, G. Natural Flavors and Their Raw Materials, **DRAGOCO REPORT**, v.2, p. 43-57, 1989.
- MATHEIS, G. Aroma, Flavoring and Food from a European Perspective, **DRAGOCO REPORT** v.4, p.157-187, 1997.

- MATHEIS, G. La historia de las especias y de los aromas, **DRAGOCO REPORT**, v. 5, p.227-240, 1998.
- MATHYS, R. G.; SCHMID, A. e WITBOLT, B. Integrated two-liquid phase bioconversion and product recovery processes for the oxidation of alkanes: process design and economic evaluation, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 64, p. 450-477, 1999.
- MIKAMI, Y.; WATANABE, E.; FUKUNAGA, Y. e KISAKI, T. **J. Agric. Chem. Soc.** (Japan), v. 45, p. 368, 1978. Apud: KIESLICH, K. 1984. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Capítulo 4, p.97-125. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed.
- MIKAMI, Y.; FUKUNAGA, Y.; ARITA, M. e KISAKI, T. Microbial Transformation of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -methylionone, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 610-617, 1981.
- MIZUTANI, S.; HAYASHI, T., UEDA, H. e TATSUMI, Ch., **J. Agric. Chem. Soc.** (Japan), v. 45, p.368, 1971. Apud: KIESLICH, K. 1984. Terpenoids In: **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes**. Capítulo 4, p.97-125. Introduction. Verlag Chemie. K. Kieslich Ed.
- MOLINARI, F.; GANDOLFI, R.; ARAGOZZINI, F.; LEON, R. e PRAZERES, D. M. F. Biotransformation in two-liquid-phase systems. Production of phenylacetaldehyde by oxidation of 2-phenylketanol with acetic bacteria, **Enz. Microb. Technol.**, v. 25, p. 729-735, 1999.
- MUCCIARELLI, M., CARAMIELLO, R., MAFFEI, M., AND CHIALVA, F. Essential Oils from Some *Artemisia* Species Growing Spontaneously in North-West Italy, **Flavour Fragr. J.**, v. 10, p. 25-32, 1995. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com>>. Acesso em: 2 Março 2003.
- OHLOFF, G. Structure-Odor Relationships, In: **Scent and fragrances – the fascination of odors and their chemical perspectives**, Springer-Verlag, 1994a, cap.2, pp.9-56.
- OHLOFF, G. The chemical senses, In: **Scent and fragrances – the fascination of odors and their chemical perspectives**, Springer-Verlag, 1994b, cap.1, pp.1-8;

- ONKEN, J. Biotechnologie lipophiler substrate in waßriger systemen: terpenentransformationen durch basidiomycetin ws. Mode, Tese de Doutorado, Hannover/Alemanha, 12/junho, 1998.
- ONKEN, J.; BERGER, R. G. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor, **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 158-163, 1999a.
- ONKEN, J.; BERGER, R. G. Effects of (R)-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*, **Journal of Biotechnology**, v. 69, n.2-3, p. 163-168, 1999b.
- PERFURMER e FLAVORIST, Flavor & Fragrance – State of the industry, **Perfurmer & Flavorist**, v. 26, Jul/Aug., p. 29-33, 2001.
- PELCZAR, M. J. Jr.; CHAN, E. C. S. e KRIEG, N. R. In: **Microbiology: Concepts and Applications** 896 p., McGraw-Hill, Inc. USA, 1993.
- PICKENHAGEN, W. Flavour Chemistry – The last 30 years, In: **Flavour Chemistry: 30 Years of Progress**, Ed. Teranishi et al., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999.
- PINHEIRO, D. M. & PASTORE, G. M. Produção Biotecnológica de Compostos de Aromas In: **Aroma e Sabor dos Alimentos: Temas Atuais**, Ed. Varela, 2003, in press)
- PINO J., BORGES P.; RONCAL E. The chemical composition of laurel leaf oil from various origins, **Nahrung**, v. 37, p.592-595, 1993. Apud: **ESO 00 Database of Essential oils**. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- POTTER, T.L., Essential Oil Composition of Cilantro (commercial sample A), **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 1824-1826, 1996. Apud: **ESO 00 Database of Essential oils**. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- QUINESSENCE AROMATHERAPY, [www.quinessence.com/oil-specifications.htm](http://www.quinessence.com/oil-specifications.htm), junho, 2001.

- RABEN, J. e HOPP, R. **Process for the preparation of vanillin**. US Patent no. 5,017,388, 1991
- RAMADEVI, J. e BHATTACHARYYA, P.K. Microbiological transformations of terpenes. 24. Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol and limonene by *Pseudomonas incognita* (linalool strain), *Indian. J. Biochem. Bio.*, v. 14, n. 4, p. 359-363, 1977
- RAPP, A. e MANDERY, H. In **Bioflavour '87, Analysis-biochemistry-biotechnology**, ed. Schreier, P. Walter de Gruyter, Berlim, 1988, p.445.
- REIPA, V.; RODUIT, J. -P.; SHAW, N. e VILKER, V. L. A. A direct electrode driven P450 cycle for biocatalysis, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 13554-13558, 1997.
- ROSAZZA, J. P. N.; STEFFENS, J. J.; SARIASLANI, F. S.; GOSWAMI, A.; BEALE, J. M.; REEG, S. e CHAPMAN, R. Microbial Hydroxylation of 1,4-cineole, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 10, p. 2842-2846, 1987.
- SCHILCHER, H., EMMRICH, D., AND KOEHLER, C., Gas Chromatographischer Vergleich von aetherischen Wacholderoelen und deren toxikologische Bewertung, **Pharm. Ztg., Wiss.**, v. 138, n. 3/4, p.85-91, 1993. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com>>. Acesso em: 2 Março 2003.
- SCHINDLER, J. e SCHMID, R. D. Fragrance or aroma chemicals – microbial synthesis and enzymatic transformation – a review, **Process Biochem.**, p. 2-8, Sept./Oct., 1982.
- SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M. E WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, **Nature**, v.109, p.258-268, 2001.
- SHIMIZU, J.; UEHARA, M. e WATANABE, M. Transformation of Terpenoids in grape must by *Botrytis cinerea*, **Agric. Biol. Chem.**, v. 46, n.5, p.1339-1344, 1982.
- SHIMONEI, E.; RAVID, U. e SHIHAM, Y. Isolation of a Bacillus sp. Capable of transforming isoeugenol to vanilin, **J. Biotechnology**, v. 78, p. 1-98, 2000.
- SOMOGY, L. P. Chem. and Ind., p.170, 1996. Apud: BERGER, R. G. **Biotechnology of Aroma Compounds**. Berlim: Springer-Verlag, 1997, p. 1-49.

- SIDDIQUI, N., AND GARG, S.C. Chemical Composition of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *Martinii*, **J. Essent. Oil Res.**, v. 2, p. 93-94, Mar/Apr., 1990. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com>>. Acesso em: 2 Março 2003.
- SOUTHWELL, I.A., STIFF, I.A., AND CURTIS, A. An Australian Geranium Oil, **Perf. Flav.**, v. 20, p.11-14, July/August, 1995. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <<http://www.leffingwell.com>>. Acesso em: 2 Março 2003.
- SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A. e EGGINK, G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, peillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 538-544, 1998.
- STALEY, J. Sistema de informação sobre biodiversidade/biotecnologia para o desenvolvimento sustentável – A Diversidade Microbiológica e a Biosfera - <http://www.bdt.fat.org.br/oea/sib/staley>, 26/01/2003, 8 pp.
- SUHARTA, Y.; ITOH, S.; OGAWA, M.; SAWADA, T.; SANO, T.; NIMIYA, R. e MARUYAMA, H. B.Regio-selective 10-hydroxylation of patchoulol, a sesquiterpene by *Pitomyces* sp., **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 42, p. 187-191, 1981.
- TAN, Q., DAY, D. F. , CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)- (+)-limonene by *P. digitatum*, **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 29-37, 1997.
- TAN, Q.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202), **Process Biochemistry**, v.33, n. 1, p. 29-37, 1998.
- TAN, Q. & DAY, D. F. Bioconversion of limonene to  $\alpha$ -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p.96-101, 1998.
- TRONSON. D. The odour, the animal and the plant, **Molecules**, v. 6, p.104-116, 2001.
- VAN DER WERF, M.; DE BONT, J.A.M.; LEAK, D.J. Oportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes, **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 455, p. 147-177., 1997.

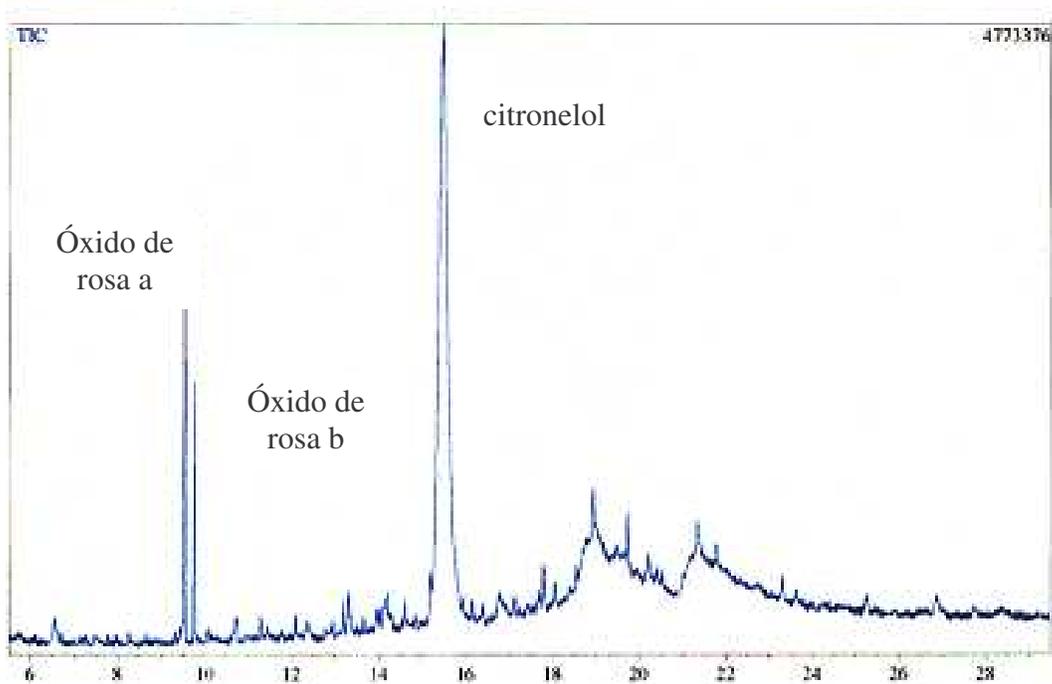
- VAN DER WERF, M.; SWARTS, H. J. e DE BONT, J.A.M.. Rhodococcus erythropolis DCL 14 contain a novel degradation pathway for limonene, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 2092-2102, 1999.
- VAN DYK, M.S.; VAN RENSBURG, E.; MOLELEKI, N. Hidroxilação de (+)Limonene, (-)- $\alpha$ -pinene and (-)- $\beta$ -pinene by a *Hormonema* sp., **Biotechnol. Lett.**, v. 20, n. 4, p.431-436, 1998.
- VAN KEULEN, F.; CORREIA, C. N.; FONSECA, N. M. R. Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*, **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 295-299, 1998.
- VAN RENSBURG, E.; MOLELEKI, N.; VAN DER WALT, J. P.; BOTES, P. J.; VAN DYK, M. S. Biotransformation of (+)-limonene and (-)-piperitone by yeast and yeast-like fungi, **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 8, p. 779-782, 1997.
- VASIC-RACKI, D. History of industrial Biotransformations – Dreams and Realities, **In: Industrial Biotransformations**, Ed. Liese, A.; Seelbach, K. & Wandrey, C.; Wiley-VCH, 2000, cap. 2, pp. 3-29
- VENSKUTONIS, P.R., DAPKEVICIUS, A., AND VAN BEEK, T.A. Essential Oils of Fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*) from Lithuania (essential oil from flowering parts), **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 211-213, Mar/Apr, 1996. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- VENSKUTONIS, P.R., DAPKEVICIUS, A., AND BARANAUSKIENE, M. Composition of the Essential Oil of Lavender (*Lavandula angustifolia Mill.*) from Lithuania, **J. Essent. Oil Res.**, v. 9, p.107-110, Jan/Feb, 1997. Apud: ESO 00 Database of Essential oils. Disponível em: <http: [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)>. Acesso em: 2 Março 2003.
- WASHISU, Y.; TETSUSHI, A.; HASHIMOTO, N.; KANISAWA, T. Manufacture of vanilin and related compounds with *Pseudomonas*, JP Patent 5227980, 1993.
- WELSH, F. W.; MURRAY, W.D.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and Enzymatic Production of Flavour and Fragrance Chemicals, **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 9, p. 105-169, 1989.

WIESER, M.; HEINZMANN, K. E KIENER, A. Bioconversion of 2-cyanopyrazine to 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid with *Agrobacterium* sp. DSM 6336, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.48, p. 174-176, 1997.

YAMAGUCHI, Y.; KOMATSU, A. e MOORE, T. Microbial transformation of odorous compounds I. Microbial reduction of d,l-citronellal, **J. Agric. Chem. Soc. Japan.**, v. 50, p. 443-445, 1976.

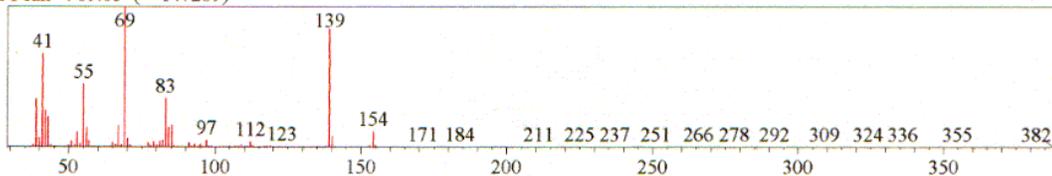
## 8. ANEXOS

Sample : dems5  
ID : dems5  
Sample Amount : 0  
Operator : gnele  
Method File Name : DEMISE.MET

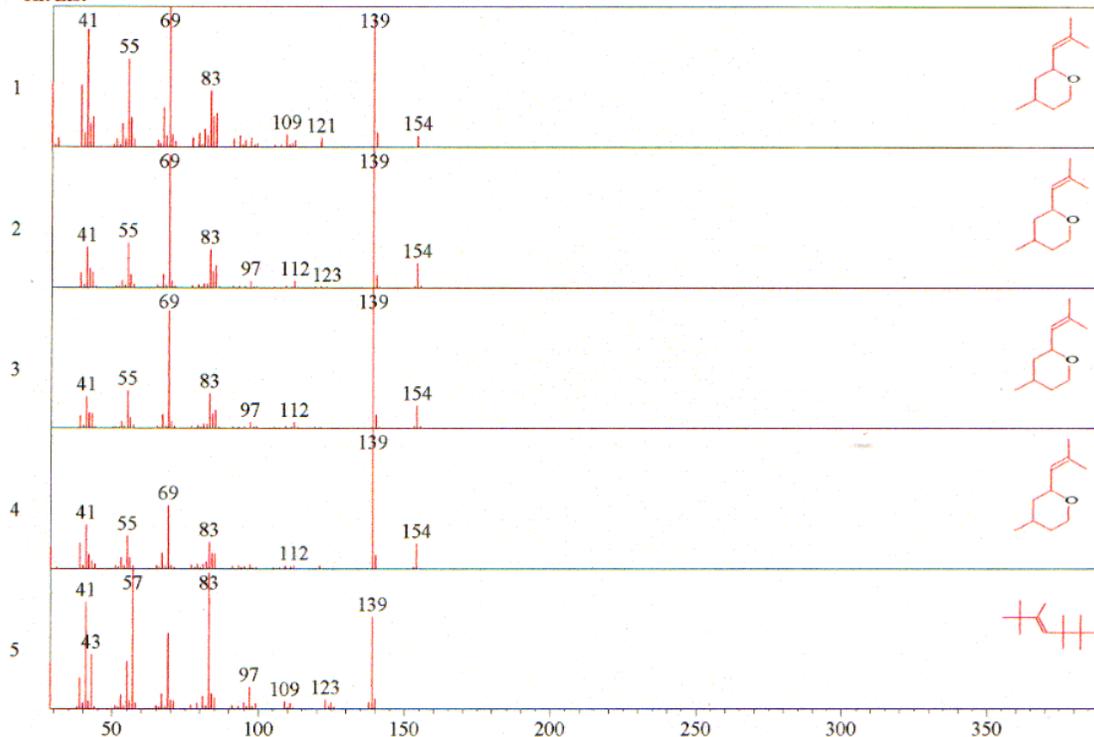


**Anexo I.** Cromatograma da linhagem LB-2080 (isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citronelol (14,23-15,89 minutos) (c)).

<Unknown Spectrum>  
 Data : DENIS5.D00  
 Mass Peak # : 166 Ret. Time : ( 9.492 - 9.600 )  
 Scan # : ( 480 - 493 ) B.G. Scan # : ( 490 - 491 )  
 Base Peak : 69.05 ( 147269)



<Hit List>



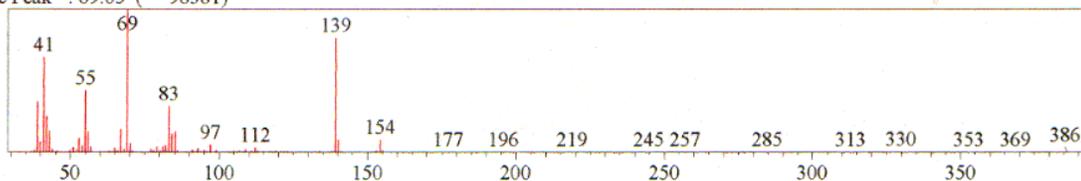
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	91	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	10932	2
2	91	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4884	1
3	88	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4885	1
4	86	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4883	1
5	81	196	C <sub>28</sub> 3-Heptene, 2,2,3,5,5,6,6-heptamethyl-	54845-26-0	7291	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

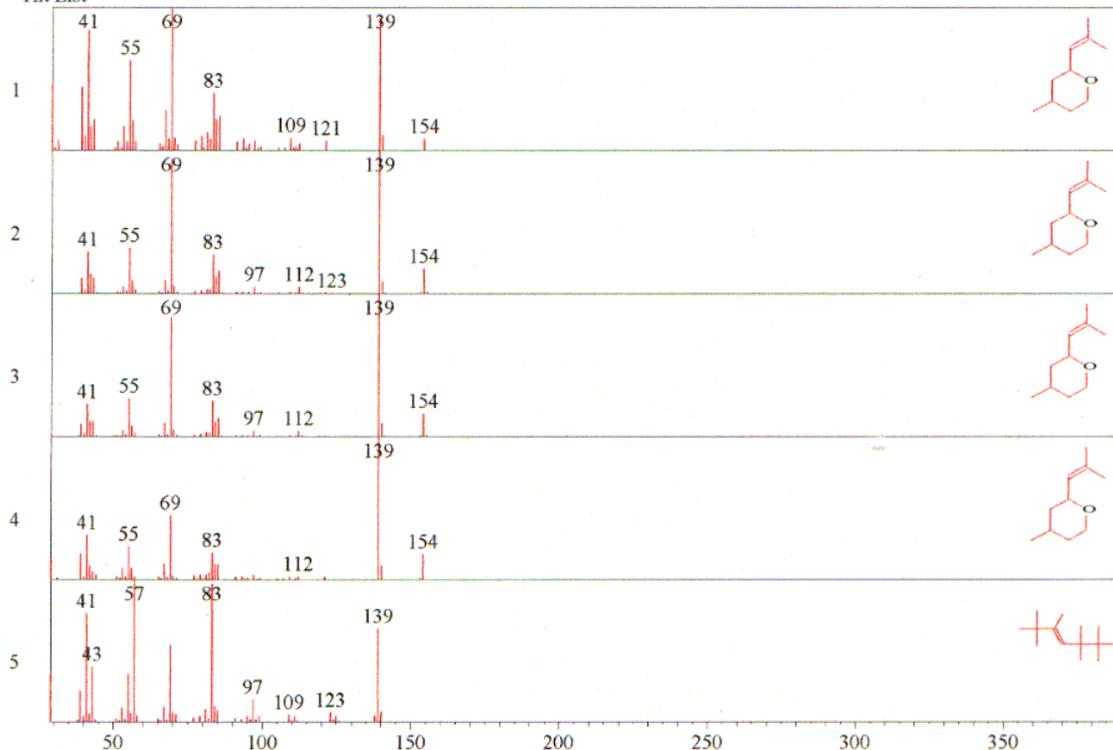
(a)

**Anexo II.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da linhagem LB-2080, isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citrionelol (14,23-15,89 minutos) (c).

<Unknown Spectrum>  
 Data : DENIS5.D00  
 Mass Peak # : 169 Ret. Time : ( 9.708 - 9.808 )  
 Scan # : ( 506 - 518 ) B.G. Scan # : ( 517 - 518 )  
 Base Peak : 69.05 ( 98381)



<Hit List>



No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	91	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	10932	2
2	91	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4884	1
3	89	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4885	1
4	87	154	O <sub>3</sub> 2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	16409-43-1	4883	1
5	81	196	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> 3-Heptene, 2,2,3,5,5,6,6-heptamethyl-	54845-26-0	7291	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

(b)

**Anexo II.** Espectros de massa referentes à análise cromatograma da linhagem LB-2080, isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citrionelol (14,23-15,89 minutos) (c) (continuação).

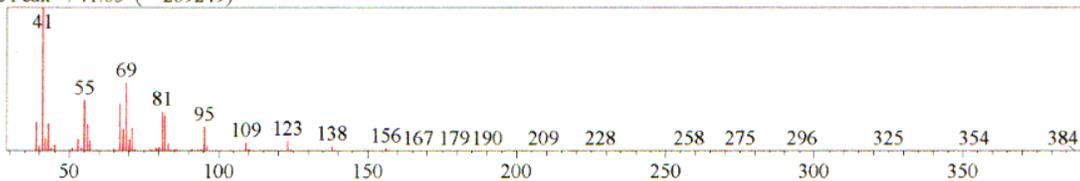
<Unknown Spectrum>

Data : DENIS5.D00

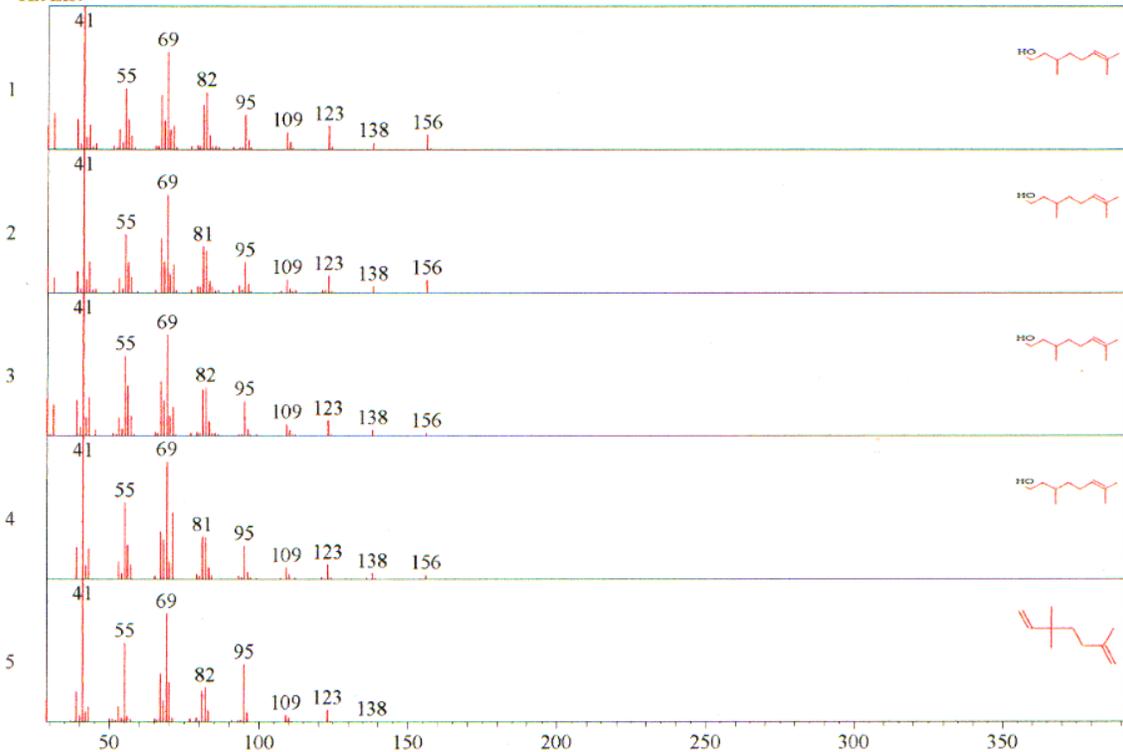
Mass Peak # : 255 Ret. Time : ( 15.225 - 15.892 )

Scan # : ( 1168 - 1248 ) B.G. Scan # : ( 1234 - 1239 )

Base Peak : 41.05 ( 269249)



<Hit List>



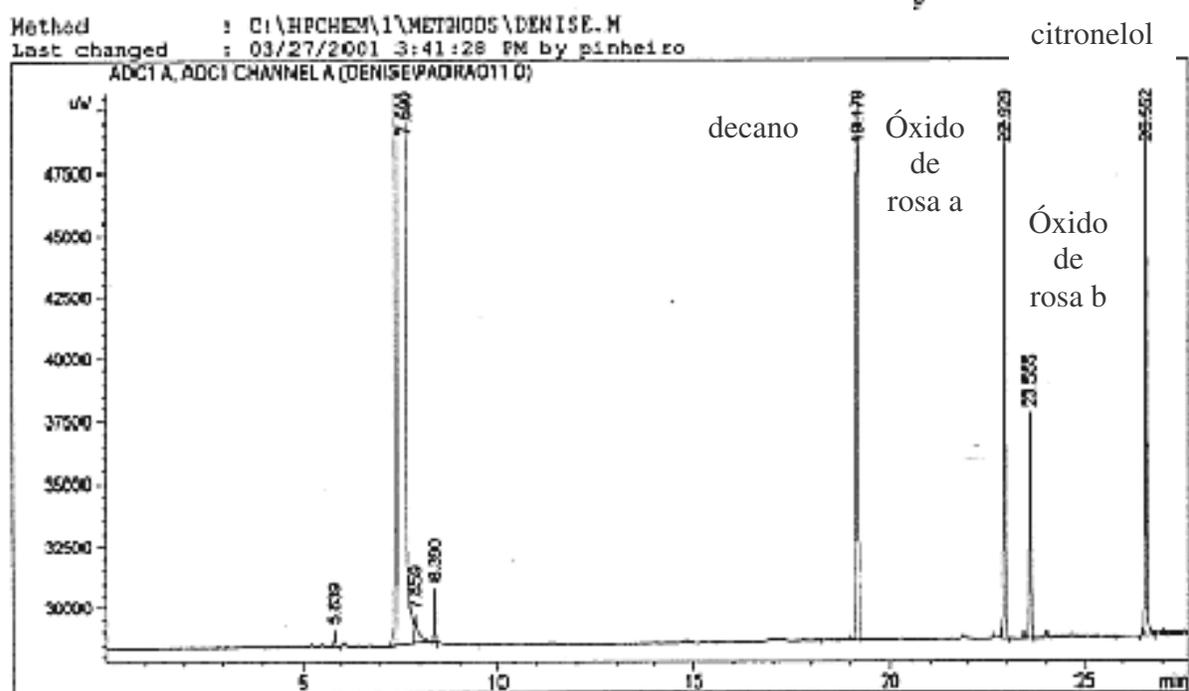
No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	93	156	O <sub>3</sub> 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-	106-22-9	5073	1
2	93	156	O <sub>3</sub> 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-	106-22-9	5074	1
3	92	156	O <sub>3</sub> 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl- \$\$ .beta.-Citronellol \$\$ Cephrol \$\$ Citronellol \$\$ Rodino	106-22-9	11594	2
4	90	156	O <sub>3</sub> 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-	106-22-9	5076	1
5	90	138	18 1,6-Heptadiene, 2,5,5-trimethyl-	62238-28-2	7059	2

Library Name

(1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

(c)

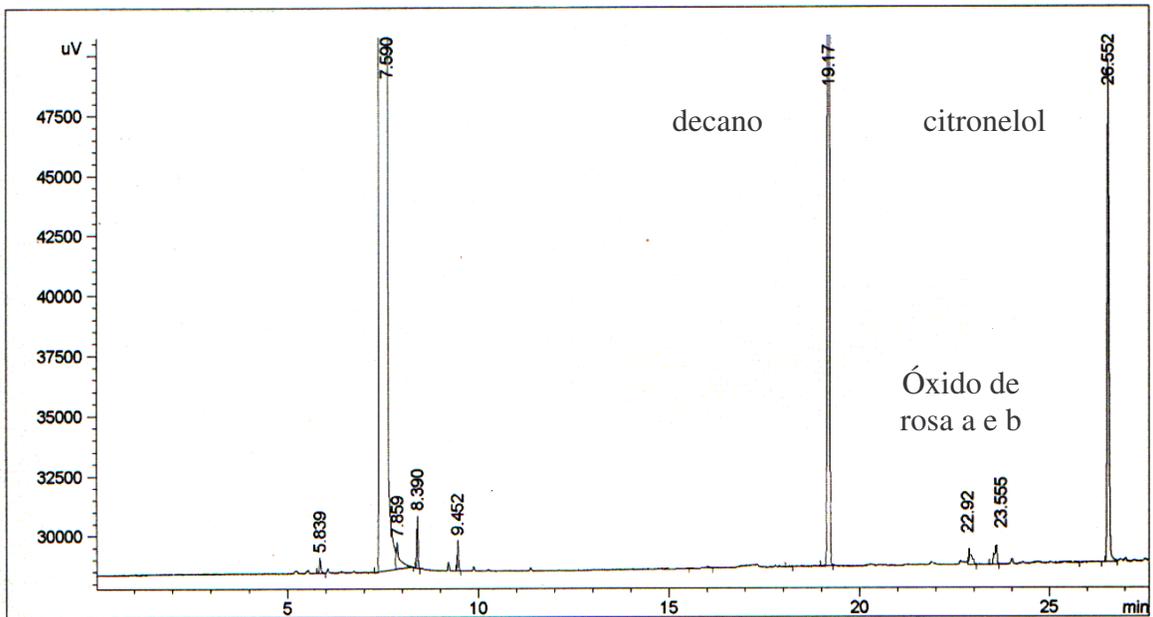
**Anexo II.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da linhagem LB-2080, isômeros do óxido de rosa (9,49-9,6 minutos; 9,71-9,81 minutos) (a e b) e o citronelol (14,23-15,89 minutos) (c) (continuação).



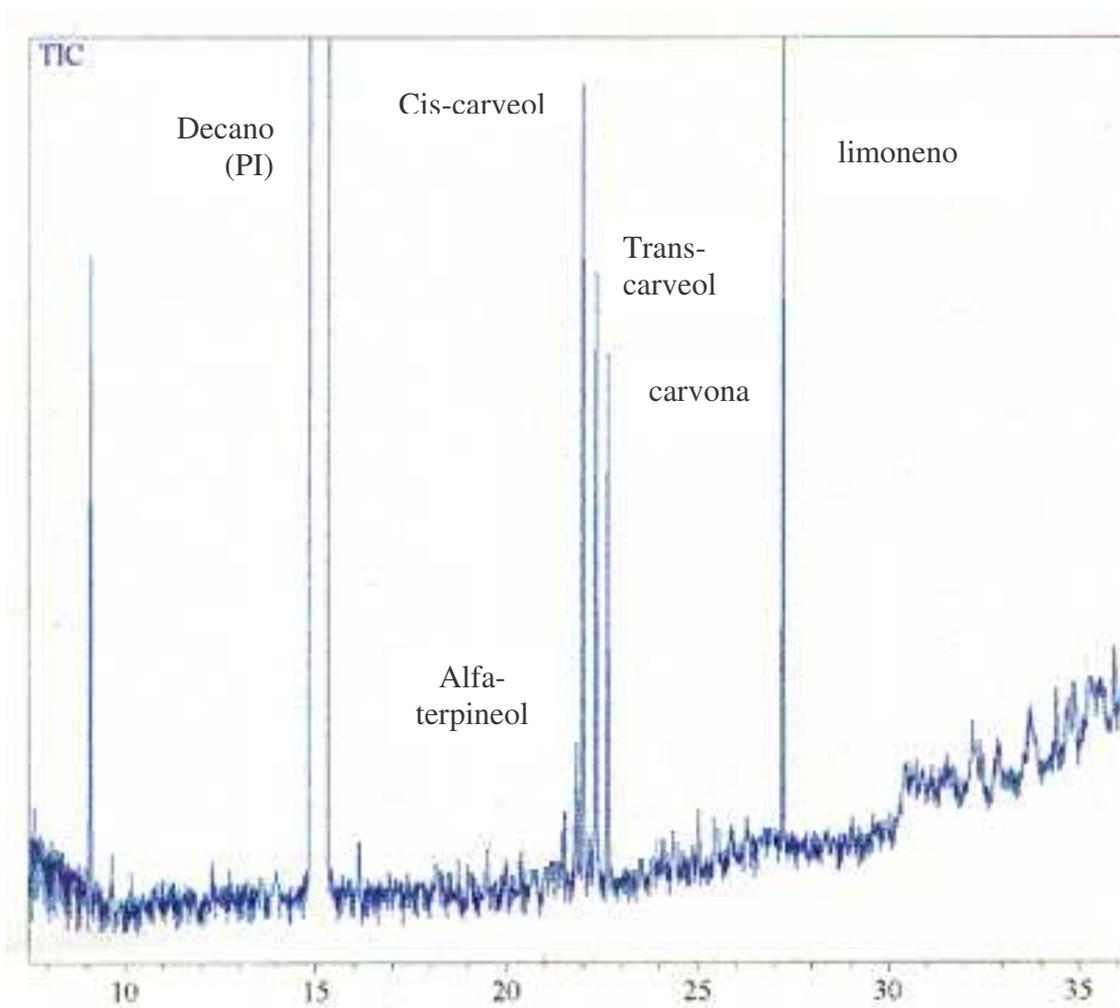
**Anexo III.** Cromatograma do padrão de óxido de rosa (tempo de retenção de 22,929 e 23,555 min.), citronelol (tempo de retenção de 26,552min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,179 min.)

Injection Date : 03/31/2001

Location : Vial 1

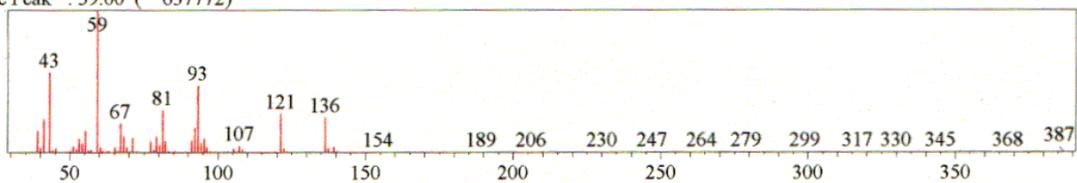


**Anexo IV.** Cromatograma do experimento controle com citronelol e sem o microrganismo: óxido de rosa (tempo de retenção de 22,929 e 23,555 min.), citronelol (tempo de retenção de 26,552min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,179 min.)

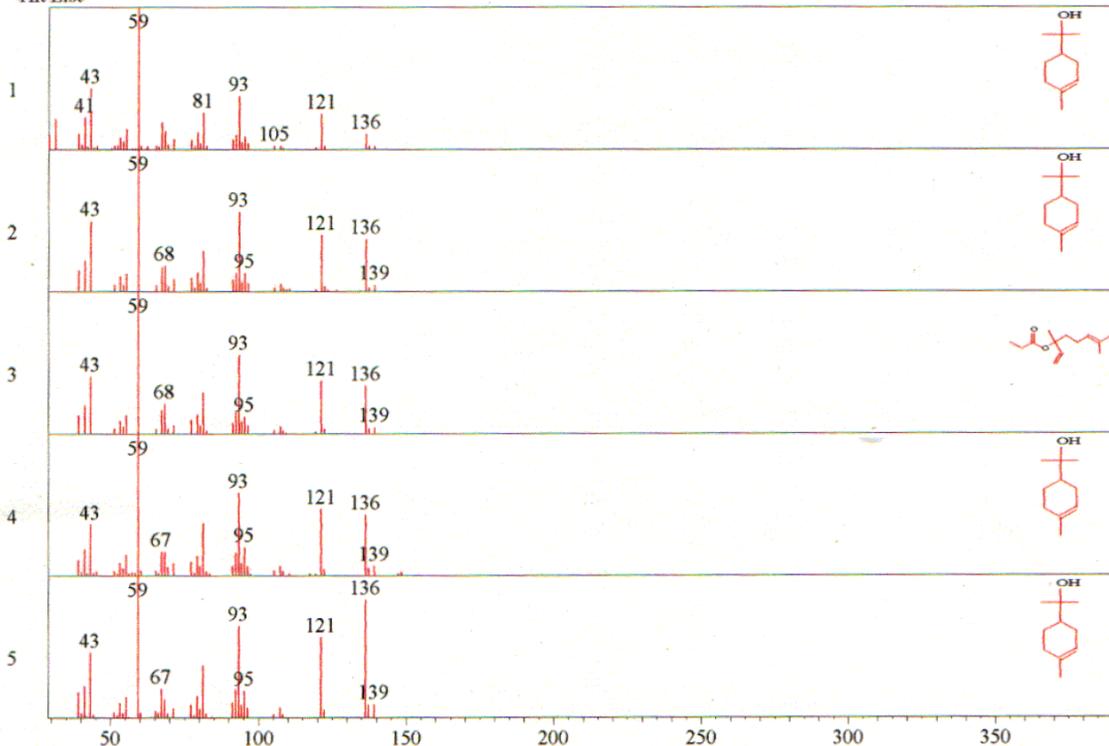


**Anexo V.** Cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038 (alfa-terpineol: 21,1-21,3 minutos, isômeros do carveol: 21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos, carvona: 22,6-22,7 minutos, e o limoneno: 27,5-27,7 minutos).

Mass Peak # : 223 Ret. Time : ( 21.100 - 21.292 )  
 Scan # : ( 1633 - 1656 ) B.G. Scan # : ( 1631 - 1638 )  
 Base Peak : 59.00 ( 637772 )



<Hit List>



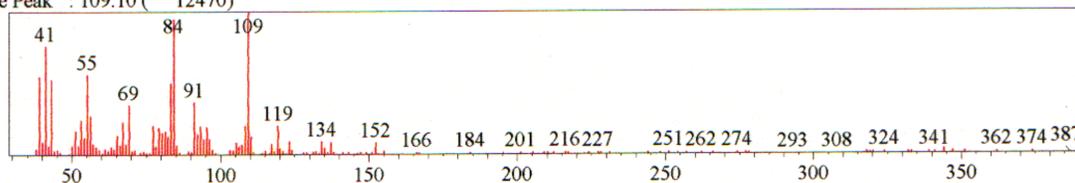
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	95	154	O <sub>3</sub> 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha.,alpha.4-trimethyl- \$\$ p-Menth-1-en-8-ol \$\$ .alpha.	98-55-5	11024	2
2	93	154	O <sub>3</sub> 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha.,alpha.4-trimethyl-	98-55-5	4946	1
3	93	210	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> Linalyl propanoate	- -0	25374	2
4	92	154	O <sub>3</sub> 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha.,alpha.4-trimethyl-, (S)- \$\$ p-Menth-1-en-8-ol, (S	10482-56-1	10948	2
5	91	154	O <sub>3</sub> 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha.,alpha.4-trimethyl-	98-55-5	4945	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

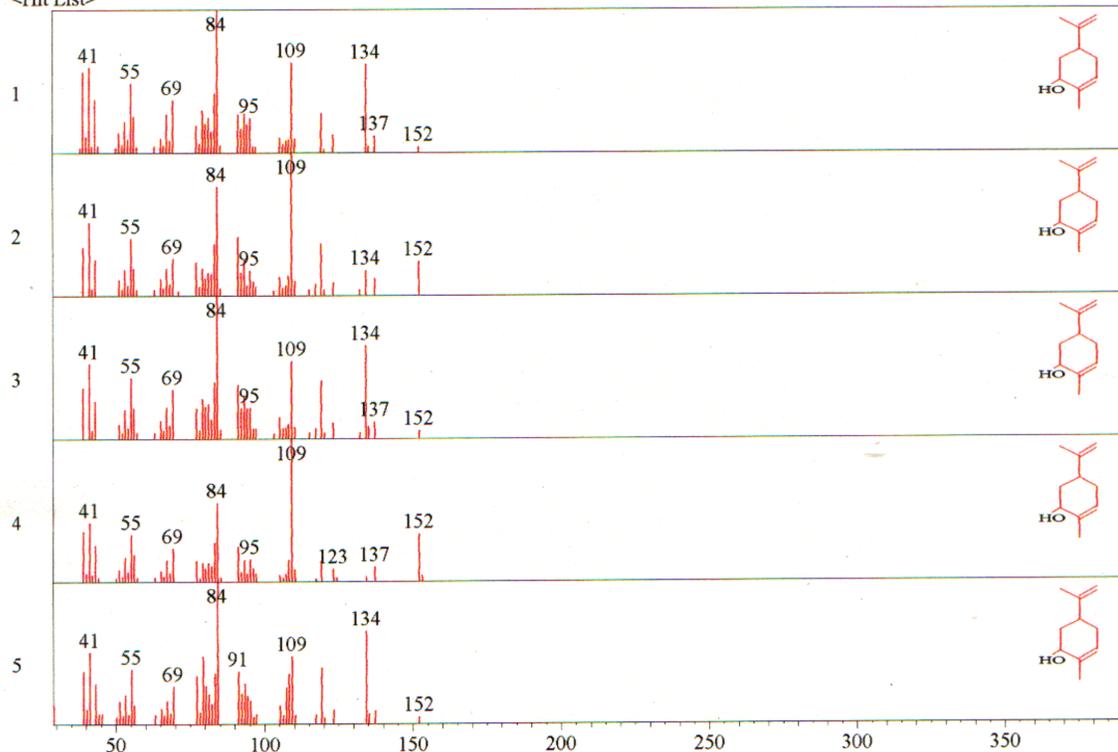
(a)

**Anexo VI.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e).

Mass Peak # : 193 Ret. Time : ( 21.917 - 22.025 )  
 Scan # : ( 1731 - 1744 ) B.G. Scan # : ( 1725 - 1739 )  
 Base Peak : 109.10 ( 12470 )



<Hit List>



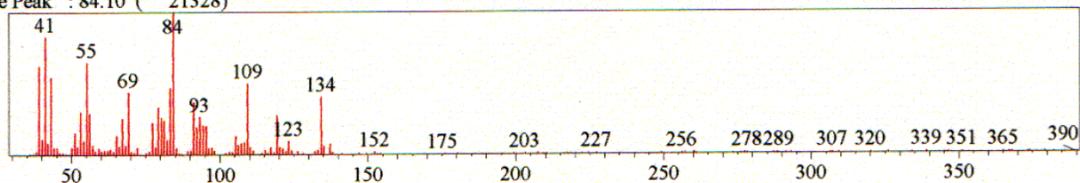
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	92	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	1197-06-4	4701	1
2	91	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-	1197-07-5	4707	1
3	89	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	1197-06-4	4700	1
4	88	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-	1197-07-5	4708	1
5	87	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis- \$ p-Mentha-6,8-dien-2-ol, cis	1197-06-4	10296	2

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

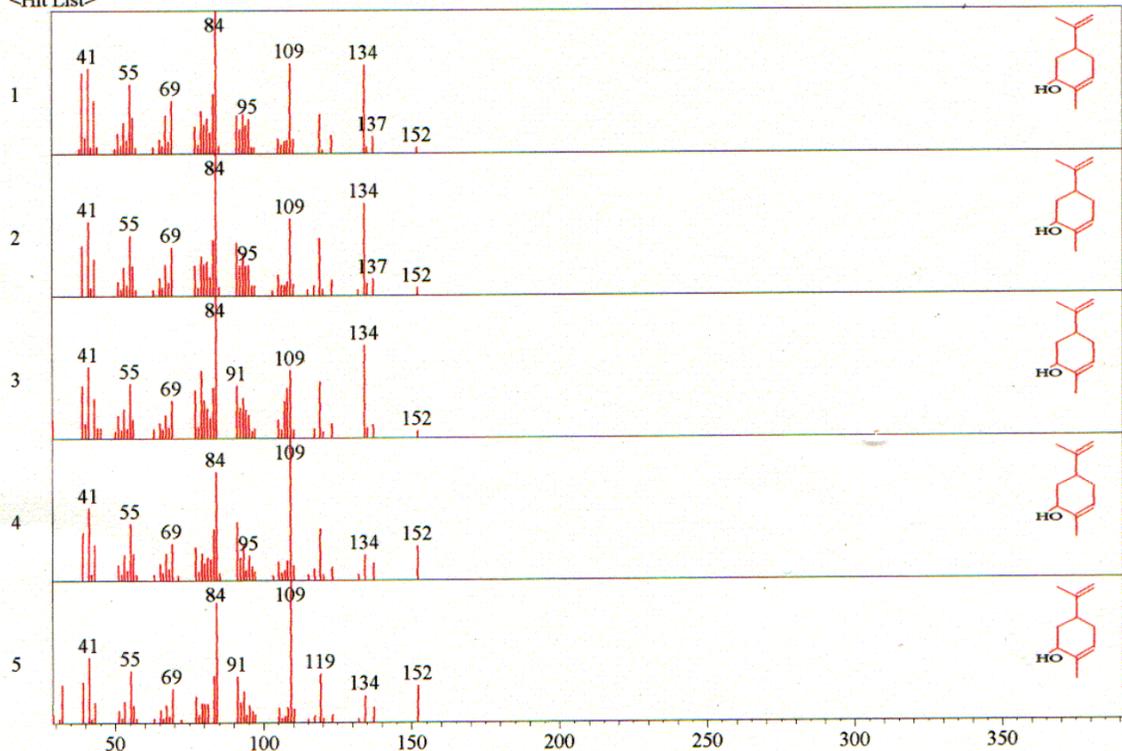
(b)

**Anexo VI.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e) (continuação).

Mass Peak # : 170 Ret. Time : ( 22.250 - 22.367 )  
 Scan # : ( 1771 - 1785 ) B.G. Scan # : ( 1769 - 1777 )  
 Base Peak : 84.10 ( 21328)



<Hit List>



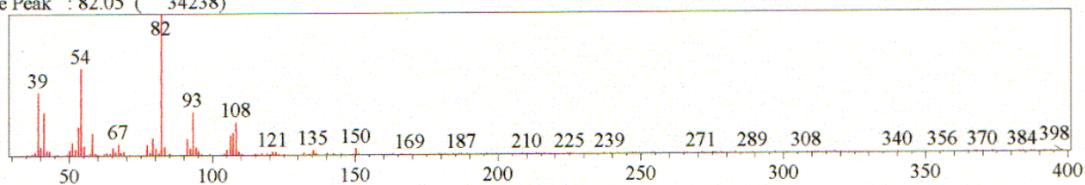
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	94	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	1197-06-4	4701	1
2	91	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	1197-06-4	4700	1
3	90	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis- \$ p-Mentha-6,8-dien-2-ol, cis	1197-06-4	10296	2
4	86	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-	1197-07-5	4707	1
5	82	152	O <sub>5</sub> 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans- \$ p-Mentha-6,8-dien-2-ol, t	1197-07-5	10302	2

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

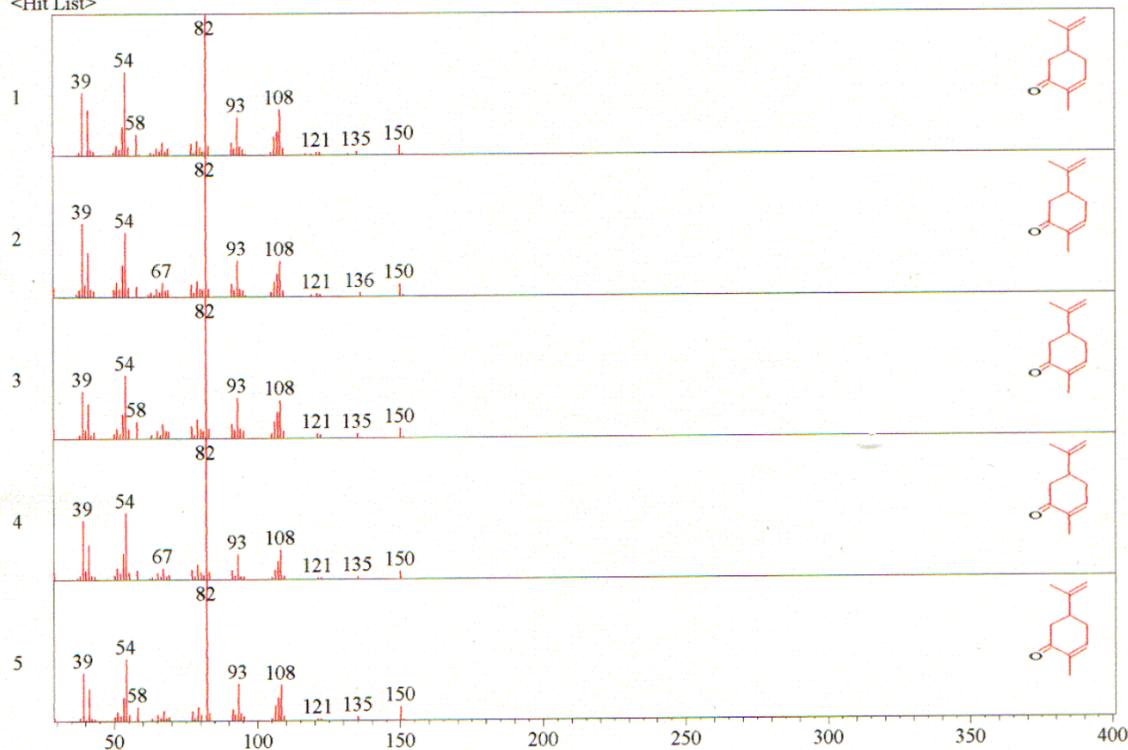
(c)

**Anexo VI.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e) (continuação).

Mass Peak #: 177 Ret. Time: ( 22.558 - 22.675 )  
 Scan #: ( 1808 - 1822 ) B.G. Scan #: ( 1806 - 1814 )  
 Base Peak: 82.05 ( 34238 )



<Hit List>



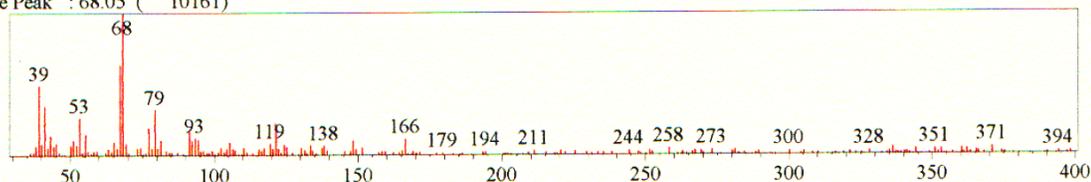
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	96	150	O <sub>1</sub> 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)- \$\$ p-Mentha-6,8-dien-2-one, (	2244-16-8	9801	2
2	94	150	O <sub>1</sub> 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-	99-49-0	4571	1
3	94	150	O <sub>1</sub> 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)-	2244-16-8	4553	1
4	94	150	O <sub>1</sub> 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (R)- \$\$ p-Mentha-6,8-dien-2-one, (	6485-40-1	9836	2
5	94	150	O <sub>1</sub> 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)- \$\$ p-Mentha-6,8-dien-2-one \$\$ Carvo	99-49-0	9840	2

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

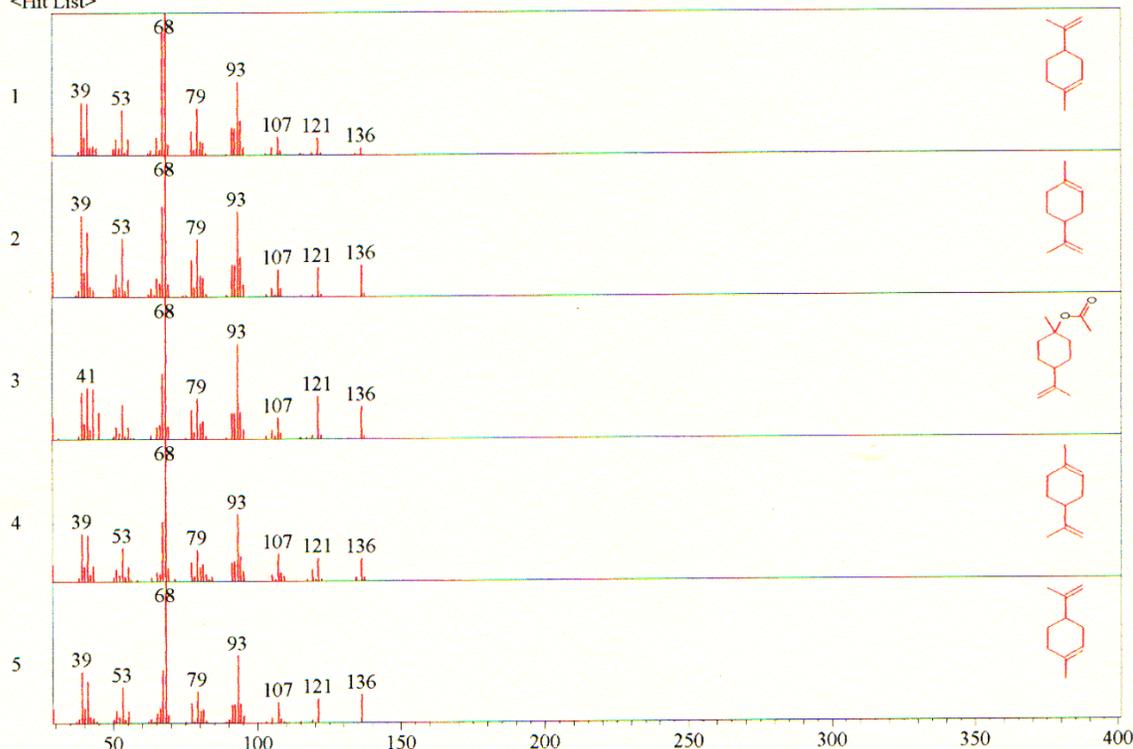
(d)

**Anexo VI.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e) (continuação).

Mass Peak #: 226 Ret. Time: ( 27.492 - 27.658 )  
 Scan #: ( 2400 - 2420 ) B.G. Scan #: ( 2400 - 2407 )  
 Base Peak: 68.05 ( 10161 )



<Hit List>

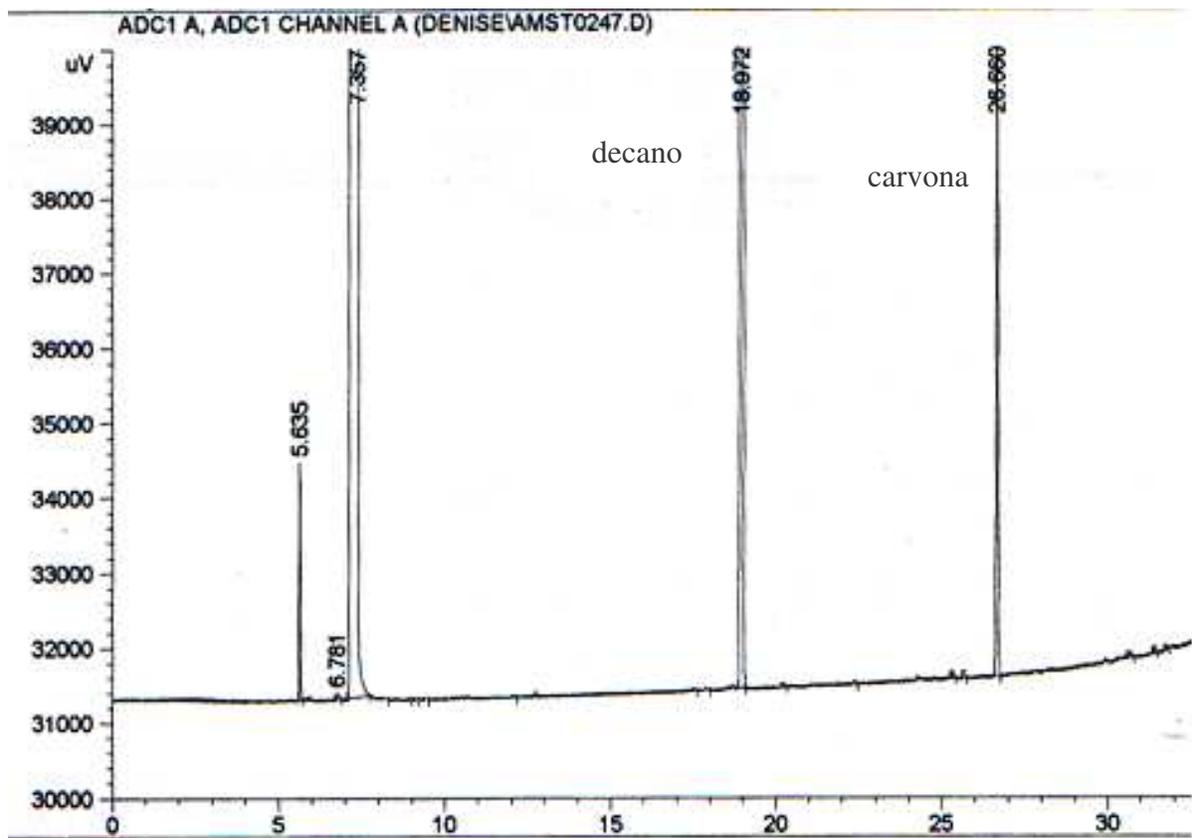


No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	82	136	$\bar{16}$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (S)-	5989-54-8	3571	1
2	80	136	$\bar{16}$ Limonene \$\$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- \$\$ p-Mentha-1,8-diene \$\$ .alph	138-86-3	6647	2
3	80	196	2) Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, acetate \$\$ p-Menth-8-en-1-ol, acetate \$\$	10198-23-9	21899	2
4	78	136	$\bar{16}$ Limonene	138-86-3	3539	1
5	78	136	$\bar{16}$ D-Limonene	5989-27-5	3554	1

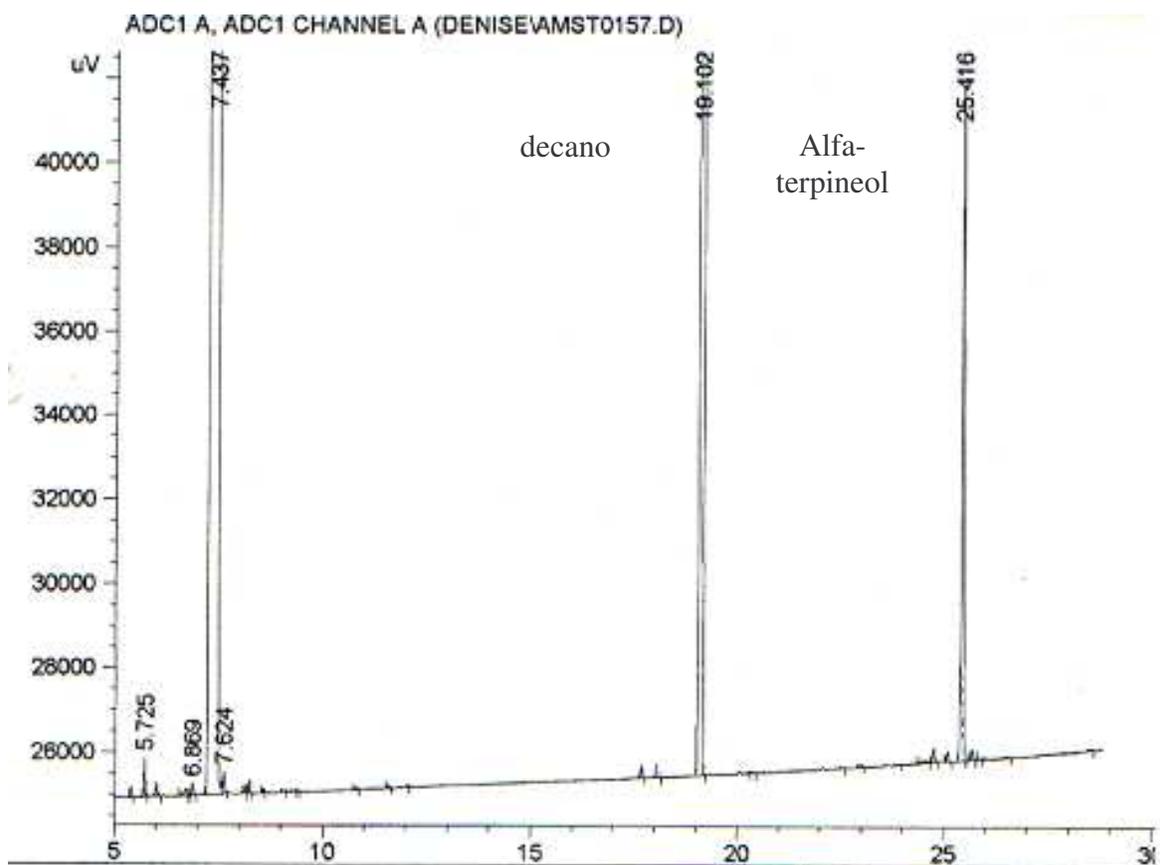
Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

(e)

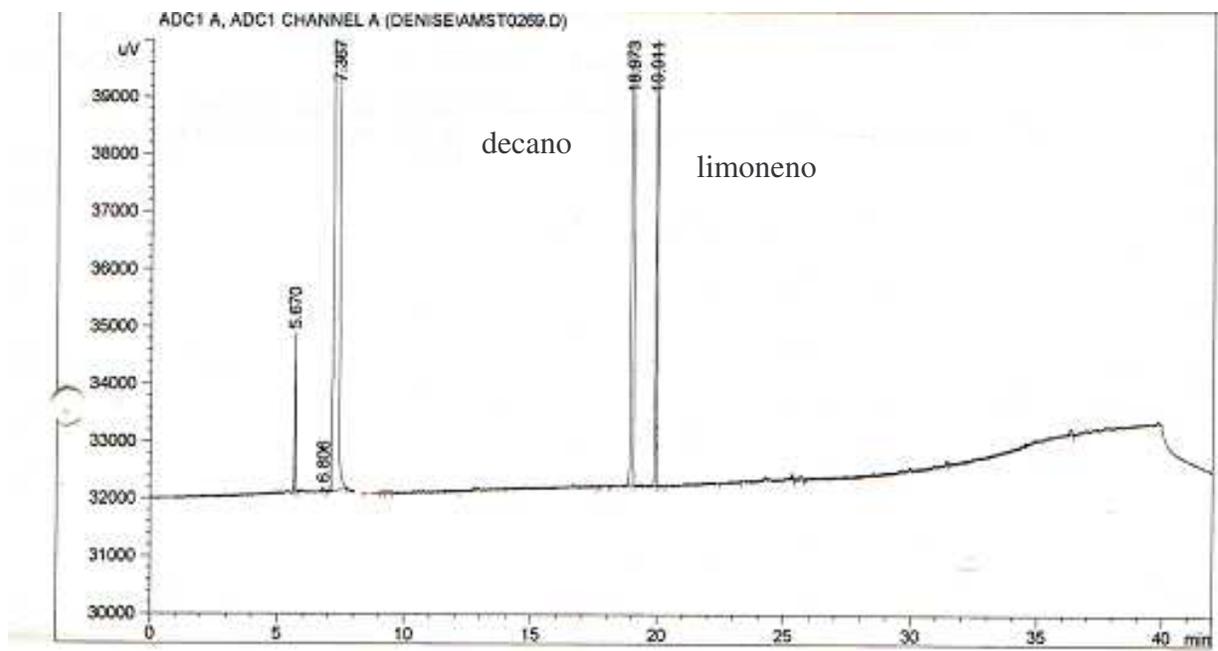
**Anexo VI.** Espectros de massa referentes à análise do cromatograma da biotransformação do limoneno pela linhagem LB-2038: alfa-terpineol (21,1-21,3 minutos) (a), cis-/trans-carveol (21,92-22,0 minutos e 22,25- 22,37 minutos) (b e c), carvona (22,6-22,7 minutos) (d) e o limoneno (27,5-27,7 minutos) (e) (continuação).



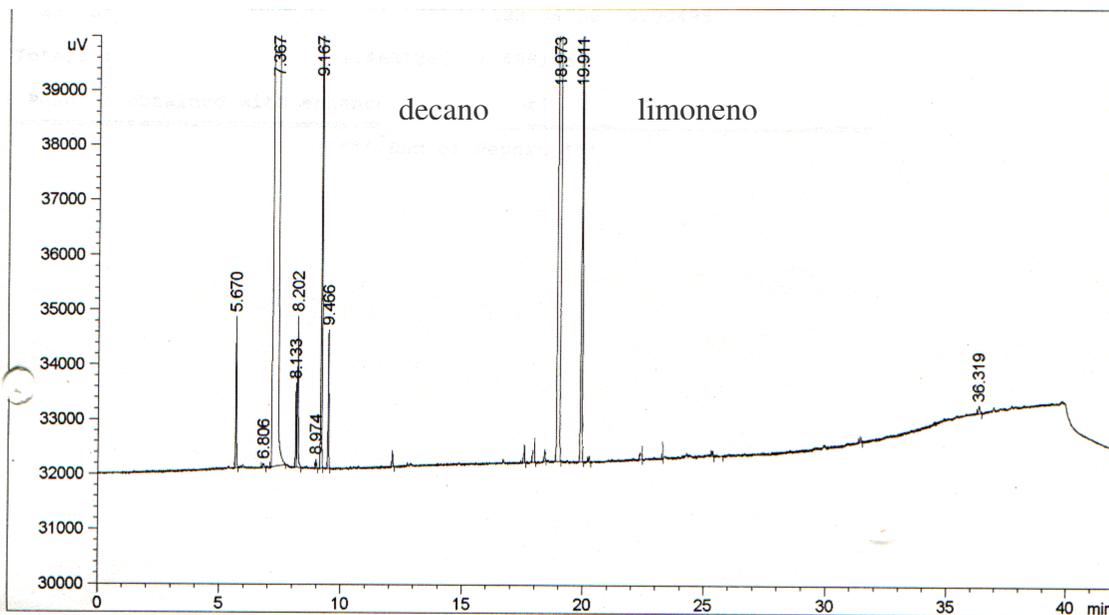
**Anexo VII.** Cromatograma do padrão de carvona (tempo de retenção de 26,660 min.) e padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,972 min.).



**Anexo VIII.** Cromatograma do padrão de alfa-terpineol (tempo de retenção de 25,416min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 19,102min.).



**Anexo IX.** Cromatograma do padrão de limoneno (tempo de retenção de 19,911 min.) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,873min.).



**Anexo X.** Cromatograma da biotransformação do limoneno na ausência de microrganismo: limoneno (tempo de retenção de 19,9 min.) e padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,8 min.).

\*\*\* CLASS-5000 \*\*\* Report No. = | Data : GER25.D00 01/04/26 19:38:19

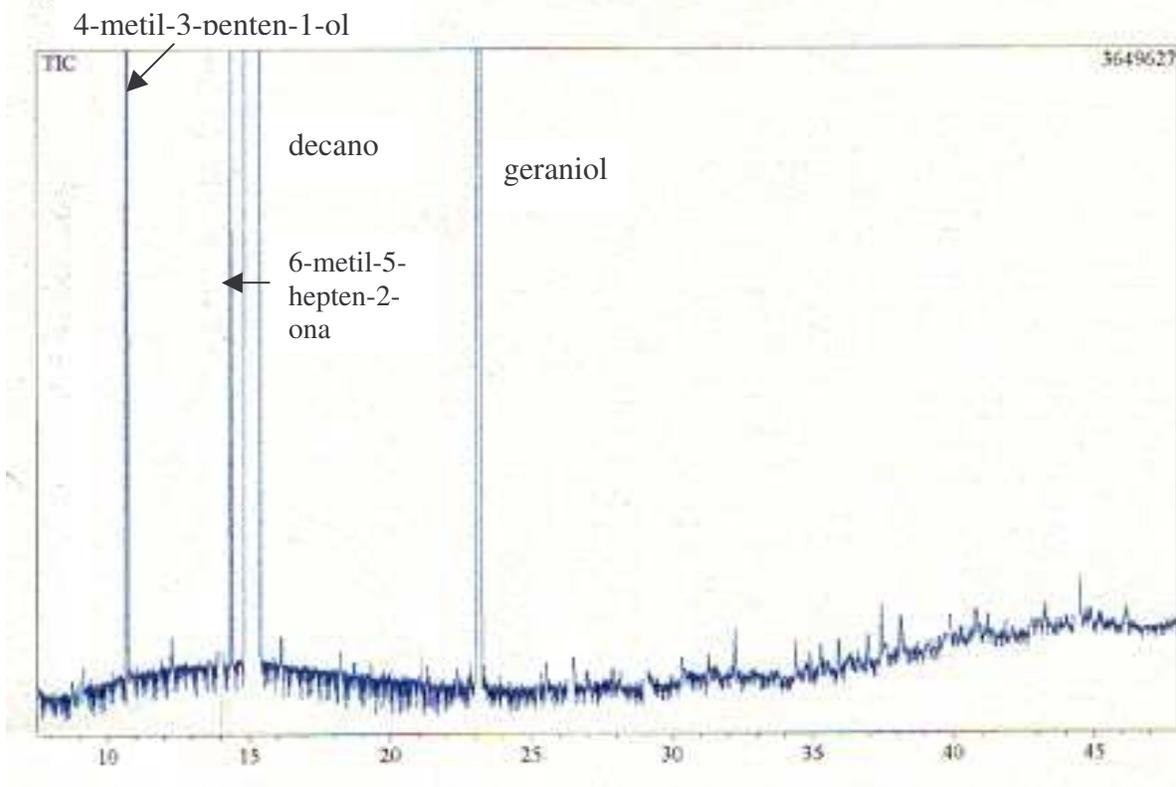
Sample : geraniol

ID : 25 13/3

Sample Amount : 0

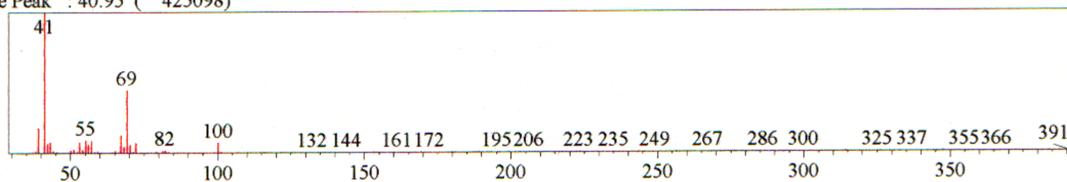
Operator : gisela

Method File Name : DENISE.MET

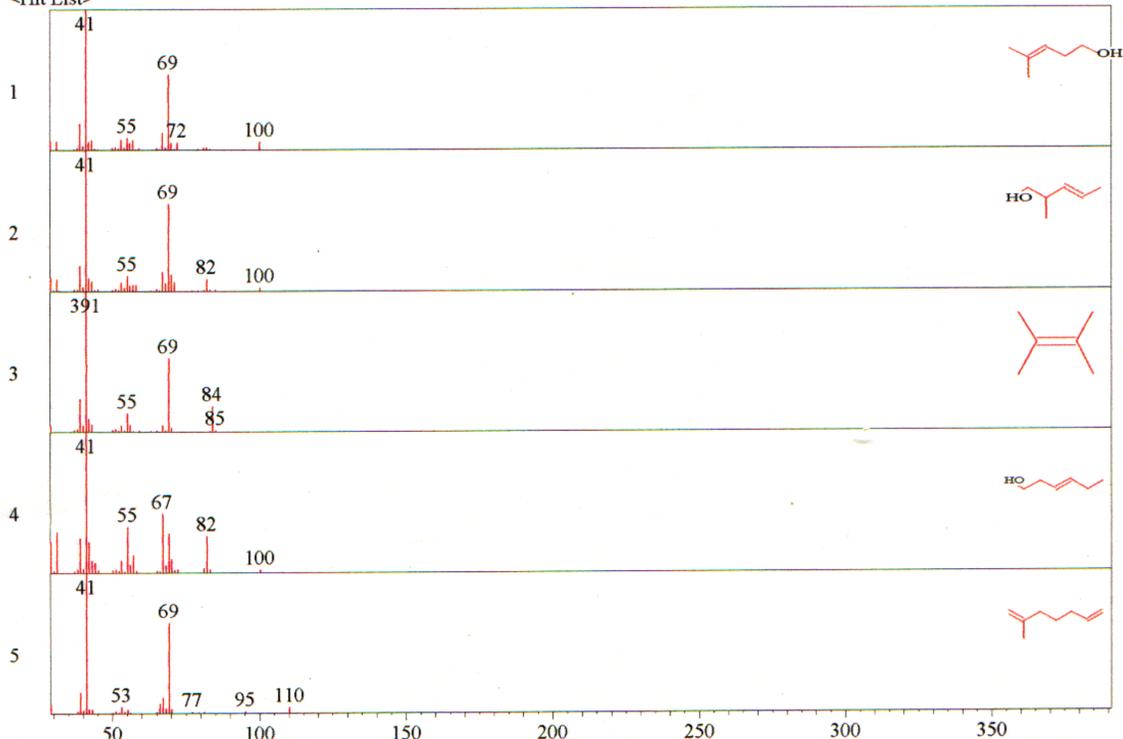


**Anexo XI.** Cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol (4-metil-3-penten-1-ol: 10,62-10,73 minutos, 6-metil-5-hepten-2-ona: 14,3-13,4 minutos e o geraniol: 23,02-23,26 minutos)).

<Unknown Spectrum>  
 Data : GER25.D00  
 Mass Peak # : 232 Ret. Time : ( 10.617 - 10.725 )  
 Scan # : ( 375 - 388 ) B.G. Scan # : ( 372 - 381 )  
 Base Peak : 40.95 ( 425098 )



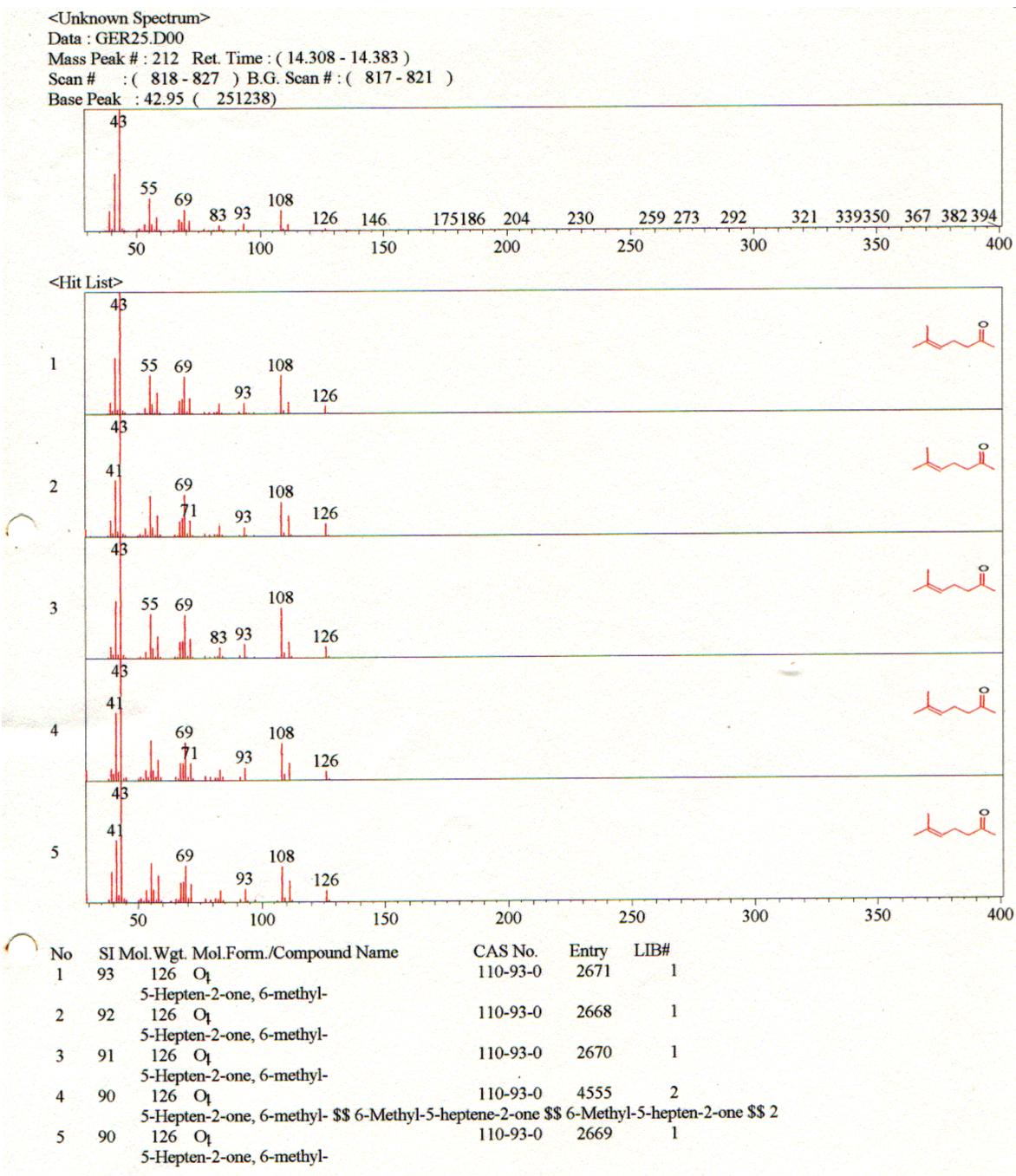
<Hit List>



No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	97	100	O <sub>2</sub> 3-Penten-1-ol, 4-methyl- \$\$ 4-Methyl-3-penten-1-ol	763-89-3	1587	2
2	93	100	O <sub>2</sub> 3-Penten-1-ol, 2-methyl-	62238-37-3	1552	2
3	87	84	12 2-Butene, 2,3-dimethyl- \$\$ Tetramethylethylene	563-79-1	591	2
4	87	100	O <sub>2</sub> 3-Hexen-1-ol	544-12-7	1135	1
5	86	110	14 1,6-Heptadiene, 2-methyl- \$\$ 6-Methyl-1,6-heptadiene	13643-06-6	2337	2

(a)

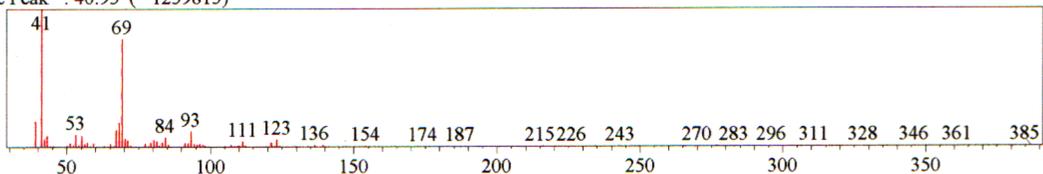
**Anexo XII.** Espectros de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol: 4-metil-3-penten-1-ol (10,62-10,73 minutos) (a), 6-metil-5-hepten-2-ona (14,3-13,4 minutos) (b) e o geraniol (23,02-23,26 minutos) (c).



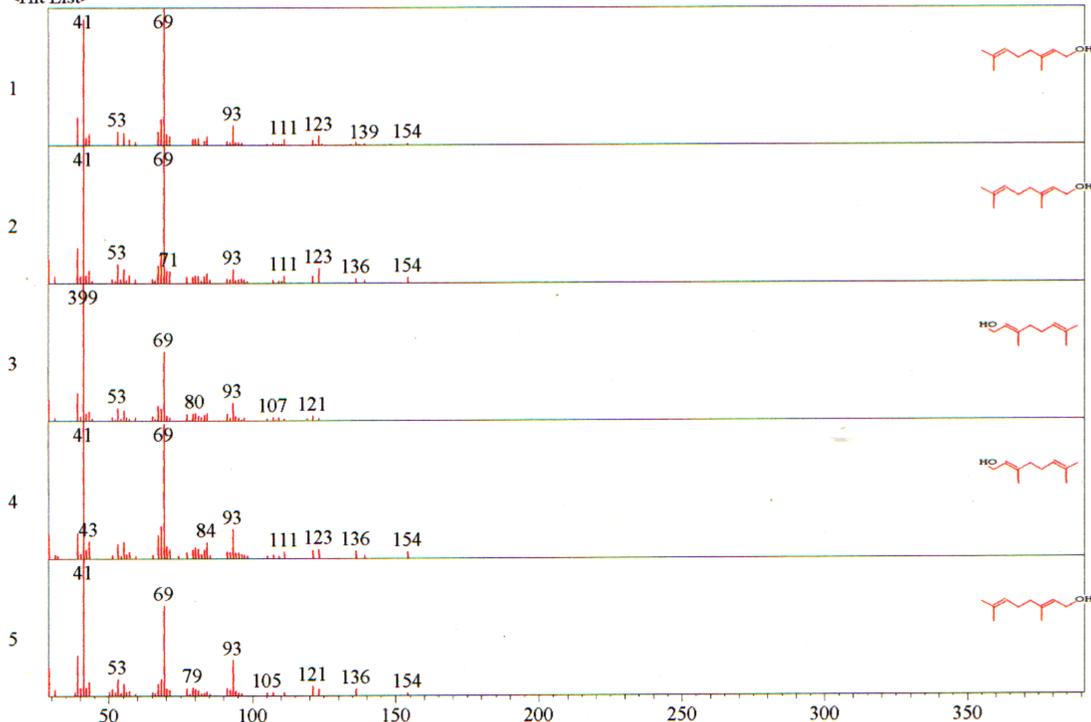
(b)

**Anexo XII.** Espectros de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol: 4-metil-3-penten-1-ol (10,62-10,73 minutos) (a), 6-metil-5-hepten-2-ona (14,3-13,4 minutos) (b) e o geraniol (23,02-23,26 minutos) (c) (continuação).

<Unknown Spectrum>  
 Data : GER25.D00  
 Mass Peak # : 213 Ret. Time : ( 23.017 - 23.258 )  
 Scan # : ( 1863 - 1892 ) B.G. Scan # : ( 1855 - 1868 )  
 Base Peak : 40.95 ( 1259815)



<Hit List>



No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	93	154	O <sub>8</sub> 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4840	1
2	93	154	O <sub>8</sub> 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4835	1
3	92	154	O <sub>8</sub> 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)- cis-Geraniol Geranyl Alcohol cis-3,7-	106-25-2	10869	2
4	91	154	O <sub>8</sub> 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	106-25-2	4842	1
5	91	154	O <sub>8</sub> 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4836	1

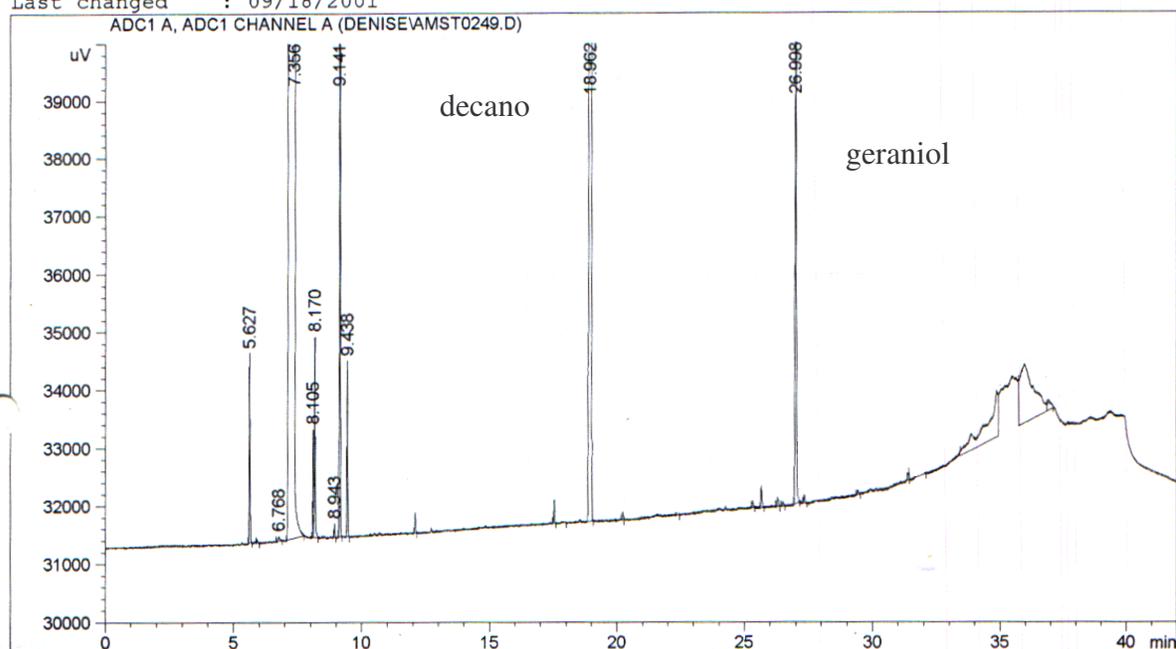
(c)

**Anexo XII.** Espectros de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2041 (no. 3) da biotransformação do geraniol: 4-metil-3-penten-1-ol (10,62-10,73 minutos) (a), 6-metil-5-hepten-2-ona (14,3-13,4 minutos) (b) e o geraniol (23,02-23,26 minutos) (c) (continuação).

Injection Date : 09/26/2001  
Sample Name : padrao  
Acq. Operator : denise

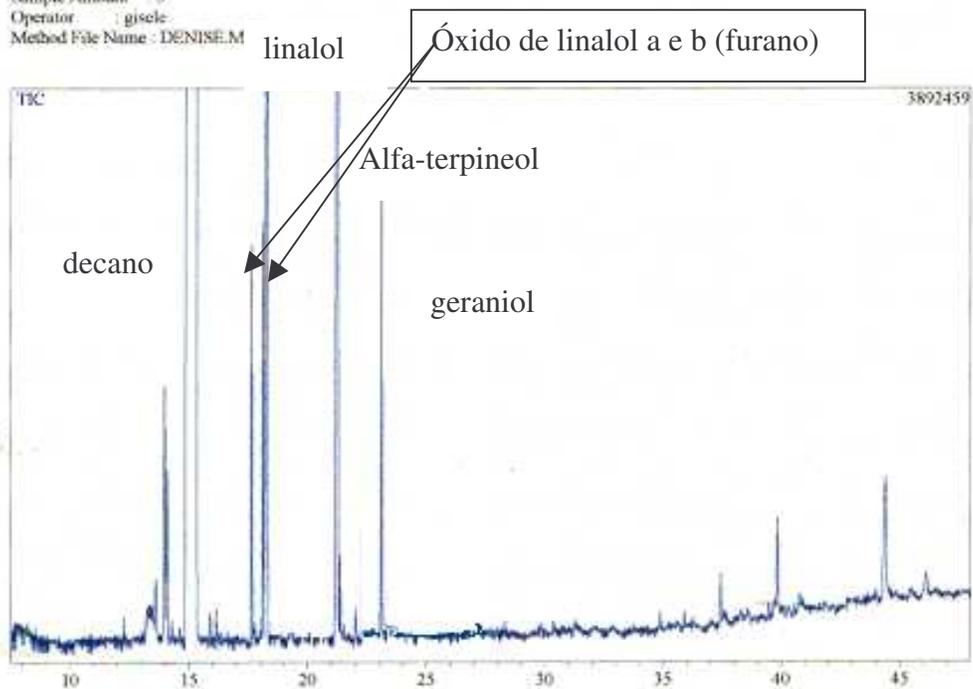
Location : Vial 1  
Inj Volume : Manually

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DENISE.M  
Last changed : 09/18/2001

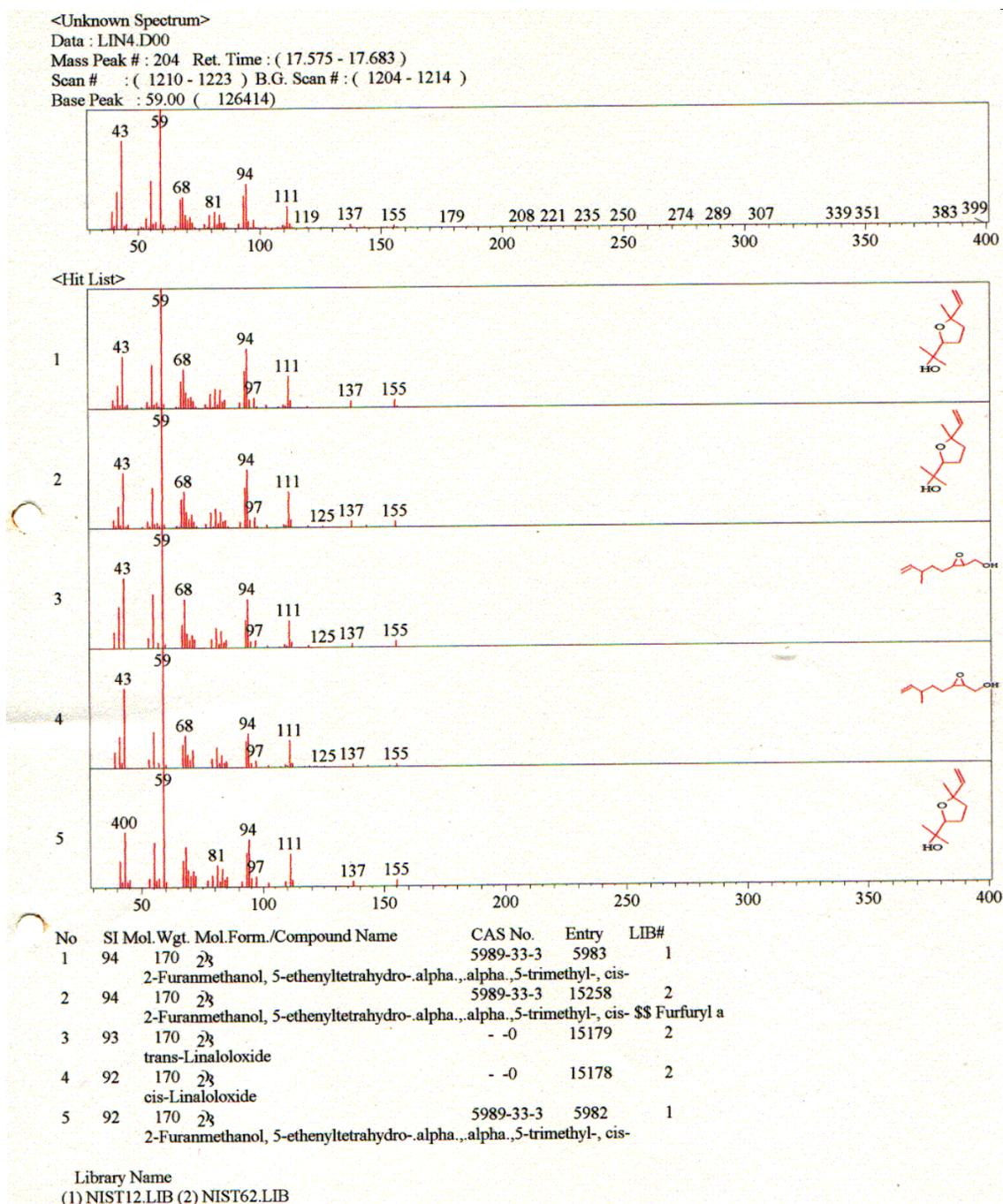


**Anexo XIII.** Cromatograma da biotransformação do geraniol na ausência de microrganismo: padrão interno (decano) (18,9 minutos) e o geraniol (26,9 minutos).

\*\*\* CLASS-5000 \*\*\* Report No. = 1 Data : LBN4.D00 01/04/27 13:00:10  
Sample : linalol  
ID : 4-301  
Sample Amount : 0  
Operator : gisele  
Method File Name : DENISE.M



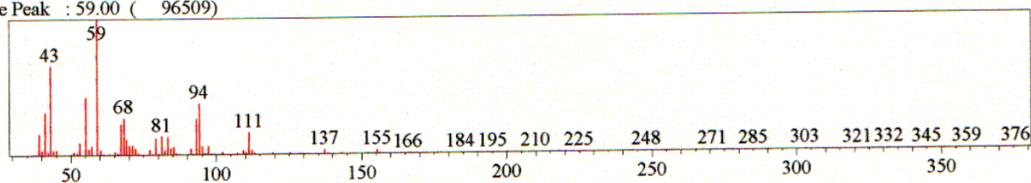
**Anexo XIV.** Cromatograma da biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) (isômeros do óxido de linalol (furano) (alfa, alfa, 5-trimetil-5-etenil-tetrahydro-2-furano-metanol): 17,58-17,68 minutos e 18,017-18,16 minutos; linalol: 18,1-18,3 minutos; alfa-terpineol: 21,1-21,29 minutos; e geraniol: 23,03-23,16 minutos).



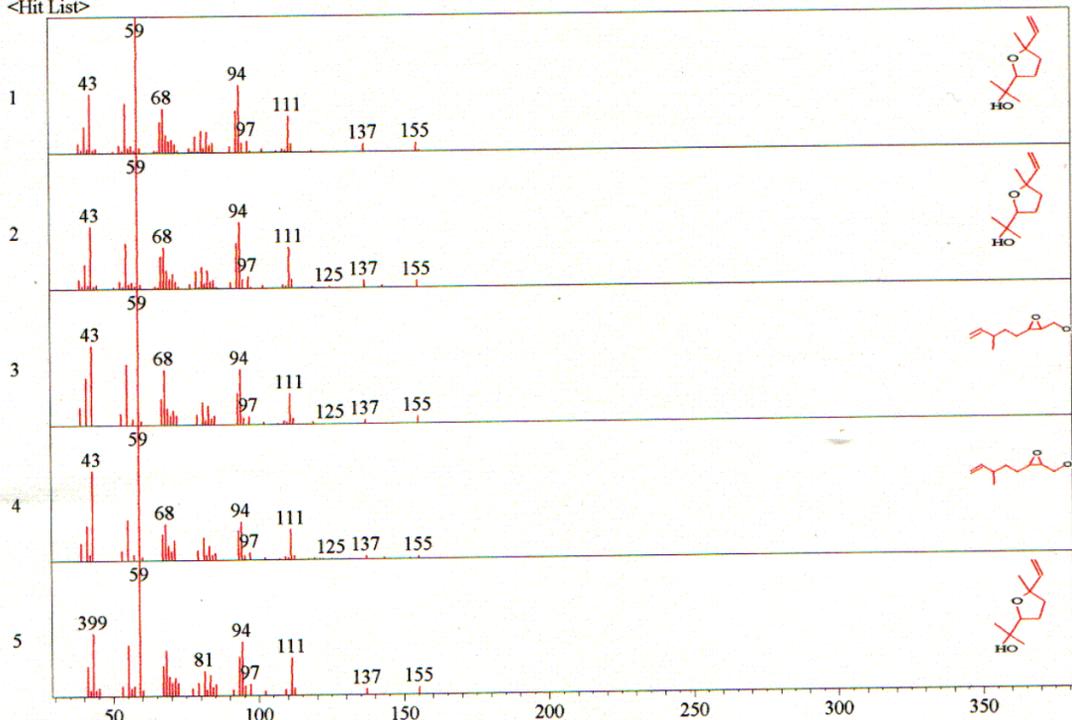
(a)

**Anexo XV.** Espectros de massa da biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-etenil-tetrahidro-2-furano-metanol) (17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e).

<Unknown Spectrum>  
 Data : LIN4.D00  
 Mass Peak # : 248 Ret. Time : ( 18.017 - 18.158 )  
 Scan # : ( 1263 - 1280 ) B.G. Scan # : ( 1261 - 1271 )  
 Base Peak : 59.00 ( 96509 )



<Hit List>

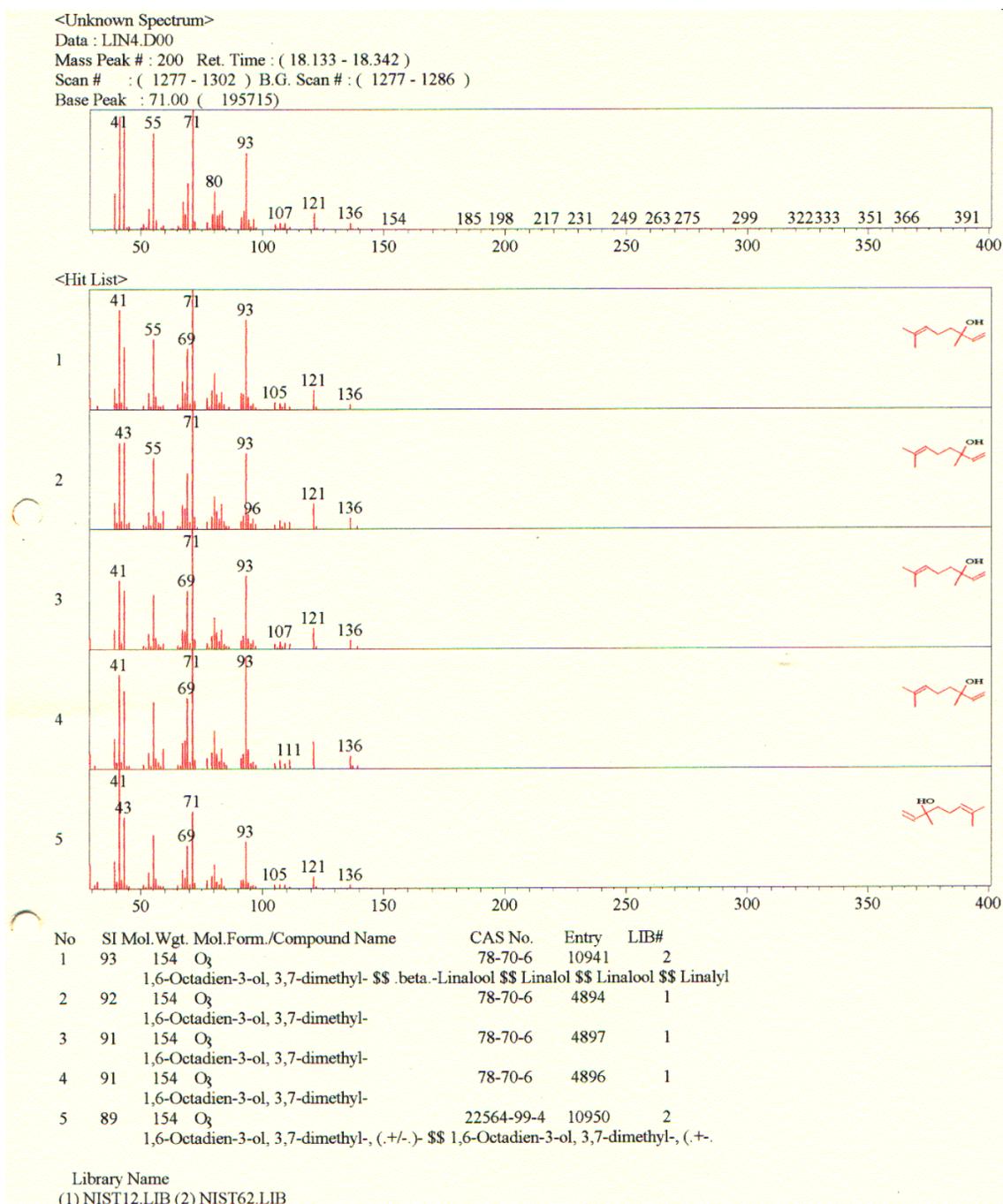


No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	94	170	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimethyl-, cis-	5989-33-3	5983	1
2	94	170	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimethyl-, cis- Furfuryl a	5989-33-3	15258	2
3	93	170	trans-Linaloloxide	- -0	15179	2
4	92	170	cis-Linaloloxide	- -0	15178	2
5	92	170	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimethyl-, cis-	5989-33-3	5982	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

(b)

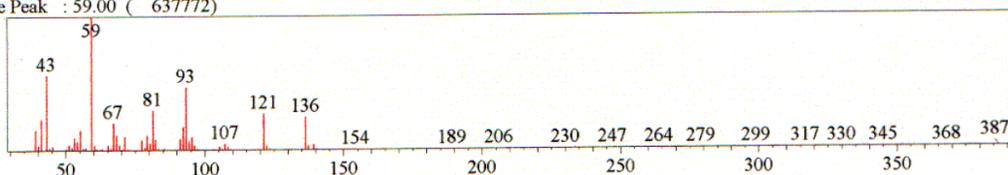
**Anexo XV.** Espectros de massa biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-etnil-tetrahydro-2-furano-metanol) (17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e) (continuação).



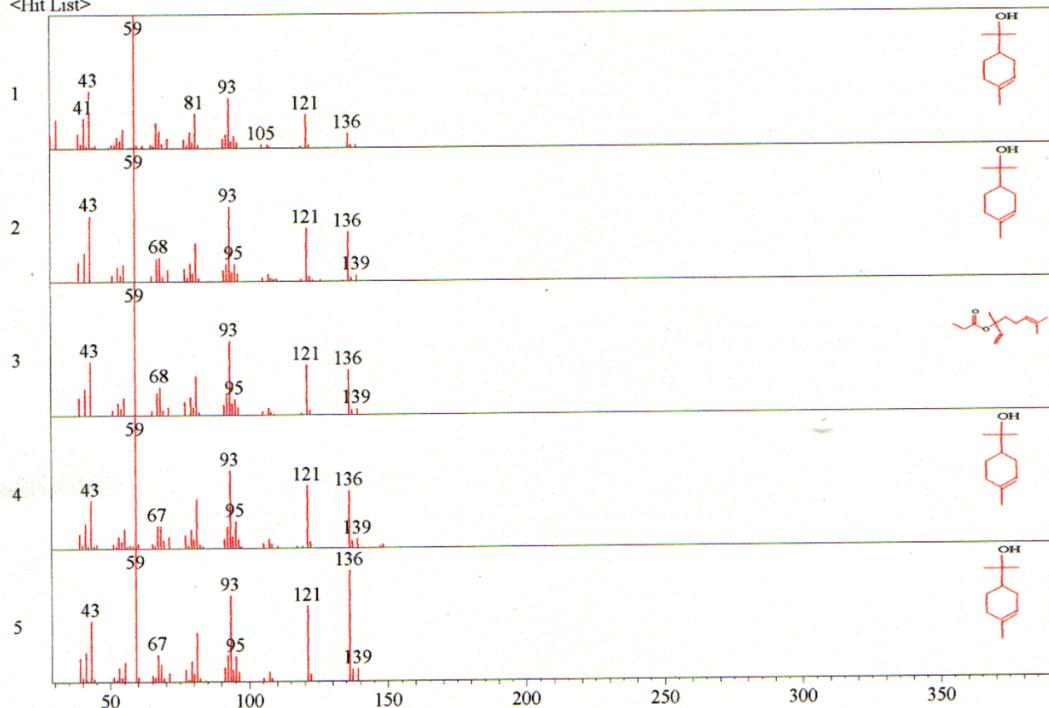
(c)

**Anexo XV.** Espectros de massa biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-etetil-tetrahydro-2-furano-metanol) (17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e) (continuação).

<Unknown Spectrum>  
 Data : LIN4.D00  
 Mass Peak # : 223 Ret. Time : ( 21.100 - 21.292 )  
 Scan # : ( 1633 - 1656 ) B.G. Scan # : ( 1631 - 1638 )  
 Base Peak : 59.00 ( 637772 )



<Hit List>



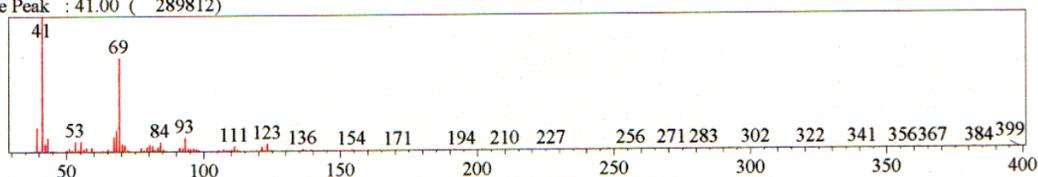
No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	95	154	O <sub>3</sub>	98-55-5	11024	2
2	93	154	O <sub>3</sub>	98-55-5	4946	1
3	93	210	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	-	25374	2
4	92	154	O <sub>3</sub>	10482-56-1	10948	2
5	91	154	O <sub>3</sub>	98-55-5	4945	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

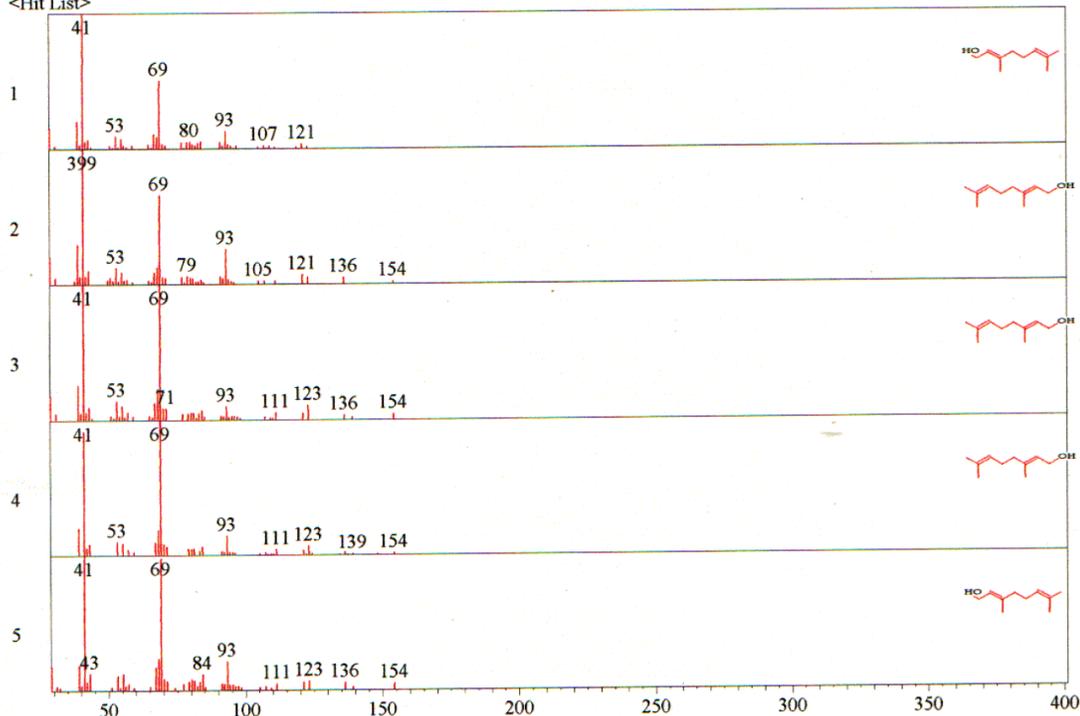
(d)

**Anexo XV.** Espectros de massa biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha, \alpha, 5$ -trimetil-etnil-tetrahydro-2-furano-metanol) (17,58-17,68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e) (continuação).

<Unknown Spectrum>  
 Data : LIN4.D00  
 Mass Peak # : 224 Ret. Time : ( 23.033 - 23.158 )  
 Scan # : ( 1865 - 1880 ) B.G. Scan # : ( 1861 - 1867 )  
 Base Peak : 41.00 ( 289812)



<Hit List>

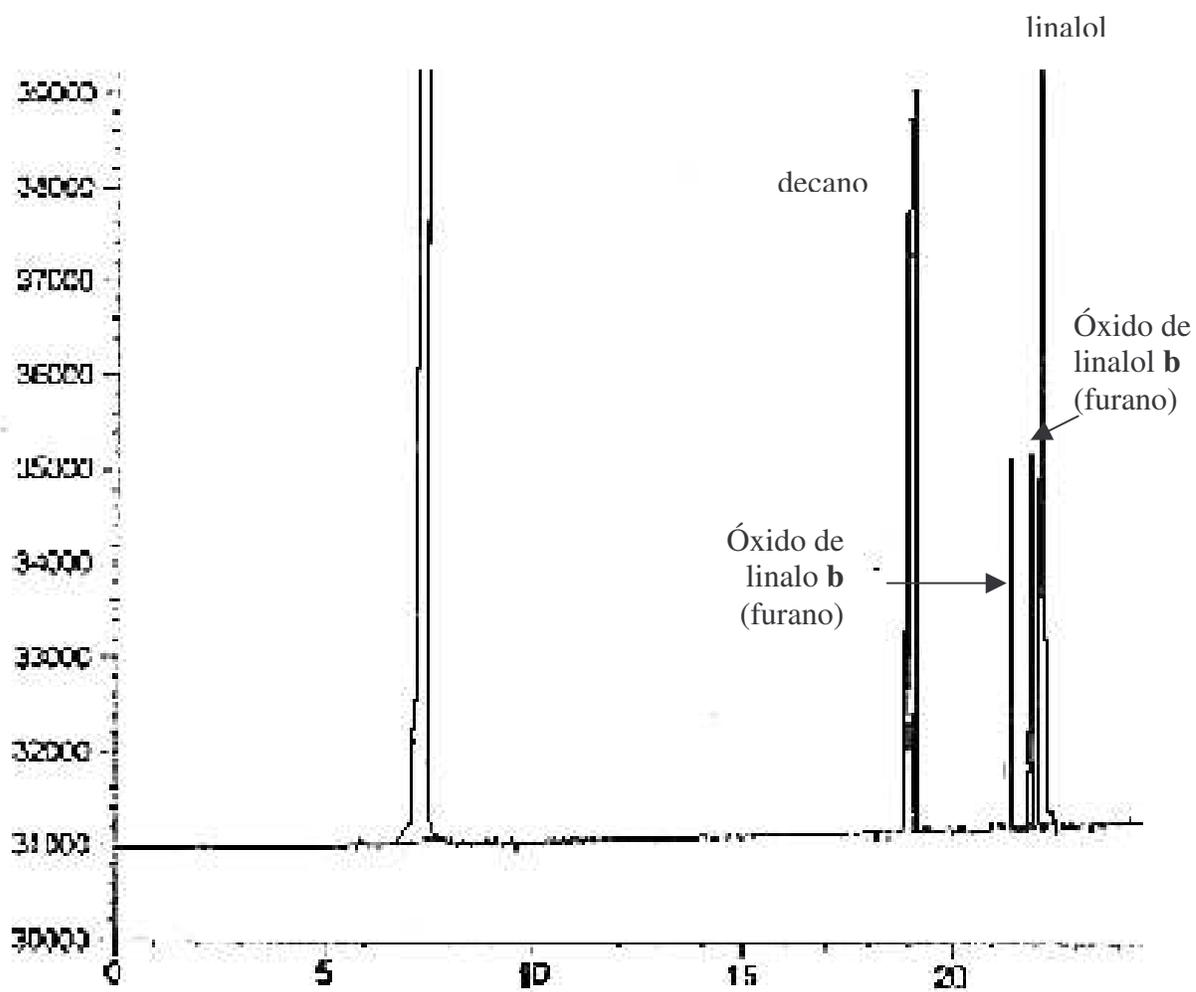


No	SI	Mol. Wgt.	Mol. Form.	Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	93	154	O <sub>3</sub>	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	106-25-2	10869	2
				\$\$\$ cis-Geraniol \$\$\$ Geranyl Alcohol \$\$\$ cis-3,7-			
2	92	154	O <sub>3</sub>	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4836	1
3	92	154	O <sub>3</sub>	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4835	1
4	92	154	O <sub>3</sub>	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	106-24-1	4840	1
5	90	154	O <sub>3</sub>	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	106-25-2	4842	1

Library Name  
 (1) NIST12.LIB (2) NIST62.LIB

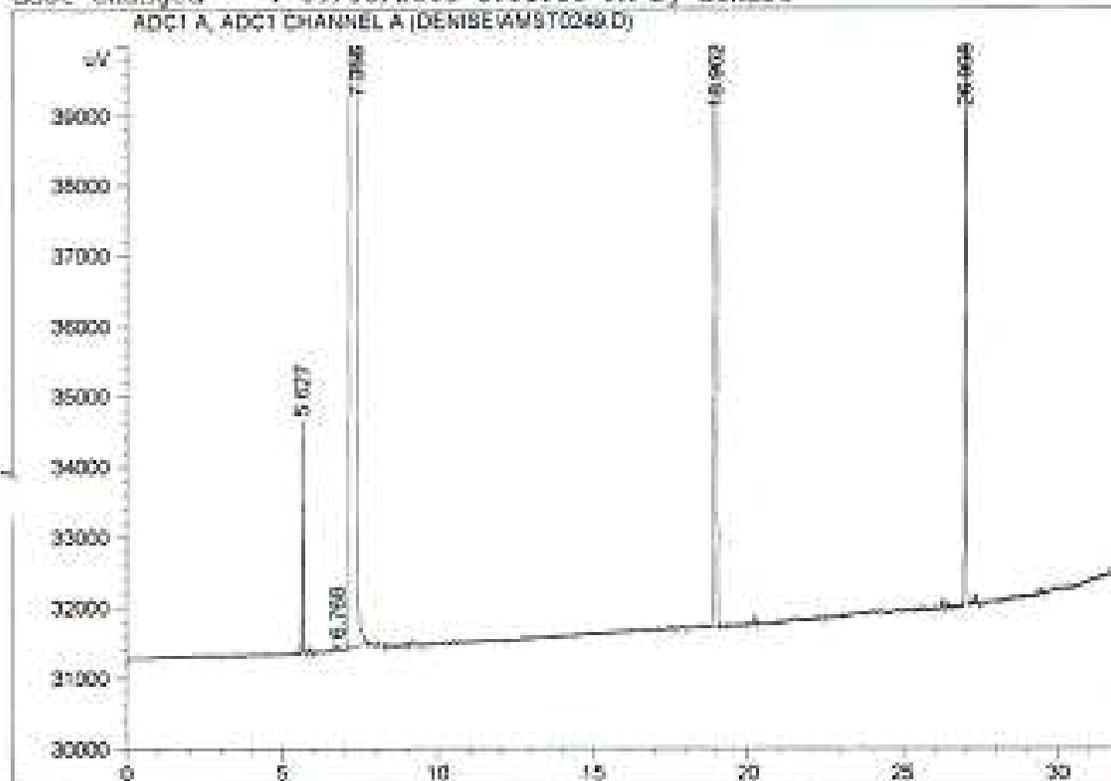
(e)

**Anexo XV.** Espectros de massa biotransformação do linalol pela linhagem LB-2002 (no. 1) para o óxido de linalol (furano) ( $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-etnil-tetrahydro-2-furano-metanol) (17.58-17.68 minutos e 18,017-18,16 minutos) (a, b), linalol (18,1-18,3 minutos) (c), o alfa-terpineol (21,1-21,29 minutos) (d) e o geraniol (23,03-23,16 minutos) (e) (continuação).



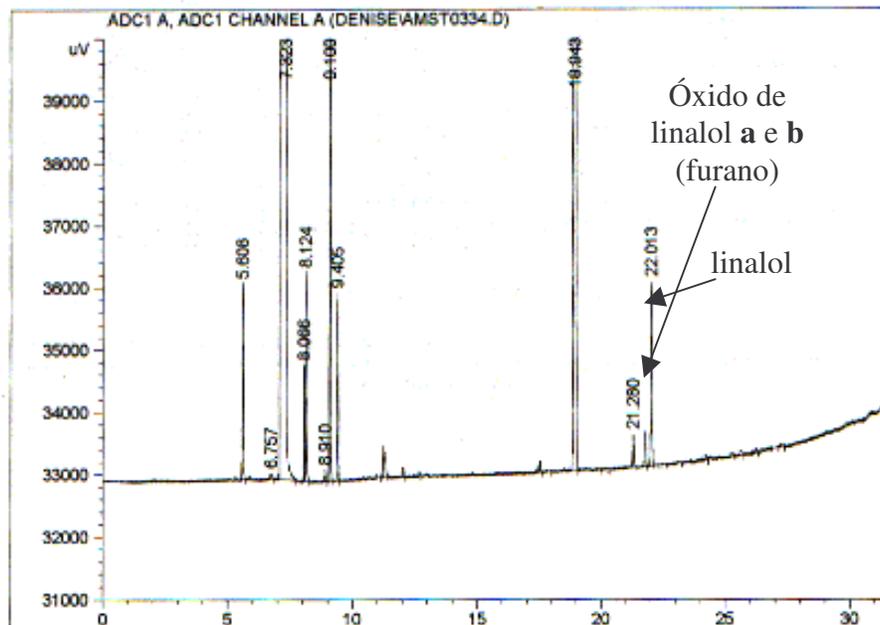
Anexo XVI. Cromatograma do padrão de óxido de linalol (tempo de retenção de 21,352 e 21,844 min.), linalol (22,075) e o padrão interno (decano)

Injection Date : 09/26/2001 3:39:02 PM  
Sample Name : padrao Location : Vial 1  
Acq. Operator : denise Inj Volume : Manually  
Method : C:\EPCHEM\1\METHODS\DENISE.M  
Last changed : 09/18/2001 6:11:38 PM by denise

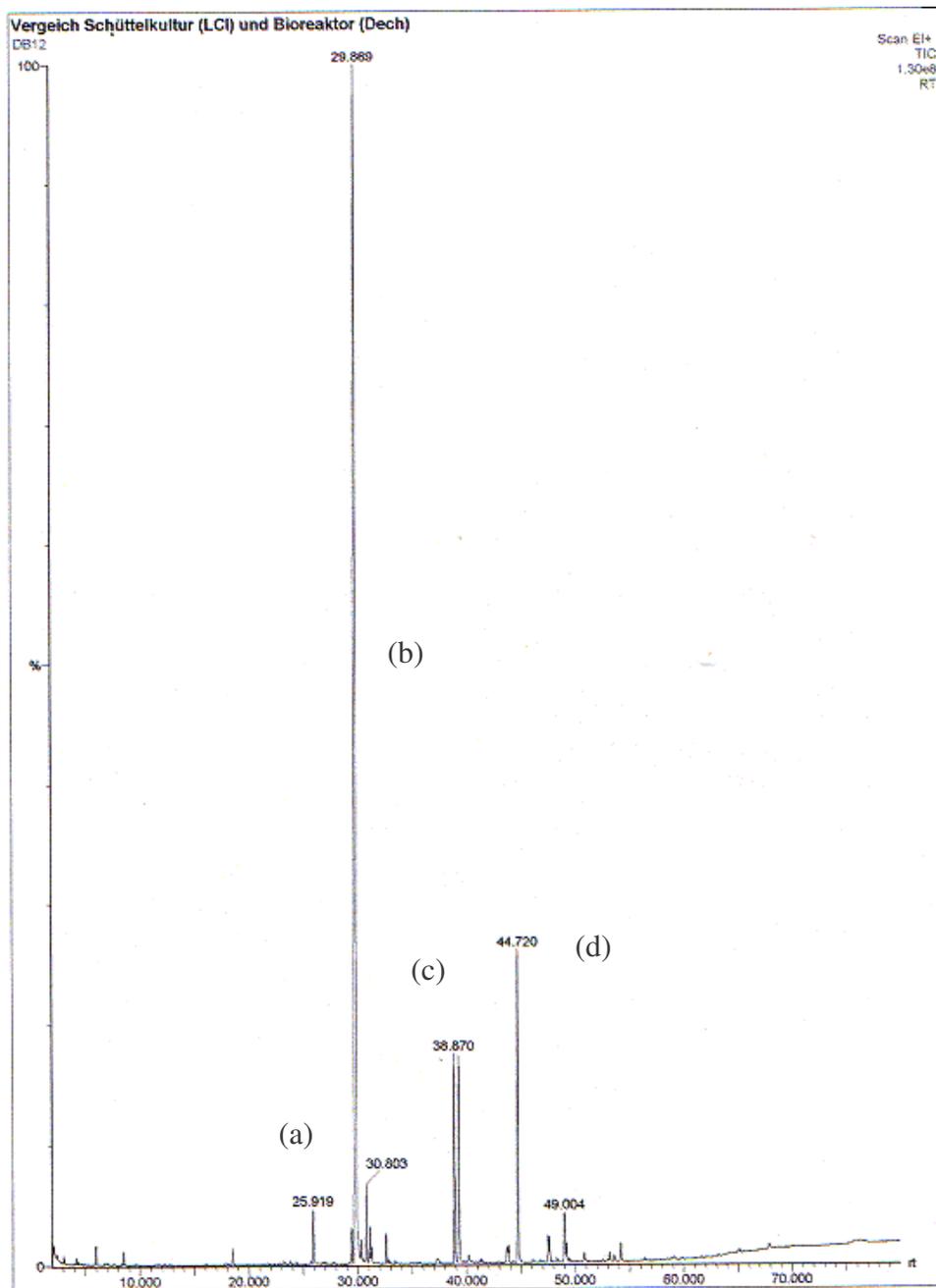


**Anexo XVII.** Cromatograma do padrão de geraniol (tempo de retenção de 26,998 minutos) e o padrão interno (decano) (tempo de retenção de 18,962 minutos).

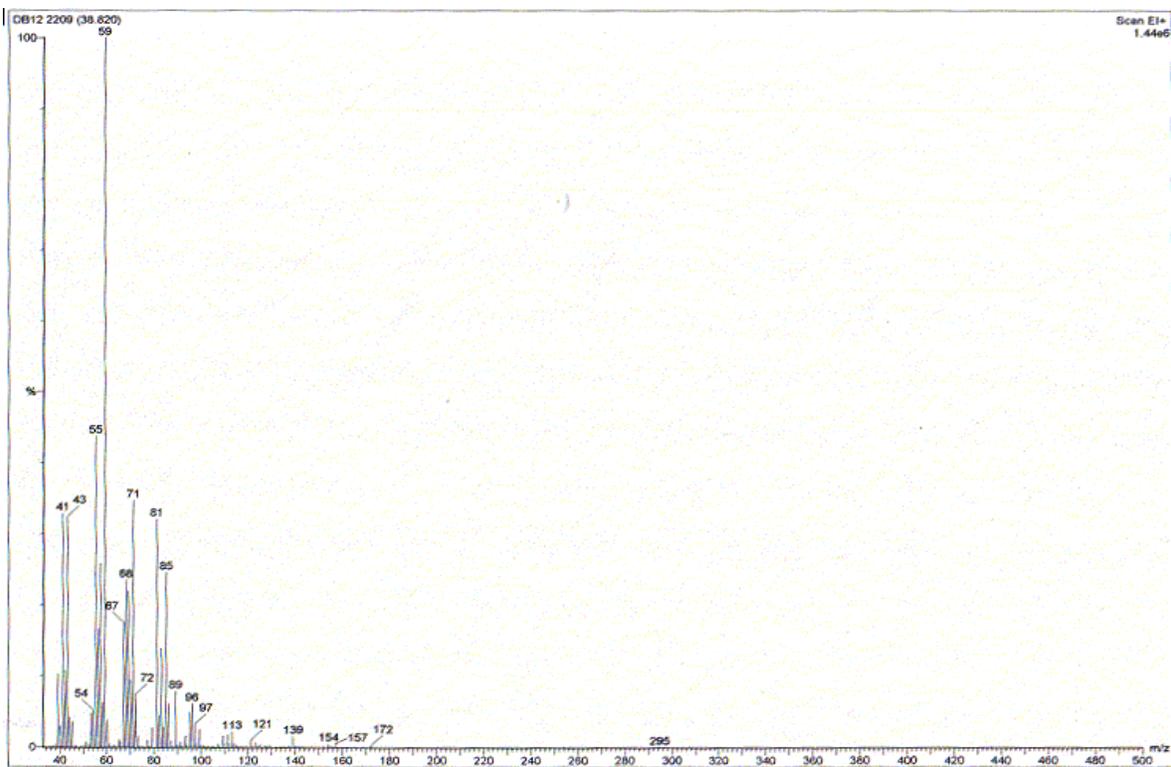
Injection Date : 10/13/2001  
Sample Name : padrao Location : Vial 1  
Acq. Operator : denise Inj Volume : Manually  
C:\HPCHEM\1\METHODS\DENISE.M



**Anexo XVIII.** Cromatograma da biotransformação do linalol na ausência do microrganismo: óxido de linalol (tempo de retenção de 21,28 e 21,84 min.), linalol (22,01) e o padrão interno (decano)

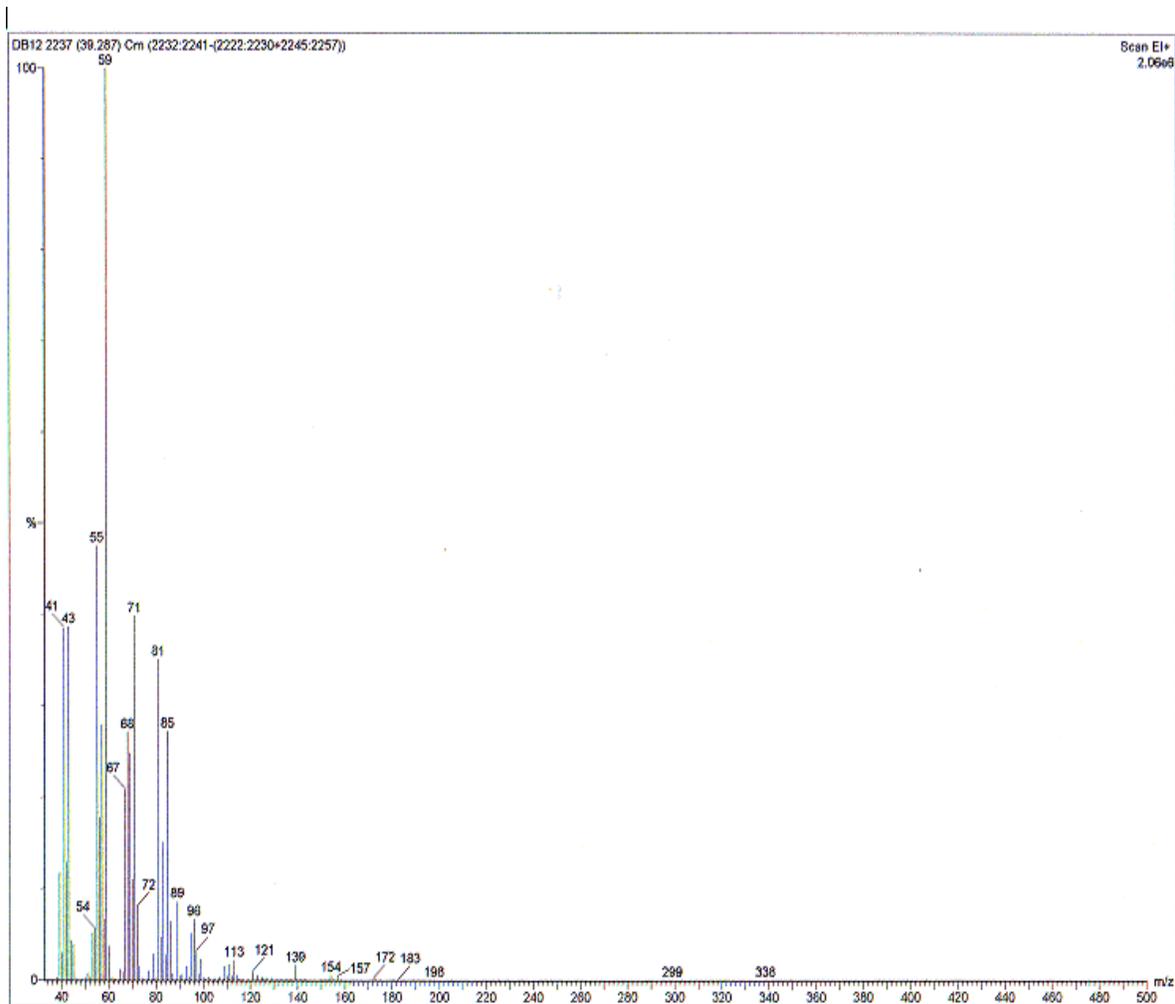


**Anexo XIX.** Cromatograma da biotransformação do citronelol pela linhagem LB-2000. (a) padrão interno, cânfora (25,919 minutos); (b) citronelol (29,569 minutos); (c) o 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero a e o isômero b (38,870 minutos); e (d) o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (44,720 minutos).



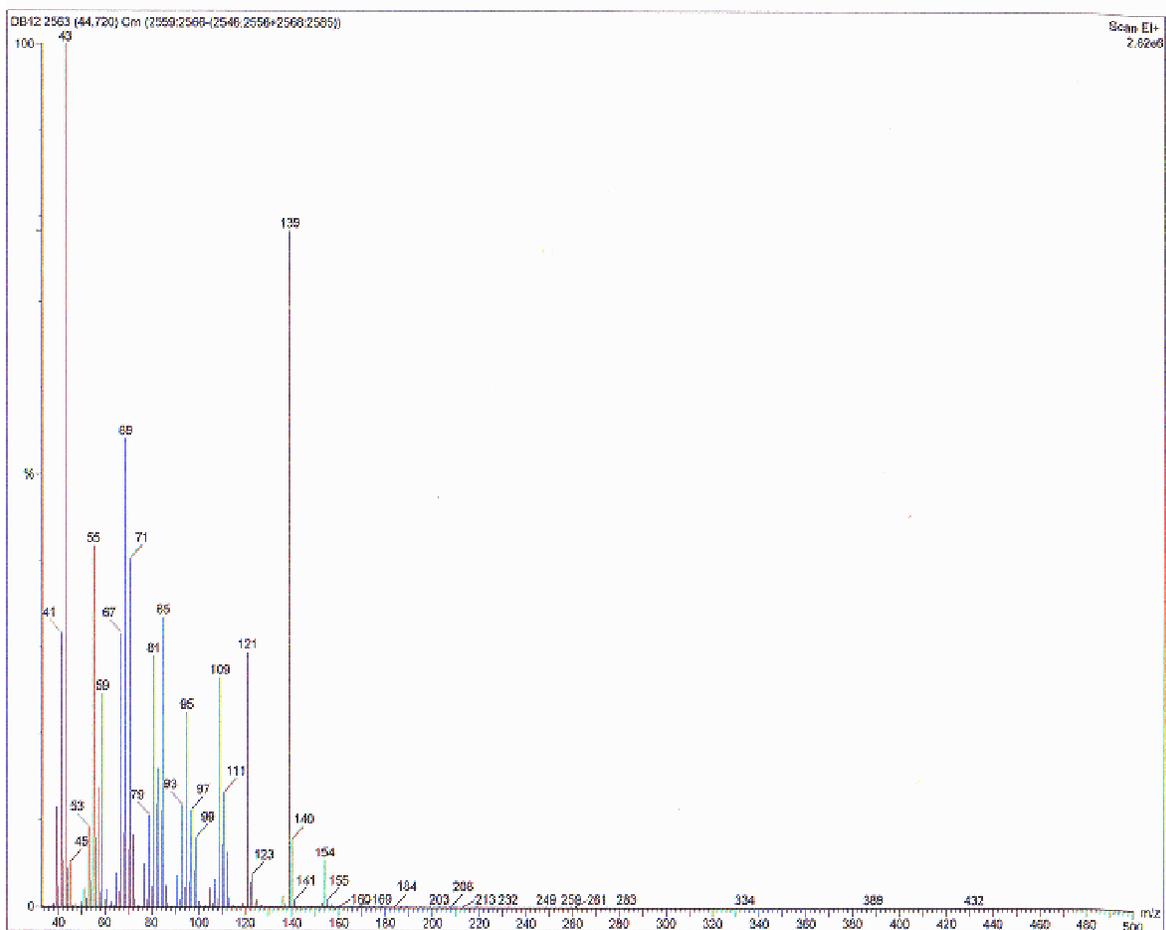
(a)

**Anexo XX.** Espectro de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2000. O 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero a (a) e o isômero b (b), e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (c).



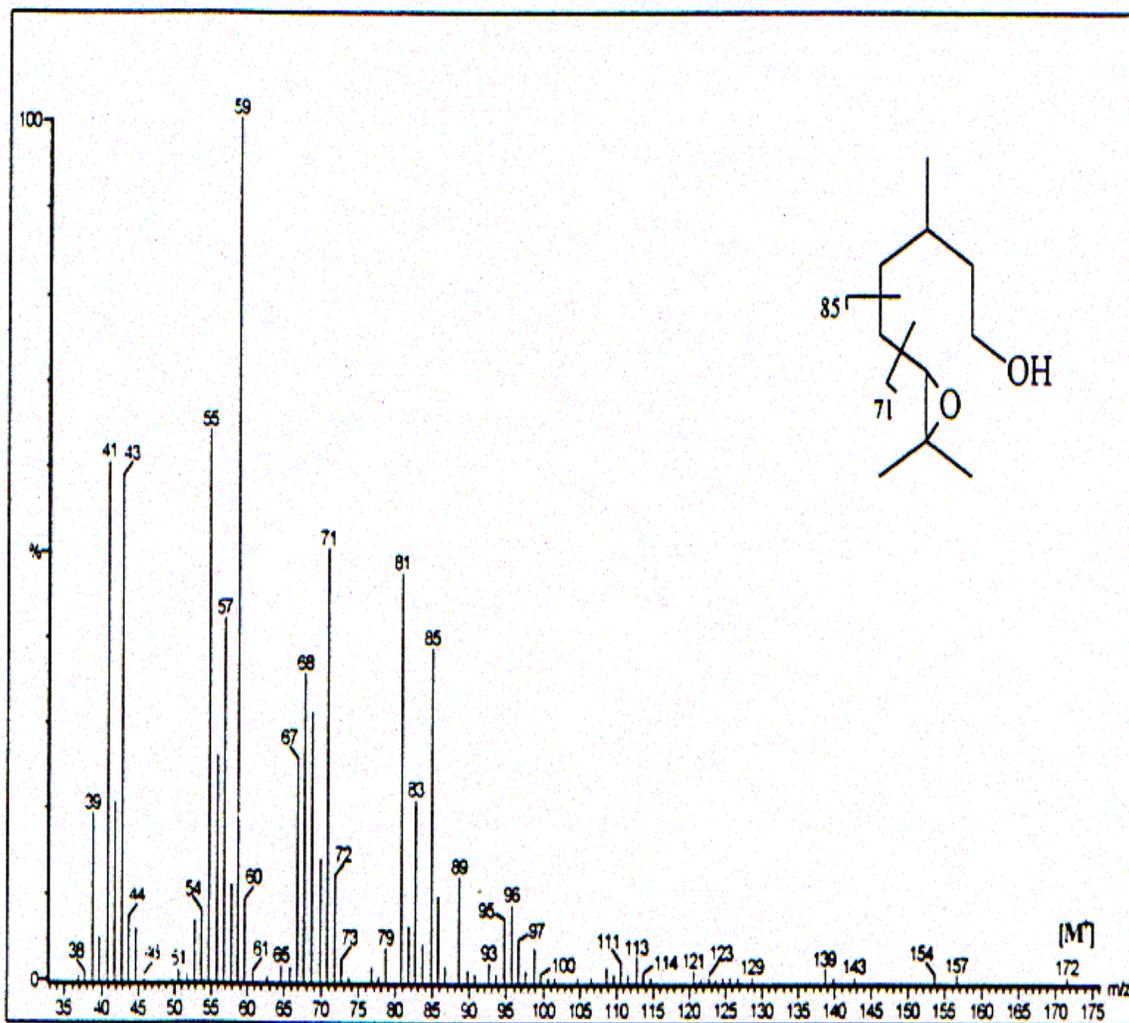
(b)

**Anexo XX.** Espectro de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2000. O 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero a (a) e o isômero b (b), e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (c) ( continuação).

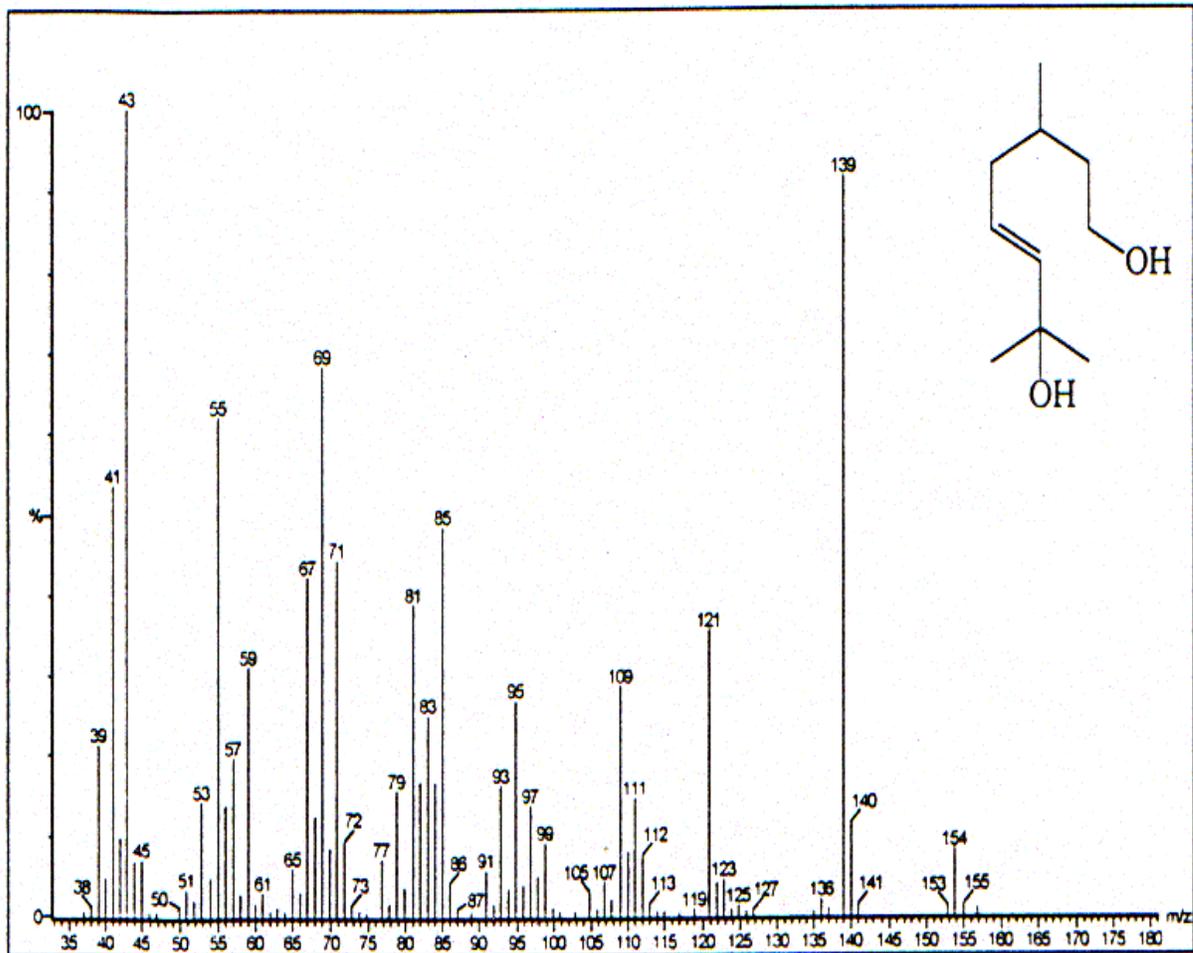


(c)

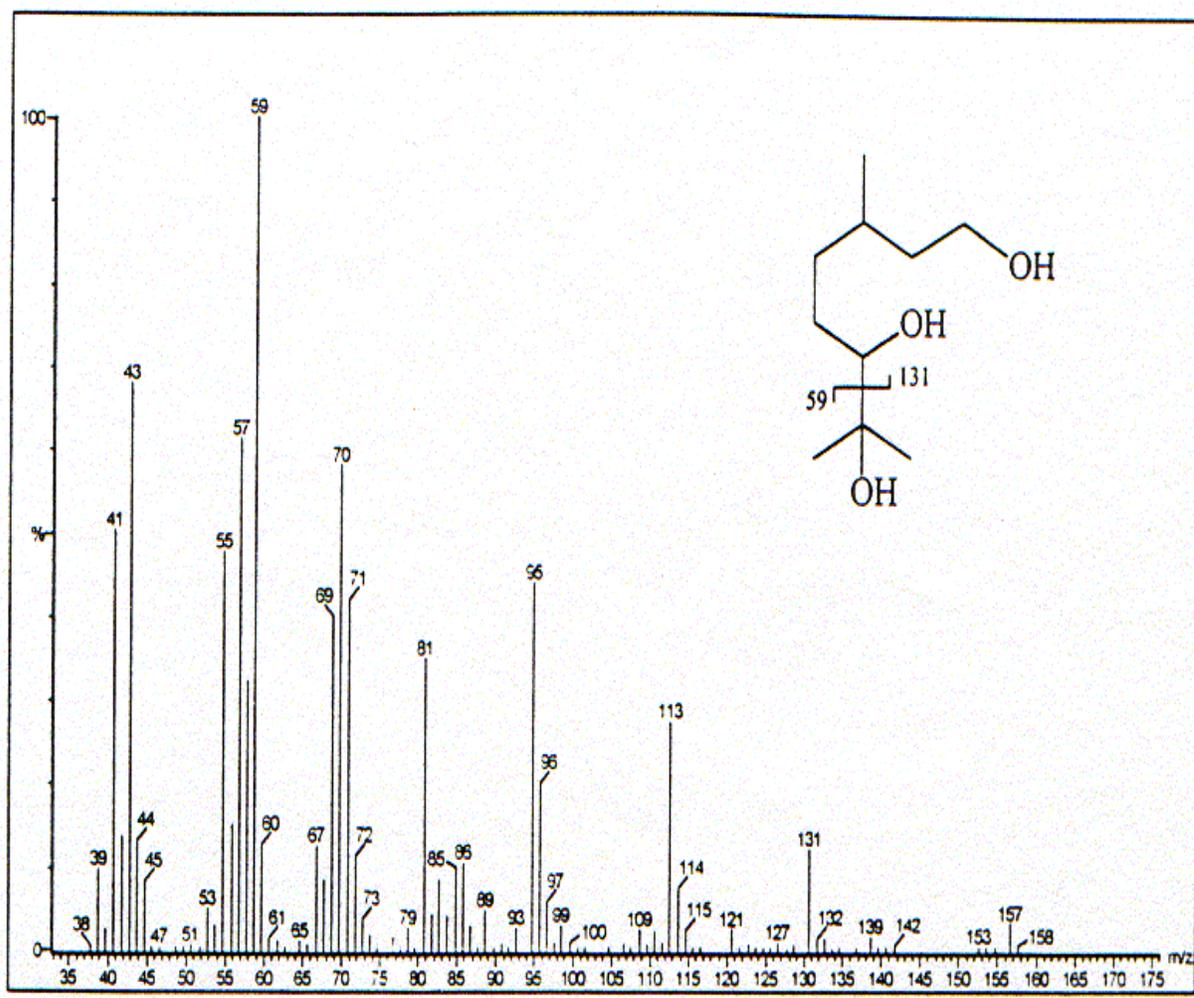
**Anexo XX.** Espectro de massa referente ao cromatograma da linhagem LB-2000. O 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol, isômero a (a) e o isômero b (b), e o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol (c) (continuação).



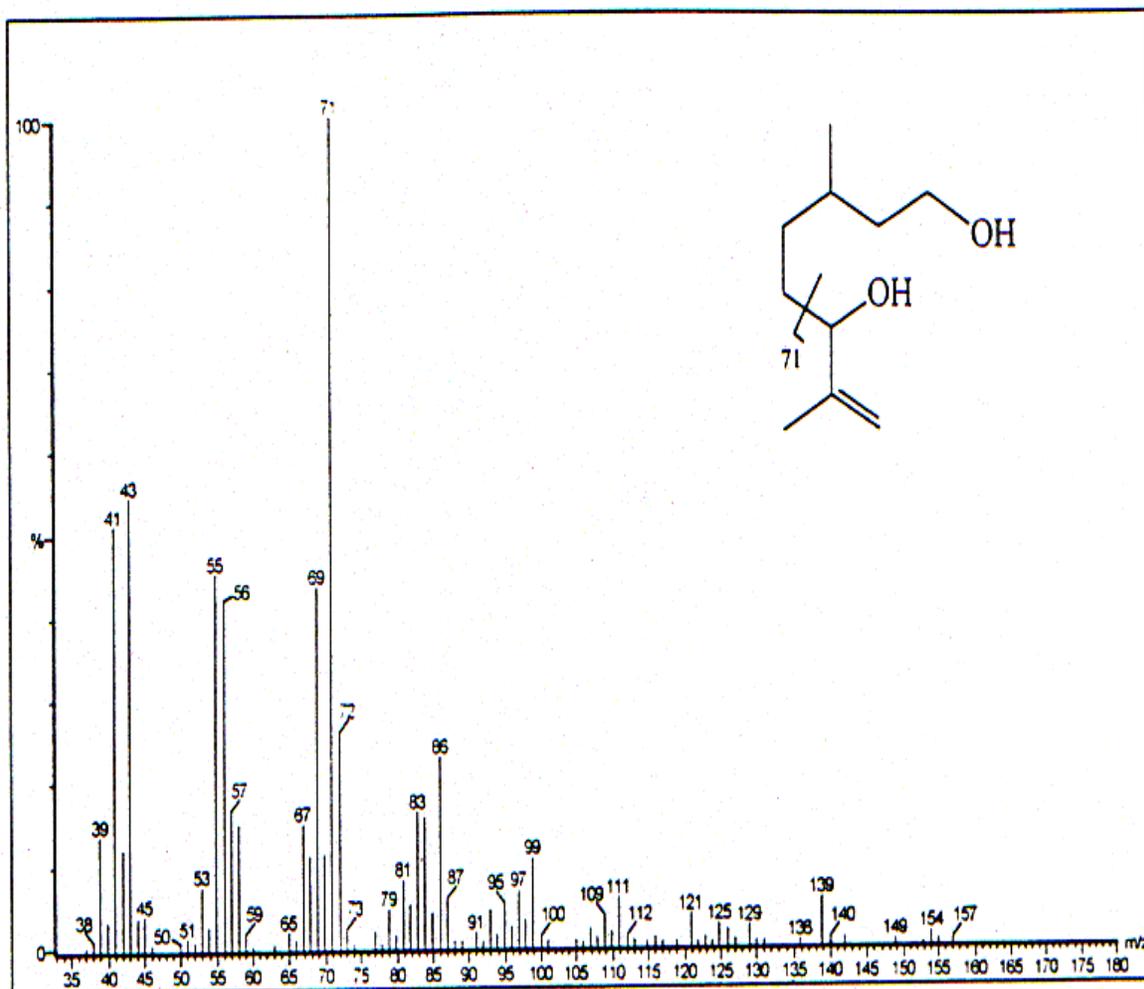
Anexo XXI. Espectro de massa do ,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol obtido por ONKEN (1998)



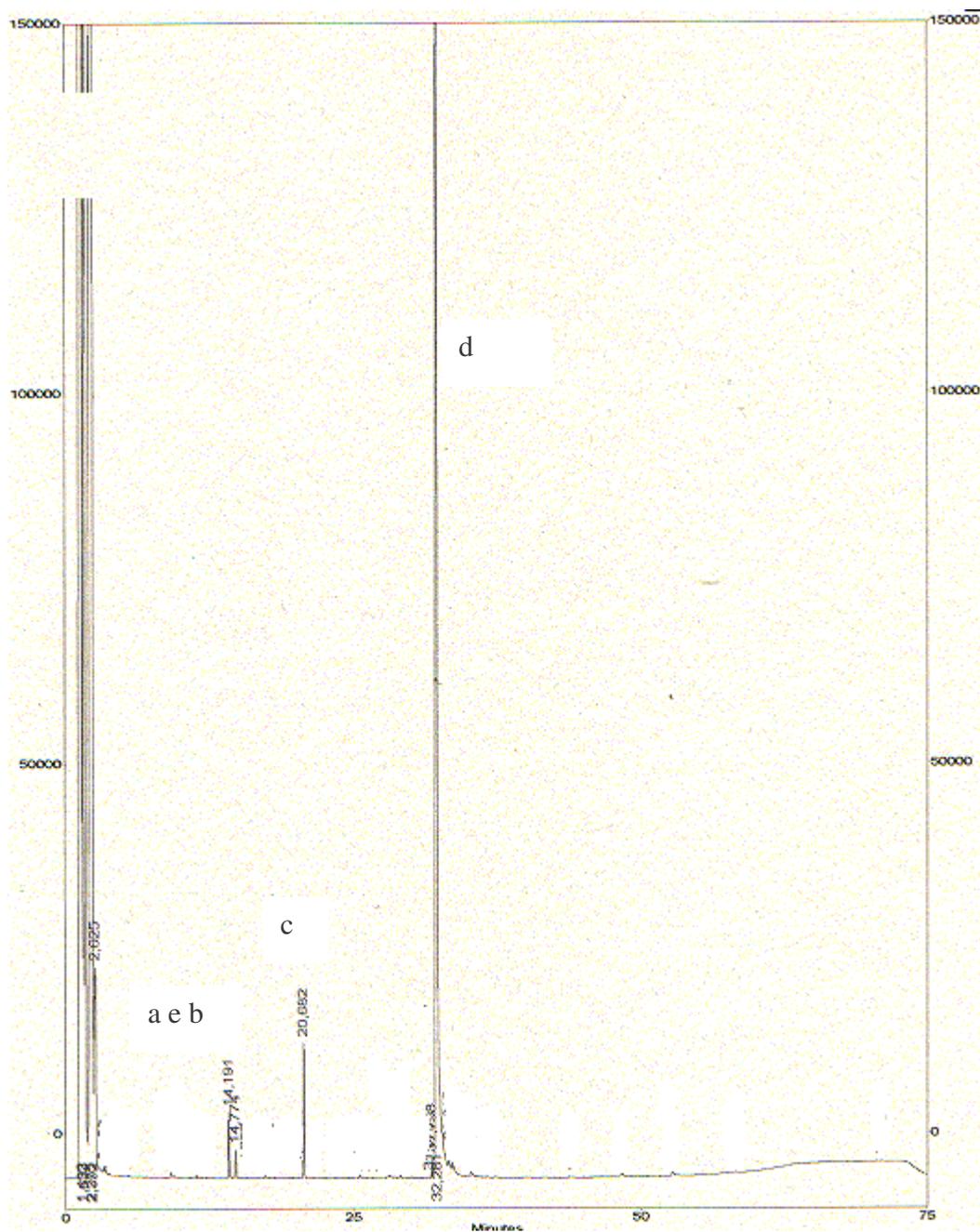
Anexo XXII. Espectro de massa para o 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol , obtido por ONKEN (1998)



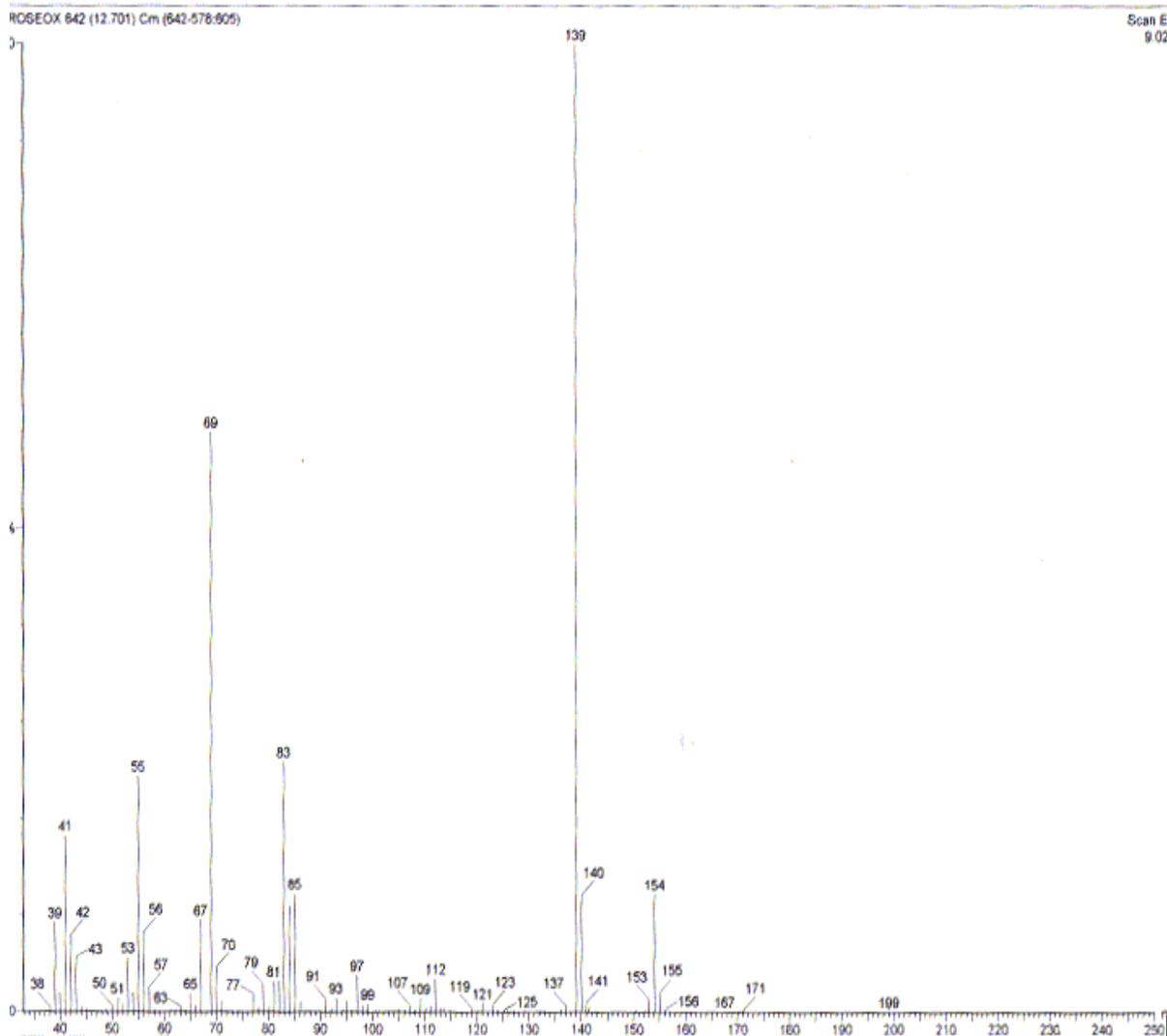
Anexo XXIII. Espectros de massa para o 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol obtido por ONKEN (1998).



Anexo XXIV. Espectros de massa para o 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol obtido por ONKEN (1998).

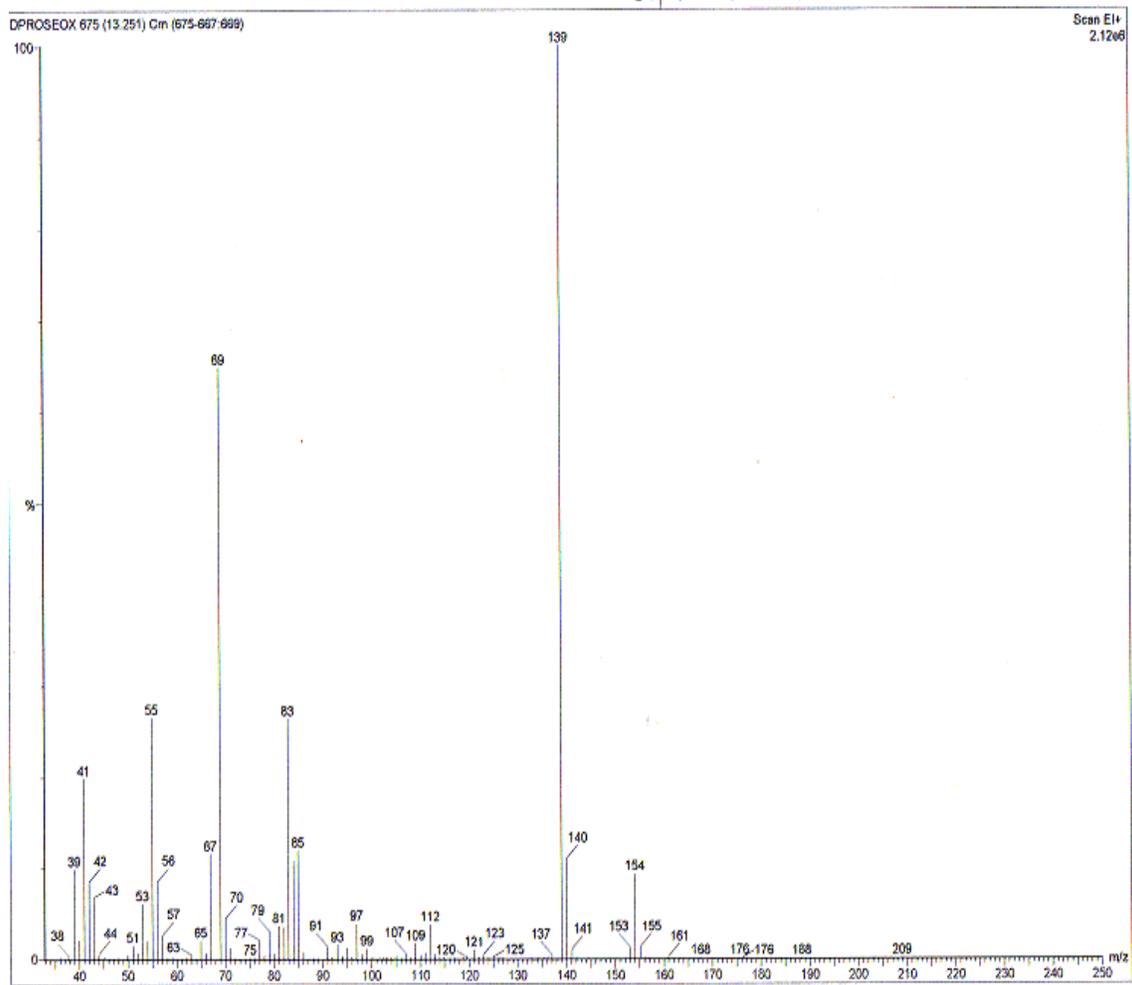


**Anexo XXV.** Cromatograma da linhagem LB-2060 no meio de cultura líquido número 2 de óxido de rosa (a e b) (14,191 e 14,774 minutos), padrão interno (cânfora) (c) (20,682 minutos) e citrionelol remanescente no meio de cultura (d) (30,281 minutos).



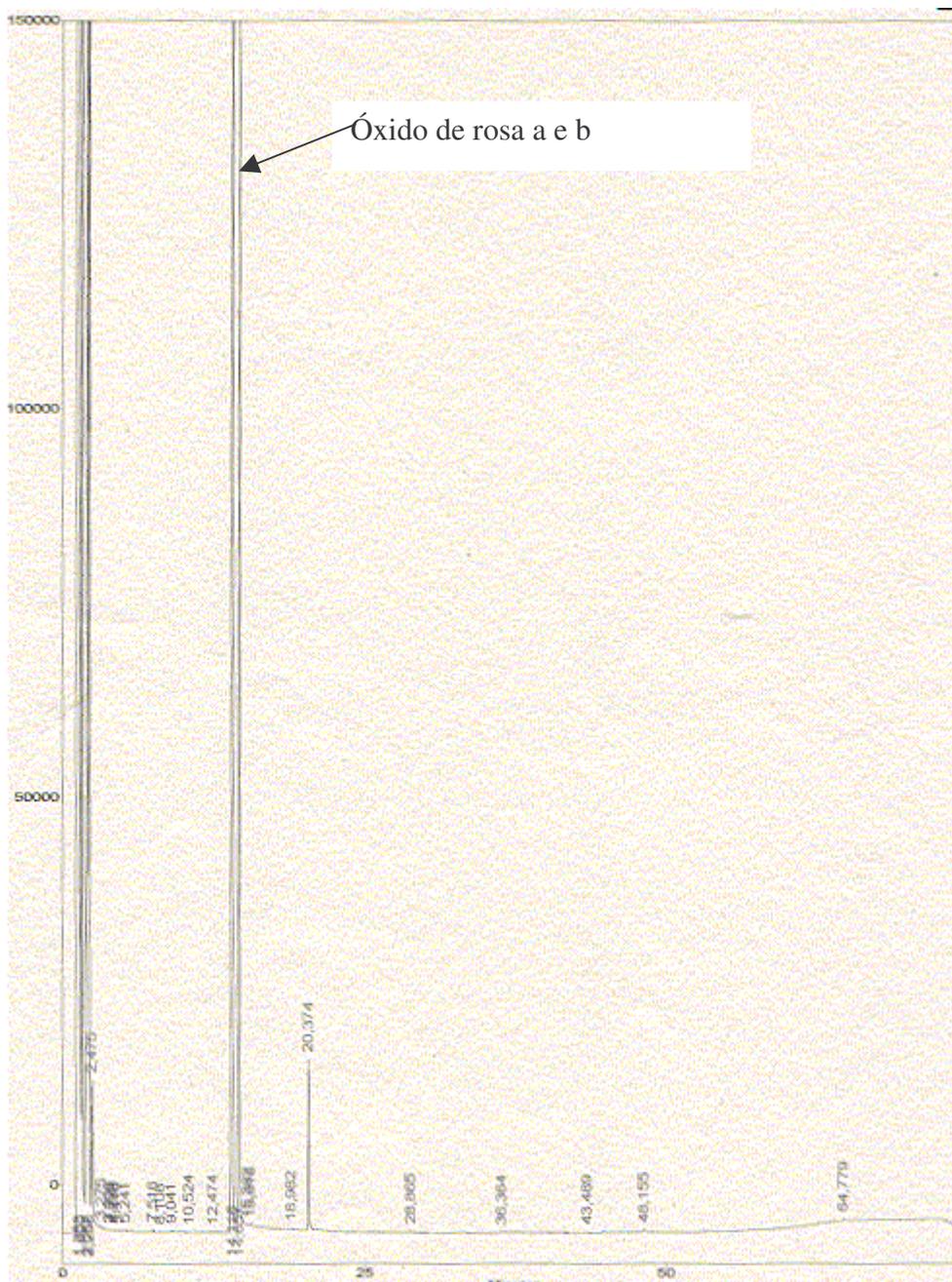
(a)

Anexo XXVI. Espectros de massa do óxido de rosa, o isômero a (a) e o isômero b (b).



(b)

Anexo XXVI. Espectros de massa para o isômero a (a) e o isômero b (b) do óxido de rosa (continuação).



Anexo XXVII. Cromatograma da biotransformação do óxido de rosa no tempo de 144 horas de cultivo