



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos



**Biotransformação de terpenos para a produção de
compostos de aroma e funcionais**

Mário Roberto Maróstica Junior

Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos

Sob orientação da Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore

Campinas, julho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M347b Maróstica Junior, Mário Roberto
Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de
aroma e funcionais / Mário Roberto Maróstica Junior. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2006.

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

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

(cars/fea)

Titulo em inglês: Biotransformation of terpenes in flavor and functional compounds

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biotransformation, Aroma compounds, Fungi
Terpenes, Functional foods

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Gisella Maria Zanin

Sônia Couri

Stephen Hyslop

Gabriela Alves Macedo

Yong Kun Park

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

Banca

Gláucia Maria Pastore (Orientadora)

Gisella Maria Zanin

Sonia Couri

Stephen Hyslop

Gabriela Alves Macedo

Yong Kun Park

A meus pais, Mário e Beth, que me fazem sentir o gosto pela vida a cada instante vivido, a cada palavra proferida. Dedico-lhes com o mesmo infinito amor que eles incessantemente me dedicam a cada passo de nossa convivência.

Agradecimentos

A meus pais, Mário e Beth, pelo apoio incondicional, irrestrito e constante, pelos imensuráveis esforços à minha formação. Vocês foram a sustentação para que esse trabalho fosse possível.

À Carol, minha querida, pelos abraços ternos, pelo sorriso meigo e pelo amor incessante.

À Thaís, minha irmã, pelo apoio e amizade.

A meus avós Arlindo (*in memoriam*), Nancy, Olívio e Lúcia por todo o apoio.

À tia Odila pelos sábios conselhos e todo o carinho.

À profa. Gláucia, por toda a orientação, amizade, por toda a confiança em mim depositada, pela oportunidade, por despertar em mim a crescente vontade de saber, de aprender, de conhecer, de me dedicar mais e mais e por me ajudar a desenvolver o senso crítico e a vontade de vencer os desafios.

Ao Prof. Stephen, Thomaz e Gilberto pela amizade, oportunidade e pelas portas sempre abertas.

À Natasha e Nathalie, por toda amizade, dedicação e determinação.

Aos amigos e colegas de laboratório: Mari, CD, Fábio (Cabeção), Jana, Andréia, Xispita, Angélica, Rô, Juliano, Luciana, Manola, Haroldo, Priscila, Bia, Vânia, Andreas, Ana Paula, Cléber, Lauro, Lisia, Giovanna, Cíntia, Roger pelo apoio, pelas risadas, piadas e companhia. Aprendi com vocês a cada dia!

Aos amigos da galera 98, pela amizade, companhia, apoio e muitas risadas!

A Reginaldo, Lourdes e Dora, pelos apoios diários e amizade.

Ao Pe. Roberto pelo apoio, interesse, grande amizade e pelas risadas!

Aos membros da banca, pelas correções.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Sumário

RESUMO GERAL	1
SUMMARY	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1. BIOTRANSFORMAÇÃO DO LIMONENO	12
1.1. Problemas da biocatálise	14
1.2. O baixo rendimento dos processos de biotransformação	15
1.3. Problemas relacionados à recuperação dos produtos da biotransformação	16
1.4. Rotas metabólicas envolvidas na biotransformação do limoneno	17
1.5. Considerações	33
2. BIOTRANSFORMAÇÃO DE α - E β -PINENOS	35
2.1. Biotransformação de α -pineno	37
2.2. Biotransformação de β -pineno	41
3. BIOTRANSFORMAÇÃO DE CITRONELOL	43
4. LIMONENO E SEUS DERIVADOS: COMPOSTOS FUNCIONAIS E DE AROMA	48
4.1. Fitoquímicos: a dieta como fator de redução de riscos a doenças	50
4.2. Evidências da atividade anticâncer de alguns monoterpenos	52
4.3. Mecanismos de ação anticâncer de alguns monoterpenos	59
4.4. Considerações	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 2 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE LIMONENO	87
ABSTRACT	87
1. INTRODUCTION	88
2. MATERIALS AND METHODS	90
2.1. Agro-industrial residues	90
2.2. Chemicals	91
2.3. Microorganisms and cultivation	91
2.4. Cassava medium preparation	91
2.5. Total carbohydrates analyses in cassava medium	91
2.6. Determination of Reducing sugars contents in cassava medium	92
2.7. Determination of Nitrogen contents in cassava medium	92
2.8. Determination of Minerals contents in cassava medium	92
2.9. Analysis of Chemical Oxygen Demand (COD) of cassava waste water and Total Solids	92
2.10. Mineral medium composition	93
2.11. Biotransformation experiments	93
2.12. <i>Fusarium oxysporum</i> grown in the presence of orange essential oil in decane	94
2.13. Analysis of the samples by GC and GC-MS	95
3. RESULTS AND DISCUSSION	96
3.1. Orange Essential Oil Composition	96
3.2. Composition of cassava wastewater (manipueira)	97
3.3. Manipueira as a bioconversion medium	98
3.4. Comparison of the strains and media	99
3.5. Influence on strain growth of the presence of a solution of orange essential oil in decane	101
4. CONCLUSIONS	103
REFERENCES	105

CAPÍTULO 3 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE CITRONELOL	109
ABSTRACT.....	109
1. INTRODUCTION	110
2 - MATERIAL AND METHODS	113
2.1 - <i>Chemicals and reagents</i>	113
2.2 - <i>Microorganisms and cultivation</i>	113
2.3 - <i>Cassava medium (CM) preparation</i>	113
2.4 - <i>Determination of the cassava medium composition</i>	114
2.7 - <i>Induction experiments</i>	116
2.8 - <i>Analysis of the samples by GC</i>	116
3 - RESULTS AND DISCUSSION.....	117
3.1 - <i>Manipueira as a bioconversion medium</i>	117
3.2 - <i>Chemical stability of citronellol in submerged liquid broths</i>	119
3.3 - <i>Comparison of the strains and media</i>	120
3.4 - <i>Induction experiments</i>	123
4 - CONCLUSIONS.....	124
REFERENCES.....	126
CAPÍTULO 4 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE α- E β-PINENOS	129
ABSTRACT.....	129
1. INTRODUCTION	130
2. MATERIAL AND METHODS	131
2.1. <i>Agro-industrial residues</i>	131
2.2. <i>Chemicals</i>	132
2.3. <i>Microorganisms and cultivation</i>	132
2.4. <i>Optimization of SPME analysis</i>	132
2.5. <i>SPME biotransformation experiments</i>	133
2.6. <i>Liquid culture biotransformation experiments</i>	133
2.7. <i>Analysis of the samples by GC and GC-MS</i>	134
3. RESULTS AND DISCUSSION	134
3.1. <i>Turpentine oil</i>	134
3.2. <i>Optimization of SPME analysis</i>	136
3.3. <i>Screening experiments using surface cultures and headspace analysis by SPME</i>	137
3.4. <i>Liquid culture biotransformation</i>	139
4. CONCLUSIONS	143
REFERENCES.....	145
CAPÍTULO 5 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE α-FARNESENO	148
ABSTRACT.....	148
1. INTRODUCTION	149
2. MATERIALS AND METHODS.....	150
2.1. <i>Strains</i>	150
2.2. <i>Cultivation and biotransformation experiments</i>	151
2.3. <i>Analysis of terpenes in medium and mycelium</i>	152
2.4. <i>Fractionation of the biotransformation extracts in silica gel</i>	152
2.5. <i>GC analysis of the biotransformation products</i>	153
3. RESULTS.....	154
3.1. <i>Screening Experiments</i>	154
3.2. <i>Biotransformation of farnesene by <i>Aspergillus niger</i> CCT 7449 and <i>Aspergillus niger</i> CCT 7450</i>	154
3.3. <i>Distribution of biotransformation compounds between the mycelium and culture medium</i>	157
3.4. <i>Fractionation of the biotransformation extracts in silica gel</i>	159
3.5. <i>GC-O analyses</i>	159

4. CONCLUSIONS.....	159
REFERENCES.....	161
CAPÍTULO 6 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS DE AROMA MONOTERPÊNICOS.....	163
ABSTRACT.....	163
1. INTRODUCTION	164
2. MATERIALS AND METHODS	165
2.1. <i>Chemicals</i>	165
2.2. <i>Biotransformation extract</i>	165
2.3. <i>Analysis of the samples by GC and GC-MS</i>	166
2.4. <i>Total antioxidant capacity: DPPH radical-scarvenging assay</i>	167
2.5. <i>Measurement of Lipid Peroxidation by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay</i>	167
2.6. <i>Inhibition of superoxide formation</i>	168
2.7. <i>Superoxide released by leukemic cells</i>	168
2.8. <i>Glutathione S-Transferase activity</i>	169
3. RESULTS AND DISCUSSION	170
3.1. <i>Biotransformation extract</i>	170
3.2. <i>Total antioxidant capacity: DPPH radical-scarvenging assay</i>	170
3.3. <i>Measurement of Lipid Peroxidation by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay</i>	172
3.4. <i>Inhibition of superoxide formation</i>	173
3.5. <i>Superoxide released by leukemic cells</i>	174
3.6. <i>Glutathione S-Transferase activity</i>	175
4. CONCLUSIONS.....	177
REFERENCES.....	178
CONCLUSÃO GERAL	180

Índice de figuras

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Estrutura do limoneno.....	17
Figura 2 - Principais rotas envolvidas na biotransformação do limoneno.....	19
Figura 3 – Estruturas de α - e β -pinenos.....	35
Figura 4 – Biotransformação de (1R)- α -pineno por cultura celular de <i>P. abies</i>	41
Figura 5 – Rotas metabólicas para biotransformação de β -pineno.....	42
Figura 6 – Biotransformação de citronelol e seus metabólitos.....	45

Capítulo 2 - Biotransformação do limoneno

Fig. 1 – Biotransformation of (R)-(+)-limonene by the <i>Fusarium oxysporum</i> strain.....	101
Fig.2. Biotransformation of limonene by induced <i>Fusarium oxysporum</i> strain in the presence of decane, developed in cassava waste water and transferred into mineral medium.....	103

Capítulo 3 - Biotransformação do citronelol

Fig. 1. Compounds recovered after the biotransformation of citronellol in CM+MM by <i>Penicillium sp.</i> strain	122
Fig. 2 - Conversion of citronellol in cis- and trans-rose oxides by <i>Penicillium sp</i> in cassava medium.....	123

Capítulo 4 - Biotransformação de α - e β -pinenos

Fig. 1 - Structures of α -, β -pinenes, verbenol, verbenone, limonene, α -terpineol and perillyl alcohol, precursors and products from the biotransformation compounds identified by GC-MS.	138
--	-----

Capítulo 5 - Biotransformação de α -farneseno

Fig 1. Biotransformation of Farnesene by <i>Aspergillus niger</i> CCT 7449 (A) and <i>Aspergillus niger</i> CCT 7450 (B).....	156
Fig.2. Distribution of biotransformation compounds between the mycelium and culture medium for 6-hydroxy-farnesene and '15.31' compounds (A); and for '16.22' and '18.84' compounds (for <i>A. niger</i> CCT 7449)	158

Capítulo 6 - Potencial antioxidante de compostos de aroma monoterpênicos

Fig 1. Radical scavenging activity of biotransformation ethyl acetate extract and monoterpene standards at different concentrations (% v/v) determined by DPPH method.	171
Fig 2. Inhibition of lipid peroxidation activity of the biotransformation extract and monoterpene standard at different concentrations by TBA method.....	173
Fig 3. Inhibition of superoxide radical formation by the biotransformation extract and the monoterpene standards.	174
Fig 4. Effects of monoterpenes on superoxide ($O_2^{\cdot-}$) released in leukemic cells stimulated by PMA.....	175
Fig. 5 – Inhibition of biotransformation extract and monoterpenes in the conversion of NPA in p-nitrophenol.....	176

Índice de tabelas

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

<i>Tabela 1. Produtos da biotransformação de α-pineno</i>	38
---	----

Capítulo 2 – Biotransformação do limoneno

<i>Table 1. Composition of orange essential oil</i>	97
---	----

<i>Table 2. Composition of the Manipueira used in this work compared with (Nitscke, 2003) and (Damasceno, 1999)</i>	98
---	----

<i>Table 3. Amounts of α-terpineol, residual non-converted limonene after the biotransformation experiments, final pH and dry matter^p</i>	99
--	----

Capítulo 3 – Biotransformação do citrônolol

<i>Table 1. Physicochemical composition of manipueira (cassava wastewater)</i>	119
--	-----

<i>Table 2. Products recovered from cassava liquid culture broths</i>	121
---	-----

Capítulo 4 – Biotransformação de α - e β -pinenos

<i>Table 1. Composition of the turpentine oil as determined by GC-MS</i>	135
--	-----

<i>Table 2. Concentration of biotransformation products in liquid medium 24, 48 and 72 hours after the first addition of turpentine oil (concentrations are the mean of triplicate experiments expressed in mg/L)</i>	140
---	-----

<i>Table 3. Concentration of biotransformation products in liquid medium 24, 48 and 72 hours after the first addition of orange essential oil (concentrations are the mean of triplicate experiments expressed in mg/L)</i>	141
---	-----

Capítulo 5 – Biotransformação de α -Farneseno

<i>Table 1. Strains used in the biotransformation of farnesene and respective origins</i>	151
---	-----

Table 2: The odor impression of the farnesene biotransformation products 159

Capítulo 6 - Potencial antioxidante de compuestos de aroma monoterpênicos

Table 1. Concentration of monoterpenes present in biotransformation broth extracted with ethyl acetate 170

Resumo Geral

Este trabalho teve por objetivos o estudo da biotransformação de terpenos e avaliação de suas propriedades biológicas. A biotransformação de limoneno foi realizada por uma linhagem de *Fusarium oxysporum* cultivada em manipueira e transferida para meio mineral, sendo o óleo essencial de laranja, um resíduo da indústria do suco de laranja, a fonte do limoneno. Rendimentos da ordem de 450 mg/L de α -terpineol, o principal produto obtido, foram alcançados. Da mesma forma, a biotransformação do citronelol foi conduzida por uma linhagem de *Penicillium sp.* cultivada em manipueira e transferida para meio mineral. O principal produto obtido foi o cis-óxido de rosa em concentrações da ordem de 70 mg/L. A seleção de microrganismos biotransformadores de limoneno (cuja fonte foi óleo essencial de laranja) α - e β -pinenos (cuja fonte foi terebentina, resíduo industrial da indústria de papel) foi realizada por microextração em fase sólida (MEFS). A técnica mostrou-se eficaz para a recuperação de voláteis presentes no 'heapspace' de culturas esporuladas de superfície para a biotransformação. Os microrganismos selecionados por MEFS foram submetidos à biotransformação em cultura líquida e produção da ordem de 50 mg/L de verbenol por *Mucor sp.* 2276 e 70 mg/L de verbenona resultaram da biotransformação de α - e β -pinenos. *Aspergillus sp.* 2357 e *Penicillium sp.* 2360 produziram aproximadamente 90 e 10 mg/L de α -terpineol e álcool perílico respectivamente. A biotransformação de α -farneseno por linhagens de *Aspergillus niger* gerou compostos nunca relatados anteriormente na literatura. Quatro produtos principais foram obtidos. Apenas um composto pôde ser identificado por meio de CG-EM como 6-OH-farneseno.

Análises de CG-olfatometria descreveram 6-OH-farneseno como aroma cítrico impactante. Estudos 'in vitro' e 'in vivo' com extrato da biotransformação de limoneno por *Fusarium oxysporum* e com padrões de monoterpenos revelaram o potencial desses compostos em atuarem como antioxidantes, gerando uma possibilidade para esses compostos serem utilizados industrialmente como aromas funcionais.

Summary

The biotransformation of terpenes and their functional properties were investigated in this study. The biotransformation of limonene was done by a *Fusarium oxysporum* strain grown in cassava waste water and transferred into a mineral medium for biotransformation. The limonene source was an orange essential oil from a orange juice industry. The main biotransformation product was α -terpineol, reaching around 450 mg/L. Similarly, biotransformation of citronellol was conducted by a *Penicillium* sp. strain grown also in cassava waste water and transferred into a mineral medium. The main product was *cis*-rose oxide, reaching concentrations higher than 70 mg/L. The screening of microorganisms for biotransformation of limonene (from orange essential oil) and α -, β -pinenes (from turpentine oil, residue from pulp industry) was done by solid phase microextraction (SPME). The technique was effective for the recovery of the volatiles from the headspace of sporulated surface biotransformation cultures. Liquid culture biotransformation experiments performed with the SPME screened strains resulted in the production of 50 mg/L of verbenol by *Mucor* sp. 2276 and 70 mg/L of verbenone from α -, β -pinenes and 90 mg/L of α -terpineol by *Aspergillus* sp. 2357 and 10 mg/L of perillyl alcohol by *Penicillium* sp. 2360. The biotransformation of α -farnesene by *Aspergillus niger* strains resulted in compounds never described in the literature before. Four main new compounds were obtained. Only one of them could be identified by GC-MS as 6-OH-farnesene. CG-O experiments revealed the impactant citrus aroma of 6-OH-farnesene. 'In vitro' and 'in vivo' experiments with the limonene biotransformation extract by *Fusarium oxysporum* and with the

monoterpene standards present in the extract revealed the antioxidant potential of these compounds, which open a new perspective for the utilization of these compounds as functional aroma compounds.

Introdução Geral

O aroma é um dos mais importantes atributos de alimentos, bebidas e cosméticos. Atualmente observa-se a preferência de consumo de alimentos que contém em sua formulação ingredientes naturais em substituição aos aditivos químicos, o que faz com que esses produtos tenham apelo de mercado diferenciado. Compostos obtidos por ação microbiana podem ser considerados "naturais", fato que promove grande aceitação por parte do consumidor; agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente (Tan, Day & Cadwallader 1998a).

A indústria de aromas foi estimada em US\$ 9,7 bilhões em 1994. Estima-se que aproximadamente 6400 voláteis naturais e 10000 compostos de fragrância sintéticos sejam conhecidos, sendo poucas centenas regularmente utilizadas em aromas e fragrâncias e cerca de 400 aromas químicos manufaturados em escala maior que uma tonelada por ano (Krings & Berger 1998).

Hidrocarbonetos terpênicos e seus derivados oxifuncionalizados (terpenóides) constituem a classe de substâncias mais diversa na natureza (Hill 1993). Os terpenos são os responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais, além de serem ótimos substratos para conversões estereoespecíficas. Terpenos já vêm sendo utilizados pela indústria de aroma sendo seu consumo mundial da ordem de $2,8 \times 10^5$ kg por ano (Welsh, Murray & Williams 1989). Hidrocarbonetos terpênicos são geralmente rejeitos industriais e não possuem alto valor agregado, sendo economicamente viáveis para aplicação em bioconversões/biotransformações,

que os convertem em produtos de maior importância industrial. Os progressos na biotecnologia podem levar à utilização de rejeitos da indústria nacional produzindo compostos de alto valor agregado para utilização nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (Berger 1995).

Apesar disso, dentre os 60-100 compostos de aroma e fragrância produzidos biotecnologicamente em escala industrial, poucos terpenóides estão entre eles, apesar de suas características sensoriais únicas e crescente demanda. As principais razões para tal baseiam-se na natureza química das substâncias e nas moléculas de interesse: baixa solubilidade, alta volatilidade e citotoxicidade dos terpenos e terpenóides impedem bioprocessos convencionais (Schrader & Berger 2001).

A biotransformação de monoterpenos pode resultar em compostos de alto valor na indústria de aromas e fragrâncias (Berger 1995). Uma das vantagens das reações de biotransformação é a redução dos impactos ambientais quando comparados com sínteses químicas por emitirem menor carga de resíduos industriais, por produzirem resíduos e produtos biodegradáveis. As transformações microbianas têm a seu favor a natureza régio e estéreo seletiva das reações enzimáticas, permitindo o direcionamento do sistema de reação para obtenção de um produto definido. Isto pode ser significativo na produção de aromas naqueles casos em que isômeros óticos de uma substância particular exibem diferentes propriedades sensoriais entre si (Gatfield 1988).

Atualmente, os processos de biotransformação podem apresentar as seguintes vantagens (Berger 1995): modificação específica da estrutura do substrato via reações de transformação; degradação parcial de substratos em

metabólitos importantes pelo controle dos caminhos das reações microbianas e extensão da estrutura do substrato pelo uso de reações de biossíntese a estruturas artificiais.

Além de suas propriedades relativas a aromas e fragrâncias, alguns terpenóides vêm sendo reconhecidos por suas propriedades funcionais. Investigações revelam que compostos como limoneno, álcool perílico e carvona possuem ação na prevenção de doenças degenerativas. Além disso, alguns desses compostos estão sendo estudados como quimioterápicos.

Tendo em vista suas múltiplas funções como aditivos em alimentos e crescentes elucidacões a respeito de suas atividades funcionais e biológicas, pesquisas relacionadas a essas substâncias receberão grande atenção nos próximos anos (Schrader & Berger 2001).

Este trabalho teve como objetivos:

- selecionar linhagens de fungos filamentosos com potencial para a biotransformação de terpenóides em compostos de aroma e com atividade biológica;
- utilizar alguns resíduos industriais como fonte de terpenóides
- utilizar manipueira como meio de cultura para a biotransformação
- estudar algumas atividades biológicas do extrato da biotransformação de limoneno por uma linhagem de *Fusarium oxysporum*.

Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

O consumo de alimentos e bebidas está inseparavelmente ligado à estimulação dos sentidos humanos. A sensação de odor (cheiro) de um alimento é formada por misturas complexas de moléculas pequenas e geralmente hidrofóbicas de muitas classes químicas que ocorrem em concentrações traços e são detectadas por células do epitélio olfativo da cavidade nasal. Compostos de aroma estão intimamente relacionados à aceitação de alimentos por parte dos consumidores.

As novas preocupações dos consumidores relativas à alimentação e saúde têm aberto novas possibilidades para compostos rotulados como 'naturais' (Berger 1995).

De acordo com a legislação europeia, aroma ou misturas de aromas são considerados 'naturais' quando são obtidos de fontes naturais por processos físicos ou fermentativos. Nos Estados Unidos, compostos de aroma separados de um alimento ou gerados durante aquecimento ou processamento por atividade enzimática ou fermentação (sendo que o composto gerado deve ser idêntico ao já existente na natureza) são exigências para que a substância seja legalmente rotulada como 'natural'. Essas regulamentações certamente abrem oportunidades para processos biotecnológicos de obtenção de compostos de aroma (Serra, Fuganti & Brenna 2005; Berger 1995).

Compostos de aroma são obtidos atualmente por dois processos principalmente: síntese química e extração de fontes naturais. As sínteses químicas geralmente criam altos impactos ambientais por emitirem certa carga de

resíduos não-biodegradáveis. Aromas extraídos diretamente de plantas estão sujeitos a instabilidades advindas da sazonalidade, ataque de pragas e efeitos geográficos. Os processos biotecnológicos, por outro lado, em geral não emitem alta carga de resíduos e estão menos sujeitos a variações sazonais, oferecendo algumas vantagens sobre alguns dos processos existentes para a produção de compostos de aroma (Janssens, De Pooter, Schamp & Vandamme 1992).

Do ponto de vista econômico, uma possibilidade para a produção de aromas por bioprocessos é a utilização de terpenos. Terpenos ocorrem largamente na natureza. Limoneno e α -pineno são baratos e originados em grande escala por serem rejeitos industriais. Nas plantas, os monoterpenos exercem um papel fungicida e atraem polinizadores (Langenheim 1994). Em mamíferos, alguns monoterpenos estão envolvidos em estabilização de membranas celulares, rotas metabólicas e reguladores de reações enzimáticas. Por exemplo, o colesterol e esteróides relacionados são triterpenos derivados de seis unidades de isopreno. Monoterpenos presentes em ervas e plantas superiores têm sido utilizados por séculos para gerar aromas e fragrâncias. Terpenos têm recebido atenção crescente por causa do esclarecimento de seu papel na prevenção de doenças, sua atividade como inseticidas naturais e agentes antimicrobianos (de Carvalho & da Fonseca 2006).

Esses fatores, aliados ao interesse por aromas naturais em vez de aromas sintéticos, levaram a um aumento de investigações focadas em produção biotecnológica dos denominados 'bioaromas'. A maioria dos compostos de aroma utilizados no mundo (aproximadamente 80%) utiliza processos químicos para sua

obtenção. Entretanto, observa-se uma nova tendência em países desenvolvidos, como a Alemanha, onde 70% de todos os compostos de aroma utilizados em alimentos são 'naturais' (Demyttenaere, van Belleghem & Kimpe 2001). Diferentemente dos processos químicos, que requerem temperaturas e pressões extremas, as conversões microbianas ocorrem sob condições brandas, e em alguns exemplos, os produtos são formados estereosseletivamente (Chatterjee & Bhattacharyya 2001).

Em princípio há dois modos de se produzir compostos de aroma biotecnologicamente: síntese de novo e biotransformação/bioconversão. O primeiro modo implica na produção de compostos de aroma utilizando meios de cultura simples sem nenhuma adição de substratos especiais; já o segundo refere-se à síntese de um ou vários compostos de aroma pela adição de seus precursores ao meio de cultura. Enquanto a síntese de novo utiliza todo o arsenal metabólico do microrganismo e em geral produz uma mistura de vários compostos de aroma que são importantes para a formação do aroma ou *bouquet* do produto, a biotransformação/bioconversão tem por objetivo a obtenção de um produto principal. A síntese de novo de compostos de aroma alvo não possui rendimentos aceitáveis do ponto de vista industrial. Enzimas microbianas, no entanto, tanto construtivas quanto indutivas, podem ser responsáveis pela formação de compostos de aroma em um único passo reativo (Berger 1995).

Em geral, os compostos voláteis produzidos por microrganismos são metabólitos secundários, isto é, não são essenciais para seu metabolismo. Os ésteres formados por fungos e leveduras são exemplos de metabólitos secundários, cuja produção seria responsável pela remoção de ácidos e álcoois

da célula e do meio, pois o acúmulo destes compostos poderia ser tóxico para a célula. Metabólitos secundários contribuem para a sobrevivência do microrganismo, podendo inibir competitivamente espécies que poderiam ocupar o mesmo nicho. Sugeriu-se que, para os fungos filamentosos, a liberação de voláteis no ambiente ajudaria a regular seus competidores e estimularia a germinação de esporos. Microrganismos que produzem metabólitos secundários geralmente apresentam um período de crescimento logarítmico, durante o qual a síntese de metabólitos secundários é desprezível. Quando a cultura está na fase estacionária, normalmente a produção destes metabólitos é aumentada (Berger, 1995).

As biotransformações são capazes de catalisar a transformação do substrato num único passo, enquanto as bioconversões se desenvolvem em duas ou mais reações bioquímicas. 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 (Berger 1995).

Compostos lipofílicos, como terpenóides, são preferencialmente dissolvidos nos sistemas de membranas de células de fungos. Terpenóides, além de outros compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alcanos e fenóis, induzem mudanças das propriedades de membrana, causando efeitos tóxicos. Os fungos reagem a esses efeitos co-metabolizando esses compostos lipofílicos a compostos mais solúveis em água ou a H_2O e CO_2 , utilizando substratos facilmente metabolizáveis (como a glicose) como fonte de carbono. Os sistemas enzimáticos envolvidos nesse processo de detoxificação são comparáveis àqueles de outras células eucarióticas. No primeiro passo,

monoxigenases do citocromo P450 catalisam a oxifuncionalização da molécula e, no segundo passo, produtos mais solúveis em água são formados por hidrólise (epóxi hidrolases) ou conjugação (por ação da Glutathione S-transferase). Esses produtos são geralmente excretados para o meio (Onken & Berger 1999).

A biotransformação de terpenos é de grande importância por possibilitar a produção de aromas e fragrâncias enantiomericamente puros sob condições brandas de reação. Além disso, de acordo com os termos das legislações européia e norte americana, esses compostos obtidos por biotransformação podem ser considerados naturais (Berger 1995).

Muitos estudos descrevem a biotransformação de terpenos utilizando enzimas, extratos celulares e células inteiras de bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos e plantas (de Carvalho & da Fonseca 2006).

Os capítulos a seguir apresentam elementos de alguns dos principais trabalhos relacionados à biotransformação de limoneno, α - e β -pinenos e citronelol assim como evidências relativas às atividades funcionais de alguns monoterpenos.

1. Biotransformação do limoneno

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, um monoterpeno monocíclico faz parte da estrutura de mais de 300 vegetais (Burdock 1995). Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. *S*-(-)-limoneno é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto *R*-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos

das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, sendo a prevenção da desidratação e inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (Demyttenaere & De Kimpe, 2001).

No caso dos óleos essenciais dos cítricos em geral, o *R-(+)*-limoneno é o seu mais expressivo componente, atingindo concentrações de 90 a 96% (Nonino 1997; Berger, Krings & Zorn 2002). Aproximadamente 50 mil toneladas de *R-(+)*-limoneno são recuperados como subproduto da indústria cítrica mundial ao ano (Nonino 1997; Berger, Krings & Zorn 2002). O limoneno é geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência a autoxidação e polimerização, e formação de '*off-flavors*', tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial (Berger, Krings & Zorn 2002). Além disso, existem diversas aplicações para o limoneno, como solvente para resinas, síntese de outros compostos químicos, aplicações em borracha, tintas, agente dispersante para óleo além da utilização na síntese química do mentol (<http://www.abecitrus.com.br>).

O período entre 1945 e 1960 marcou o início da indústria de suco de laranja na Flórida; o que levou a um aumento na porcentagem de laranjas destinadas ao suco concentrado de menos de 1% para 80%. A conseqüente disponibilidade de grandes quantidades de *R-(+)*-limoneno de baixo custo (US\$ 1–2/kg) interessou a químicos e biólogos. Isso se explica, principalmente, pelo fato de alguns compostos medicinais e de aroma possuírem fórmulas estruturais semelhantes ao limoneno, sugerindo grande potencial para utilização industrial desse rejeito produzido em grandes quantidades (Duetz, Bouwmeester; Beilen & Witholt 2003).

Como exemplo, pode-se citar alguns de seus derivados mais notáveis como os compostos oxigenados α -terpineol, álcool perílico, carveol, carvona e mentol. Mentol e carvona são compostos de aroma extensivamente utilizados, sendo que o álcool perílico vem ganhando destaque crescente devido às comprovações relacionadas a seu poder de prevenção de doenças degenerativas. Portanto, a utilização de *R*-(+)-limoneno para síntese de compostos de aroma e compostos funcionais pode ser considerada promissora do ponto de vista econômico. Assim sendo, a biotransformação catalítica de *R*-(+)-limoneno em compostos de aroma como carvona e álcool perílico foi considerada desde os anos 60 por duas vantagens principais: grandes regioespecificidade e enantioespecificidade enzimáticas, fazendo com que numerosos microrganismos e células de plantas fossem descritos como transformadores deste monoterpeno (Duetz, Bouwmeester, Beilen & Witholt 2003).

Entretanto, a grande maioria dos estudos de biotransformação de monoterpenos descritos até o momento são apenas acadêmicos, sendo inviáveis do ponto de vista industrial, pois sua aplicação direta em maiores escalas esbarra nos baixos rendimentos devido à volatilidade do substrato e toxicidade do limoneno aos microrganismos em geral (Chatterjee & Bhattacharyya 2001).

1.1. Problemas da biocatálise

A toxicidade dos microrganismos ao precursor limoneno e a multiplicidade dos metabólitos originados da biotransformação do monoterpeno resultam em baixas concentrações dos produtos finais e intermediários, elevando os custos da

recuperação dos compostos gerados. Adicionalmente, um longo tempo de fermentação é necessário para que os produtos se acumulem em grandes quantidades, o que contrasta diretamente com a necessidade de um curto tempo de fermentação, uma vez que o substrato monoterpênico (o limoneno) possui alta instabilidade e volatilidade (Speelmans, Bijlsma & Eggink 1998).

1.2. O baixo rendimento dos processos de biotransformação

Os compostos de aroma estão freqüentemente presentes em baixas concentrações nos sistemas fermentativos, resultando em alto custo para os processos de recuperação (isso pode ser compensado pelo alto preço dos aromas naturais, de 10 a 100 vezes maiores que os sintéticos) (Janssens, De Pooter, Schamp & Vandamme 1992). Muitos estudos revelam o efeito inibidor do limoneno em vários microrganismos. Além disso, alguns autores relatam que o limoneno diminui a velocidade do processo de fosforilação oxidativa nas células (Chatterjee & Bhattacharyya 2001). Log P (coeficiente de partição octanol-água) é utilizado como medida estabelecida da toxicidade de microrganismos a solventes orgânicos imiscíveis em água. As toxicidades mais fortes foram observadas em valores de log P entre 1 e 5. Compostos como o limoneno (com log P = 4,83) aumentam a fluidez das membranas dos fungos filamentosos, o que leva a permeabilidade não específica, perda de integridade celular, decréscimo de matéria seca e inativação da energia metabólica devido à dissipação da força próton motiva (gradiente eletroquímico de H⁺ através da membrana) (Onken & Berger 1999). A alta fluidez da membrana pode prevenir a manutenção dos complexos entre enzima e

membrana como, por exemplo, o complexo formado entre citocromo P450 monoxigenase e citocromo P-450 redutase dependente de NADPH, que está envolvido nas transformações oxidativas de terpenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróides e outros compostos lipofílicos, promovidas por fungos filamentosos (Onken & Berger 1999).

1.3. Problemas relacionados à recuperação dos produtos da biotransformação

Downstream processing significa isolamento, concentração e purificação de um produto. O sistema de destilação ou extração em batelada, padrão nas indústrias de biotecnologia, requer operações em grandes volumes. A volatilidade e baixa solubilidade em água de muitos compostos de aroma tornam sua recuperação difícil de ser realizada. Por outro lado, existe um limite superior para a concentração do produto final no meio de fermentação por causar inibição e toxicidade aos microrganismos (Janssens, De Pooter, Schamp, & Vandamme 1992). Pelo fato de os produtos biotransformados se encontrarem presentes em pequenas concentrações, esse processo torna-se custoso. Quatro razões sugerem a extração de bioaromas *in situ* utilizando avançadas técnicas de separação (Berger 1995.).

1. Perda de produtos por volatilização;
2. Instabilidade bioquímica do produto na presença das células;
3. Fenômeno de inibição;
4. Concentração de produto não constante nas bateladas;

Há, portanto, a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais específicas aplicáveis *in loco* e em condições de esterilidade. Aromas muito voláteis, como ésteres de baixo peso molecular, são os que mais necessitam desse tipo de tecnologia.

1.4. Rotas metabólicas envolvidas na biotransformação do limoneno

A introdução regioespecífica de grupos carbonilas ou hidroxilas por meio de reações químicas é difícil devido às propriedades eletrônicas similares dos grupos metilas presentes nos carbonos 3 e 6 e nos carbonos 7 e 10 do limoneno (Figura 1) (Onken & Berger 1999).

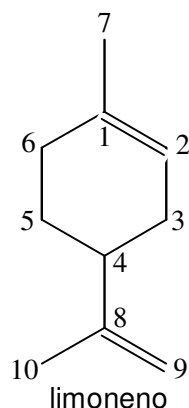


Figura 1 – Estrutura do limoneno (Duetz, Bouwmeester, Beilen & Witholt 2003)

Conseqüentemente, a oxidação química clássica gera mistura de produtos. Um exemplo representativo é a oxidação alílica do limoneno utilizando dióxido de selênio que produz limonen-4-ol, *trans*-carveol, *cis*-carveol, álcool perílico e limonen-10-ol. Entretanto, há uma exceção: limoneno pode ser convertido exclusivamente a carvona por meio da reação com cloreto de nitrosila.

Dessa forma, o processo biotecnológico apresenta a vantagem de ser regido por reações enzimáticas, as quais se diferenciam da síntese química por serem enantio e regioespecíficas. Por essa razão, a oxidação enzimática do limoneno foi primeiramente estudada nos anos 60 por Dhavalikar & Bhattacharyya (1966). Posteriormente a esse estudo, grande número de metabólitos foi isolado e identificado e vários microrganismos e células de plantas foram classificados como capazes de transformar o limoneno em compostos de interesse, demonstrando que o monoterpene em questão é facilmente atacado pelo sistema enzimático de certos microrganismos. Entretanto, pouco sucesso tem sido alcançado na tentativa de converter os dados laboratoriais em processos industriais.

Os últimos cinco anos têm visto significativos progressos no campo da biotransformação de limoneno, especialmente no que se refere à regioespecificidade da biocatálise por microrganismos. Trabalhos recentes descrevem hidroxilação das posições 3 (resultando em isopiperitenol), 6 (produzindo carveol e carvona) e 7 (álcool perílico, aldeído perílico e ácido perílico como produtos). Progressos consideráveis têm sido atingidos na caracterização de limoneno-hidroxilases de plantas e clonagem dos seus genes codificantes (Duetz, Bouwmeester; Beilen & Witholt 2003).

Seis rotas principais de conversão do limoneno podem ser distintas:

1. oxidação do substituinte metila em compostos perílicos;
2. conversão da dupla ligação do anel ao diol correspondente;
3. oxidação alílica a *cis*, *trans* carveóis e carvona;
4. epoxidação da ligação dupla na unidade isoprenil a α -terpineol;

5. oxidação alílica a isopiperitenol;
6. epoxidação da ligação 8,9 a limoneno-8,9-epóxido.

A figura 2 apresenta algumas das principais rotas envolvidas na biotransformação do limoneno.

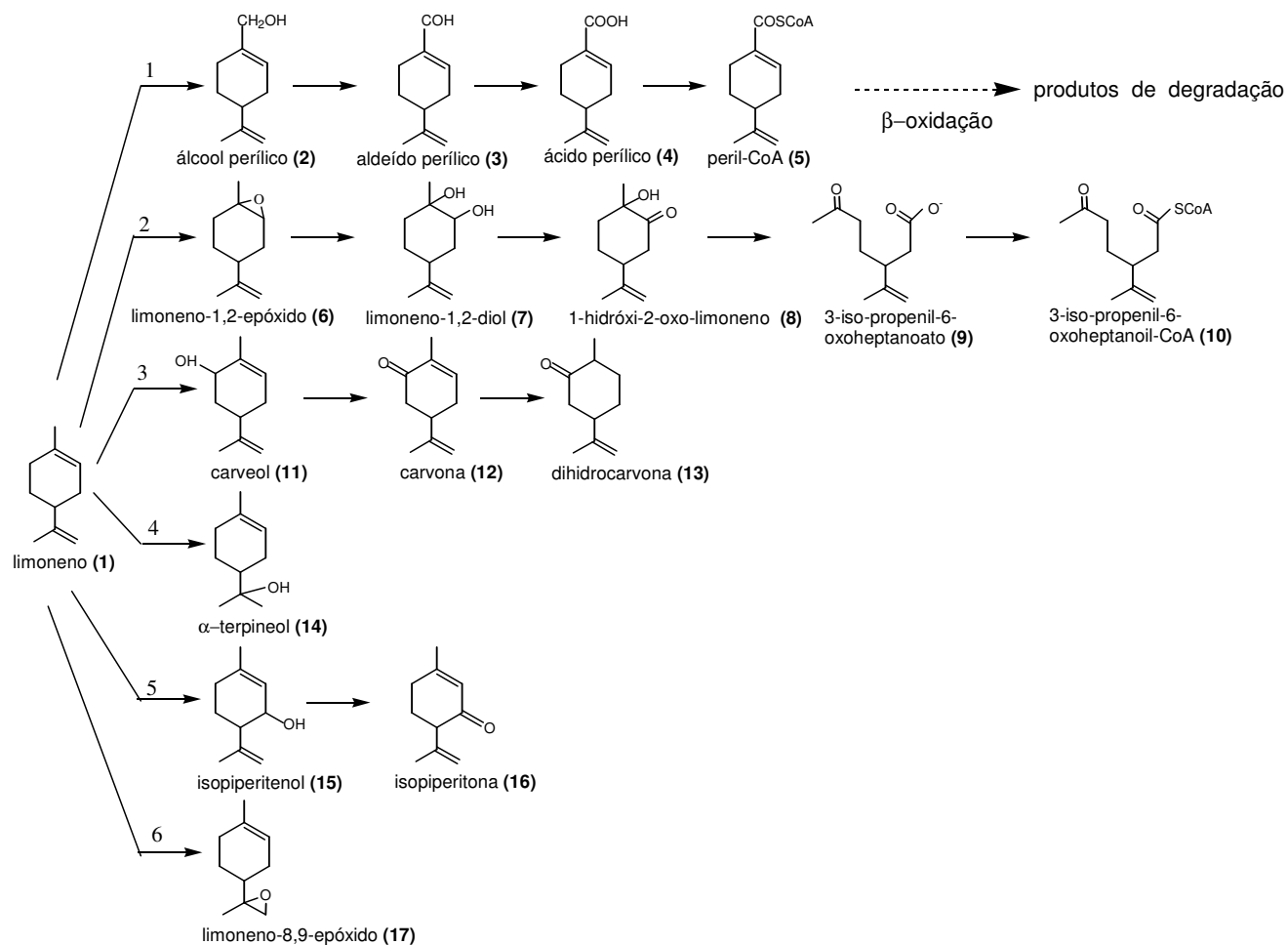


Figura 2 - Principais rotas envolvidas na biotransformação do limoneno (van der

Werf, Swarts & de Bont 1999; <http://umbbd.ahc.umn.edu>).

1.4.1. Oxidação do substituinte metila a compostos perílicos

Primordialmente 3 substâncias de interesse industrial são resultantes do ataque da posição 7 do limoneno **(1)** (rota 1 da figura 2). São elas: álcool perílico **(2)**, aldeído perílico **(3)**, e ácido perílico **(4)**.

O composto **(2)** é de particular importância uma vez que várias investigações têm relatado que essa substância, que também pode ser obtida pela extração de lavanda (*Lavandula angustifolia*), possui propriedades preventivas contra câncer de fígado, mama e pulmão (Chatterjee & Bhattacharyya 2001). Segundo ensaios “in vivo”, **(1)** e **(4)** têm demonstrado inibição da metástase em células de ratos (Raphael & Kuttan 2002).

Um vasto número de estudos tem estabelecido que alguns isoprenóides como **(1)**, **(2)**, além de γ -tocoferol, β -ionona, e farnesol apresentam propriedades de inibição da formação de tumores. Isoprenóides têm se mostrado capazes de diminuir o crescimento de vasto número de tumores animais, incluindo células leucêmicas, melanomas, tumores pancreáticos e hepatomas. Ratos alimentados com 1% da dieta com **(2)** apresentaram uma taxa de regressão do tumor de 55%. Nesse estudo, conclui-se que o monoterpeneo **(2)** é um candidato excelente para tratamento terapêutico de câncer humano (Crowell 1999). Recentemente, foi evidenciado o uso de **(2)** e seus derivados monoterpênicos (utilizados isoladamente ou em combinação com agentes imunodepressivos como ciclosporina A e azatioprina) para tratamento de pacientes submetidos a transplante de órgãos (Imagawa & Ming-Sing, 2000). Relata-se que esses compostos são capazes de promover uma redução no nível de rejeição.

Investigações relatam a biotransformação de **(1)** com obtenção dos compostos perilicos por linhagens de leveduras (van Rensburg, Moleleki, van der Walt, Botes & van Dyk 1997), fungos filamentosos (*Penicillium digitatum*) e, principalmente, por bactérias (Chatterjee & Bhattacharyya 2001; Speelmans, Bijlsma & Eggink 1998; Dhavalikar & Bhattacharyya 1966; Cadwallader, Braddock, Parish & Higgins 1989; Chang & Oriel 1994; Cheong & Oriel 2000).

Uma estratégia comum para a seleção de linhagens de bactérias com potencial biotransformador de **(1)** é a utilização de técnicas de enriquecimento de cultura utilizando o substrato limoneno **(1)** como única fonte de carbono (Speelmans, Bijlsma & Eggink 1998; Dhavalikar & Bhattacharyya 1966; Cadwallader, Braddock, Parish & Higgins 1989; Chang & Oriel 1994; Dhavalikar, Rangachari & Bhattacharyya 1966).

O primeiro relato de biotransformação de **(1)** a compostos perilicos foi realizado por Dhavalikar e Bhattacharyya (1966). Os autores descrevem biotransformação de *R-(+)-(1)* por meio de uma linhagem de *Pseudomonas* isolada de uma amostra de solo. Relata-se a formação de outros compostos de interesse industrial como carveol **(11)**, carvona **(12)** e dihidrocarvona **(13)** (Dhavalikar & Bhattacharyya 1966). Cadwallader, Braddock, Parish & Higgins (1989) selecionaram uma linhagem de *Pseudomonas gladioli* capaz de biotransformar **(1)** a **(4)** e α -terpineol **(14)**. A concentração de **(4)** atingiu 1861 ppm no quarto dia de contato com o substrato terpênico e posteriormente sofreu um rápido decréscimo, sendo que no sétimo dia não podia mais ser detectado (van Rensburg, Moleleki, van der Walt, Botes & van Dyk 1997). Em 1992, relatou-se a

biotransformação de *R-(+)* e *S-(-)*-**(1)** respectivamente a *R-(+)*- e *S-(-)*-**(2)** por uma linhagem de *Aspergillus cellulosa* (Noma, Yamasaki & Asakawa 1992).

Já uma linhagem de *Bacillus stearothermophilus* BR388 isolada da casca de laranja foi capaz de metabolizar **(1)** como única fonte de carbono (mostrando resistência ao substrato, suportando concentração máxima de 0,15% do monoterpeno), mas degradou **(1)** mais eficazmente na presença de extrato de levedura. **(2)** foi o composto produzido em maior quantidade, atingindo concentração máxima de 200 mg/L (Chang & Oriel 1994). Um fragmento cromossomal de 9,6 kb da mesma linhagem foi inserido em *E.coli*, a qual foi capaz de metabolizar **(1)** nos mesmos produtos obtidos com a linhagem bacilácea (Noma & Asakawa 1992). Num estudo posterior, o mesmo grupo de estudo inseriu um fragmento de 3,6 kb da mesma linhagem em *E.coli*, resultando na biotransformação do *R-(+)*-**(1)** a **(2)** e **(12)**, sendo **(12)** formada pela ação de uma desidrogenase não específica da linhagem de *E.coli* (Cheong & Oriel 2000). A produção de **(4)** em alta concentração (3 g/L) foi descrita (Speelmans, Bijlsma & Eggink, 1998). Linhagens identificadas como *Pseudomonas putida* possuem a capacidade de adaptar sua membrana pela conversão de ácidos graxos *cis*- para *trans*- na presença de solventes como tolueno e estireno. Linhagens resistentes a solventes são excelentes candidatos para realizar a conversão de **(1)** uma vez que se mostram mais resistentes ao acúmulo de terpenóides tóxicos. Os autores revelam que glicerol foi necessário como co-substrato para crescimento e produção de **(4)**, sendo ótima a combinação de 150 mM de **(1)** e 50mM de glicerol.

O uso de amônia ou uréia como fonte de nitrogênio, revelou-se como fator de grande importância à bioconversão. As condições de 30 a 34°C e pH=7, assim

como a utilização de emulsificantes, foram determinantes para o acúmulo do produto de interesse, o qual não sofreu etapas de metabolização subseqüentes a outros compostos, apresentando-se quimicamente estável, sendo, ainda, o **(4)** o único composto resultante da conversão (Speelmans, Bijlsma & Eggink, 1998).

Uma outra linhagem de *Pseudomonas putida* MTCC 1072 oxidou **(1)** a **(2)** e *p*-ment-1-eno-6,8-diol com rendimentos de 36 e 44% respectivamente, sendo que não foram observadas degradações subseqüentes. Os autores relatam que a linhagem é resistente a uma concentração de **(1)** de 0,2% (v/v), sendo que na concentração de 0,5% (v/v) os rendimentos sofreram uma redução significativa. Relata-se também que o pH tem forte influência na conversão, sendo o pH=5,0 o valor ótimo, observando-se ainda queda brusca na atividade a valores de pH=3,0 e 7,0 (Chatterjee & Bhattacharyya 2001).

Trytek & Fiedurek (2005) relatam a biotransformação de **(1)** a **(2)** e **(4)** a partir de uma linhagem de fungo filamentoso psicrotrófico, *Mortierella minutíssima* 01, isolada de uma amostra de solos árticos. Relata-se que a linhagem foi selecionada por melhor se desenvolver em placas de Petri contendo ágar em contato com vapor de **(1)**. A produção de outros compostos como **(11)** e **(12)** além de óxido-de-limoneno, indica que a linhagem é capaz de atacar o monoterpene em diferentes posições. Os autores relatam que a hidroxilação da posição C-6, gerando **(11)**, parece ser favorecida a 30°C em comparação a 15°C, a qual mostrou-se mais eficiente para a hidroxilação da posição C-7, gerando **(2)**. A linhagem mostrou resistência a concentrações de 0,8% (v/v) de **(1)**, sendo que um aumento em sua concentração para 1,2% gerou inibição. Os autores defendem que biotransformação a baixas temperaturas com microrganismos psicrotróficos

pode ser vantajosa por um lado por evitar a evaporação do substrato, por outro lado apresenta o empecilho do lento desenvolvimento da linhagem (Trytek & Fiedurek 2005).

1.4.2. Conversão da dupla ligação do anel ao diol correspondente

Recentemente a rota de degradação de **(1)** ao seu diol correspondente foi confirmada por meio de estudos bioquímicos com uma linhagem de *Rhodococcus erythropolis* submetida a **(1)** como única fonte de carbono (van der Werf, Swarts & de Bont 1999). Observou-se que a linhagem inicia seu ataque com a epoxidação da ligação dupla 1,2 do anel (pela limoneno-1,2-monoxigenase), sendo que a hidrólise de limoneno-1,2-epóxido **(6)** a limoneno-1,2-diol **(7)** foi catalisada por uma limoneno-1,2-epóxido-hidrolase muito ativa e indutível (enzima indutível é aquela expressa apenas em presença do seu substrato). As degradações subsequentes dão origem a 1-hidróxi-2-oxo-limoneno **(8)**, que se rearranja espontaneamente a 3-iso-propenil-6-oxoheptanoato **(9)** (<http://umbbd.ahc.umn.edu>). Ambos os enantiômeros de **(1)** foram degradados analogamente, mas as configurações estereoquímicas dos intermediários de *R*-(+) e *S*-(-)-**(1)** são opostas, sendo que as atividades das mesmas enzimas foram detectadas na biotransformação de ambos os enantiômeros, o que sugere que as enzimas envolvidas apresentaram enantio e estereoespecificidades. Este foi o primeiro relato de microrganismos que metabolizam **(1)** por meio de uma rota iniciada pelo ataque de sua ligação dupla 1,2. Essa substância não possui aroma impactante, mas pode ser utilizada para sínteses posteriores.

Há relatos anteriores de ser **(7)** o produto de biotransformação majoritário em leveduras e fungos filamentosos e um produto minoritário obtido pela biotransformação com linhagens de bactérias (van der Werf, Swarts & de Bont 1999). Uma linhagem de *Cladosporium* sp também se mostrou capaz de atacar a ligação 1,2 de **(1)** resultando em *cis*- e *trans*-diol **(7)** como produtos principais gerando concentrações finais de 0,2 e 1,5 g/L, respectivamente, após 4 dias de fermentação (Kraidman, Mukherjee & Hill 1969). O mesmo composto foi obtido utilizando uma linhagem de fungo filamentoso, *Corynespora cassiicola* DSM 62475. Do ponto de vista da produtividade, esta foi uma das mais interessantes aproximações práticas relatadas até então: em um fermentador de 70 L, 1,3 kg de **(1)** foram transformados em 900 g de produto em 96 h de fermentação (Abraham, Stumpf & Kieslich 1986). Um outro estudo de seleção com mais de 60 linhagens também resultou na formação de *cis*- e *trans*-diol **(7)** a partir de *R*-(+)- e *S*-(-)-**(1)** por uma linhagem de *Corynespora cassiicola* com rendimentos de 50% aproximadamente (Demyttenaere, van Belleghem & De Kimpe 2001).

1.4.3. Oxidação alílica a *cis*, *trans* carveóis e carveona

A oxidação da posição 6 de **(1)** pode gerar substâncias de relevada importância industrial como **(11)** e **(12)**. O composto **(12)** ocorre nas formas *R*-(+) e *S*-(-) e seus isômeros diferem consideravelmente em suas propriedades sensoriais. Eles existem em altas porcentagens em grande número de óleos essenciais. *R*-(+)-**(12)** é o componente principal do óleo de alcarávia (presente em concentrações de 60%, aproximadamente), enquanto *S*-(-)-**(12)** ocorre em óleo de hortelã numa concentração de 70 a 80% (Bauer, Garbe & Surburg 1990). Ambos

os isômeros são utilizados como compostos de aroma em alimentos e bebidas. *S*-(-)-(12) é produzida em maiores quantidades, sendo utilizada em produtos de higiene bucal (Ohloff 1994).

Monoterpenóides quirais são importantes para o balanceamento do *bouquet* de muitos óleos essenciais e aroma de frutas. Por exemplo, uma mistura de (-)-linalol, (-)-citronelol, (-)-*cis*-óxido de rosa, (-)-mentol e *R*-(+)-(12) é a base molecular para o aroma de óleo de Rosa Bulgária, um composto de aroma com potencial utilização pela indústria de aromas e fragrâncias (Ohloff 1994).

Além disso, (11) e (12) parecem atuar no organismo humano como antioxidantes, e, segundo recentes investigações, encontram-se em vários compostos que podem servir de coadjuvantes para tratamento e prevenção do processo de envelhecimento (Kawasaki 2004). O ataque da posição C-6 de (1) foi relatada primeiramente em 1966 pelo pioneiro grupo indiano, em cujo estudo relata-se a obtenção de (11), (12) e (13) (Dhavalikar & Bhattacharyya 1966). Foi estudada a transformação de (1) por linhagens de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* isolados de frutas cítricas. *Penicillium italicum* apresentou um rendimento de conversão de 80% de (1) quando sua concentração inicial foi 0,5% (v/v), sendo que concentrações maiores que essa foram inibitórias. Transformações por *P. italicum* resultaram em: *cis*- e *trans*-(11) como produtos principais com 26%, (12) com 6%, *cis* e *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol a 18%, *p*-menta-1,8-dien-1-ol a 4%, (2) a 3% e *p*-menta-8-eno-1,2-diol a 3% (Kawasaki 2004). Um estudo mais recente mostrou o potencial de uma linhagem de um basidiomiceto, *Pleurotus sapidus*, ao transformar regioespecificamente *R*-(+)-(1) em *cis,trans*-(11) e *R*-(+), *S*-(-)-(12) como produtos principais. O substrato foi

adicionado com 2,5 dias de crescimento até o quarto dia sendo a biotransformação estendida até 12 dias pela adição do substrato em fase gasosa. Os rendimentos foram aumentados com a realização do pré-cultivo em presença de **(1)**. Depois de 2 dias de fermentação, 97% do substrato se acumulou no micélio, e 3% ficaram no meio de cultura. Em contrapartida, os produtos se acumularam em concentrações três a quatro vezes maiores no meio aquoso em relação ao micélio. Após 12 dias de cultivo, as concentrações de **(11)** e **(12)** atingiram valores ao redor de 70 e 30 mg/L, respectivamente, quando o substrato terpênico foi adicionado na forma gasosa. Os autores relatam que o pré-cultivo realizado em presença de **(1)** não aumentou a capacidade de crescimento do microrganismo, mas a taxa de biotransformação e concentrações máximas dos produtos foram mais de duas vezes maiores para **(11)** e três a quatro vezes maiores para **(12)** comparando-se aos testes sem a pré-adaptação. A adaptação do microrganismo pode ser devida a dois fatores: adaptação geral do metabolismo e/ou indução das enzimas envolvidas pela adição do substrato (Onken & Berger 1999). Entretanto, até o momento, as enzimas de plantas têm demonstrado a maior regioespecificidade. A enzima limoneno-6-hidroxilase isolada do microsomo de uma espécie de *Menta spp* foi capaz de converter o *S*-(-)-**(1)** em **(11)** (Haudenschild, Schalk, Kamp & Croteau 2000; Carter, Peters & Croteau 2003; Lupien, Karp, Wildung & Croteau 1999). Um outro exemplo é a oxidação de *R*-(+)-**(1)** às misturas racêmicas de **(11)** e **(12)** pelas espécies *Solanum aviculare* e *Dioscorea deltoidea*. Observou-se que as células de *S. aviculare* foram capazes de transformar 34% do **(1)** adicionado em **(12)** (mistura racêmica). Apesar da alta regioespecificidade, observa-se que a atividade das células vegetais em geral

ainda é insuficiente para uma aplicação de um processo em escala industrial (Vanek, Valterova, Vankova & Vaisar 1999).

Uma linhagem de bactéria, *Rhodococcus opacus* PWD4, foi capaz de hidroxilar **(1)** exclusivamente na sua posição 6, gerando (+)-*trans*-**(11)** como único produto, com rendimento final de 94 a 97%. Os pesquisadores realizaram o cultivo das células em presença de tolueno como única fonte de carbono e energia. Destaca-se que a mesma linhagem desenvolvida em glicose como única fonte de carbono não foi capaz de biotransformar **(1)**, sugerindo-se que uma das enzimas envolvidas na degradação do tolueno pode ser responsável pela biotransformação de **(1)**. Os autores sugerem que uma possível candidata seja a tolueno-2,3-dioxigenase (Duetz, Fjallman, Ren, Jourdat & Witholt 2001).

1.4.4. Epoxidação da ligação dupla na unidade isoprenil a α -terpineol

O α -terpineol **(14)** é um importante produto comercial. Pequenas quantidades do terpenóide são encontradas em muitos óleos essenciais (por exemplo, em coníferas e óleos de lavanda); enquanto β -, γ - e δ -terpineol não ocorrem largamente na natureza. *S*-(-)-**14** ocorre na espécie *Pinus palustris* Mill., apresentando-se em concentração menor de 60% em seu óleo essencial. (*S*)-(-)-**(14)** possui um odor caracteristicamente conífero enquanto *R*-(+)-**14** tem aroma floral intenso, com *threshold* de 350 ppb. Apesar do **(14)** ocorrer em muitos óleos essenciais, apenas pequenas quantidades são isoladas, por exemplo, por destilação fracionada de óleos de pinho. Tem aplicações importantes, como estabilidade, sendo utilizado em sabonetes e cosméticos. Está presente nos óleos

essenciais de *grape fruit*, bergamota e lima em concentrações variáveis (Bauer, Garbe & Surburg 1990).

Reconhecidamente, **(14)** é um interessante produto final da bioconversão de **(1)**. Esse processo tem sido descrito utilizando-se uma grande variedade de microrganismos como catalisadores. O primeiro relato da obtenção de *R*-(+)-**(14)** por meio da biotransformação de *R*-(+)-**(1)** foi realizado em 1969. A transformação foi catalisada por uma linhagem de *Cladosporium* sp (Kraidman, Mukherjee & Hill 1969). Desde 1985, vários autores têm relatado o relevante potencial de linhagens de *Penicillium* sp ao converter *R*-(+)-**(1)** em *R*-(+)-**(14)** (Demyttenaere, van Belleghem, De Kimpe 2001; Abraham, Hoffman Kieslich, Reng & Stumpf 1985; Tan, Day & Cadwallader 1998; Tan & Day 1998a; Tan & Day 1998b; Kourkoutas, Bekatorou, Banat, Marchant & Koutinas 2004). Tan & Day (1998a) relatam que a linhagem utilizada demonstrou enantiosseletividade e enantioespecificidade ao converter a mistura racêmica de **(1)** a *R*-(+)-**(14)**. A atividade aumentou mais de 12 vezes após indução pela da adição sequencial do substrato, o que proporcionou um rendimento de 3,2 g/L de **(14)** após 96 h de reação em escala laboratorial. Levando-se em conta a indução enzimática, e outras características como inibição pelo agente quelante de ferro fenantrolina, pode-se concluir que o sistema enzimático citocromo P-450-dependente envolvido na bioconversão em questão se assemelha ao das bactérias, como, por exemplo, da linhagem *Pseudomonas* sp., da qual diferentes monoxigenases citocromo P450-dependentes foram purificadas e caracterizadas (Berger, Krings & Zorn 2002; Adams, Demyttenaere, De Kimpe 2003). Tan e Day utilizaram o micélio imobilizado (da mesma linhagem) em biorreator. Relata-se que o leito manteve-se ativo por pelo menos 14 dias. A

produção de *R*-(+)-(14) atingida foi de aproximadamente 13 mg/(g de leite)/dia, correspondendo a uma conversão molar do substrato maior que 45% quando o nível de oxigênio dissolvido foi de 50 µmol/L. A avaliação econômica mostrou que a produtividade precisa ser aumentada para que o processo em questão possa ser aplicável do ponto de vista industrial (Tan & Day 1998b) . Os mesmos autores ainda avaliaram o efeito de 22 co-solventes orgânicos em células livres e imobilizadas. Com as imobilizadas um aumento de 2 vezes na produção de (14) foi observada em sistema de micela reversa [0,1%(v/v) de Tween 80 ou Triton 100-X]. O alginato de cálcio é hidrofílico, enquanto o substrato é hidrofóbico, promovendo, indubitavelmente, uma redução do contato com o substrato para as células imobilizadas. Já para células livres, o aumento na atividade foi de 2,2 e 2,4 vezes com 1,5% (v/v) de decanoato de etila e dioctilftalato, respectivamente (Tan & Day 1998a). Outros materiais utilizados para a imobilização de células, além do alginato de cálcio são: materiais celulósicos (como DEAE-celulose) e porosos (como alginatos, ágar, quitosana e ácido poli-galacturônico) (Kourkoutas, Bekatorou, Banat, Marchant, Koutinas 2004).

O potencial da Microextração em Fase Sólida (MEFS) foi reconhecido para seleção de linhagens biotransformadoras de (1) por um grupo de estudos belga. Demyttenaere, Van Belleghem & De Kimpe (2001) investigaram mais de 60 linhagens de fungos filamentosos realizando uma otimização dos parâmetros de MEFS relevantes: tipo de fibra a ser utilizado, tempo de extração e temperatura. Os autores concluíram que as melhores condições de análise foram adsorção em fibra de polidimetilsiloxano revestida com divinil-benzeno/carboxeno (50/30 µm), à

temperatura de 25°C por 30 min. Deste trabalho destaca-se a nova e prática metodologia para a seleção das linhagens utilizando culturas de superfície desenvolvidas nos próprios frascos específicos para MEFS (Demyttenaere; van Belleghem & De Kimpe 2001). As linhagens selecionadas foram investigadas posteriormente quanto à biotransformação em cultura submersa. Uma linhagem de *P. digitatum* isolada de uma amostra de poncã mostrou alta enantiosseletividade ao converter 93% de *R*-(+)-(1) em *R*-(+)-(14) em presença de etanol como co-solvente. O mesmo microrganismo foi capaz de transformar o *S*-(-)-(1), entretanto, apenas quantidades traço foram alcançadas (Adams, Demyttenaere, De Kimpe 2003).

1.4.5. Oxidação alílica a isopiperitenol e isopiperitona

Os respectivos isômeros de isopiperitona (16) foram obtidos por meio da hidroxilação alílica e desidrogenação da posição C-3 de *R*-(+)- e *S*-(-)-(1) com uma linhagem de *Aspergillus celulosae* com rendimentos de 19 e 3% respectivamente, sendo que a (+)-piperitona foi apresentada como principal produto da biotransformação, que gerou também outros produtos após 7 dias de incubação a 30°C (Noma, Yamasaki, & Asakawa 1992).

Em um trabalho posterior, uma linhagem de levedura identificada por *Hormonema* sp. foi capaz de transformar o *R*-(+)-(1) em *trans*-isopiperitenol (15) em concentração de 0,5 g/L após 12 h de incubação. Este foi o primeiro relato da obtenção biotecnológica de *trans*-(15), o qual pode ser facilmente convertido a (-)-mentol por meio de uma hidrogenação. Infelizmente, os autores relatam pouca reprodutibilidade dos resultados, o que compromete a implantação de um

processo industrial com o microrganismo em questão. Atribui-se a falta de reprodutibilidade a mutações morfológicas evidenciadas por meio de variações da aparência ao microscópio e cor da cultura, que variava de preto a amarelo-esverdeado (van Dyk, van Rensburg & Moleleki 1998).

De forma geral, os microrganismos oxidam **(1)** não especificamente, produzindo uma ampla variedade de metabólitos, levando a um grande número de compostos indesejados, embora haja algumas exceções. Entretanto, a conversão é sempre catalisada por enzimas catabólicas, que permitem que **(1)** seja utilizado como fonte de energia. Em plantas, enzimas de algumas espécies mostraram regioespecificidade ao atacar o *S*-(-)-**(1)** em sua posição C-3.

Em uma espécie de *Mentha* ssp (*M.x piperita*) a hidroxilação alílica na posição C-3 de *S*-(-)-**(1)** levou à formação de (-)-**(15)** e posteriormente a (-)-mentol (Lupien, Karp, Wildung & Croteau 1999). O mesmo grupo demonstrou que a regioespecificidade das C-3 e C-6 limoneno-hidroxilases envolvidas na transformação de *S*-(-)-**(1)** em mentol e **(12)** respectivamente é determinada por uma substituição de um aminoácido, F363I, a qual converte uma C-6 em C-3 hidroxilase. Esses estudos sugerem uma possibilidade futura de modificar geneticamente e clonar o citocromo P450 de plantas para alterar a especificidade das hidroxilases quanto ao substrato e/ou produtos (Duetz, Bouwmeester, Beilen & Witholt 2003).

Além disso, relata-se que os genes de *Mentha* spp responsáveis pela produção de limoneno-hidroxilases foram expressos com sucesso em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* (Haudenschild, Schalk, Karp & Croteau 2000).

1.4.6. Epoxidação da ligação 8,9 a limoneno-8,9-epóxido

O primeiro relato da obtenção de limoneno-8,9-epóxido (**17**) por epoxidação de (**1**) nas posições 8 e 9 foi feito por van der Werf, Keijzer & van der Schaft (2000) que utilizaram uma linhagem de *Xanthobacter sp.* C20 isolada de uma amostra de sedimentos cujo crescimento ocorreu em ciclohexano como única fonte de carbono. Aparentemente, uma monoxigenase indutível do citocromo P-450 catalisa a hidroxilação do ciclohexano (possivelmente uma enzima citocromo P-450 dependente) e não hidroxila o anel cicloexênico do *R*-(+)-(**1**), mas catalisa sua epoxidação, dando origem a (*4R,8R*)-(**17**) como único produto da reação, sendo relatada uma taxa de conversão de aproximadamente 100%. *S*-(-)-(**1**) também foi convertido a uma mistura na proporção de 78:22 de (*4S,8R*)- e (*4S,8S*)-(**17**), com 100% de taxa de conversão. Relata-se a forte inibição pela formação de produtos, a qual não pôde ser minimizada por meio da utilização de co-solventes orgânicos (van der Werf, Keijzer & van der Schaft 2000). (**17**) tem sido encontrado na fração volátil de muitos alimentos incluindo poncã e gengibre (Bell, Sowden & Wong 2001).

1.5. Considerações

Apresentou-se alguns dos principais avanços observados nesses últimos anos com relação à biotransformação do limoneno em compostos de interesse industrial assim como à elucidação de algumas rotas metabólicas por meio de enzimas régio e estéreo específicas. A biotransformação com células inteiras apresenta reais vantagens econômicas se comparada aos processos com

enzimas purificadas, e em alguns casos, enzimas são mais estáveis dentro das células, estendendo a “vida” da biocatálise, além do que a adição de co-fatores não é requerida, uma vez que já estão contidos nas mesmas. Os processos de transformação microbiana de terpenóides têm explorado a obtenção de produtos de interesse comercial.

É evidente o progresso que a biotransformação do limoneno sofreu na última década. Ratifica-se que a busca por novas biocatálises regioespecíficas teve sucesso por estabelecer rotas metabólicas diferentes das já conhecidas, o que acarretou na produção de novos compostos de aroma com aplicação industrial relevada, os quais podem ser considerados ‘naturais’, atendendo à exigência do mercado consumidor.

Compostos de aroma produzidos por biotransformação tendem a substituir os compostos de aroma obtidos sinteticamente num futuro próximo. Em países europeus, essa transformação já está em curso. Isso se deve principalmente às vantagens que o processo de biotransformação oferece frente à síntese química além da potencialidade das transformações microbianas em produzir compostos de aroma novos e com aplicações diversas na indústria, como demonstrado ao longo desta revisão.

Entretanto, algumas dificuldades precisam ser vencidas. Metodologias em biologia molecular são necessárias para otimizar as propriedades do biocatalisador, como conferir maior estereosseletividade ou termoestabilidade, até mesmo uma diferente capacidade de atacar substratos diferentes.

Apesar de alguns relevantes avanços, a aplicação direta da biotransformação em escala industrial ainda esbarra em alguns empecilhos como

a expressão de enzimas régiosseletivas e estereosseletivas em altos níveis em linhagens hospedeiras seguras (*'food-grade'*); e o desenvolvimento de técnicas de extração compatíveis com o apelo dos compostos de aroma originados do processo de biotransformação, considerados naturais.

Um dos desafios para o futuro é a expressão de oxigenases do citocromo P-450 de plantas responsáveis pela síntese de diferentes enantiômeros e estereoisômeros de alguns compostos oxifuncionalizados em limoneno em linhagens hospedeiras que permitam o aumento da escala utilizando-se produção em biorreatores.

Espera-se que a disponibilidade de oxigenases específicas, o rápido desenvolvimento de suas aplicações e o alto valor agregado dos produtos biotransformados a partir do limoneno possibilitem bioprocessos industriais de larga escala, nos próximos anos, para que seja possível atender à crescente exigência do mercado consumidor por produtos 'naturais' e de qualidade.

2. Biotransformação de α - e β -pinenos

Assim como o limoneno, α - e β -pinenos (figura 3) são monoterpenos largamente distribuídos na natureza, além de também serem resíduos industriais com valor comercial reduzido (Yoo & Day 2002).

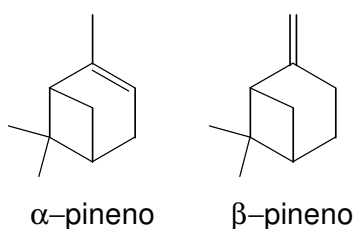


Figura 3 – Estruturas de α - e β -pinenos

Os maiores constituintes do óleo essencial de coníferas são α - e β -pinenos, atingindo concentrações de 75 a 90% do óleo, sendo também subprodutos da indústria de polpa. Do óleo de coníferas produzido nos EUA, aproximadamente 90% é derivado da indústria de polpa e papel, via processos químicos ou termomecânicos (Yoo & Day 2002).

Devido a essas vantagens econômicas, pinenos também representam um substrato ideal para processos biotecnológicos, sendo intensamente estudados em experimentos de conversão microbiana (Schrader & Berger 2001). Além disso, podem ser utilizados como precursores em sínteses químicas. Aproximadamente 25 % da produção mundial de α -pineno (160 000 t) e β -pineno (26 000 t) é utilizada para síntese química de fragrâncias e compostos de aroma (Ohloff 1994; Mimoun 1996).

α - e β -pinenos estão presentes na terebentina, um rejeito da indústria de polpa e papel. Terebentina é uma mistura de terpenóides voláteis originados durante o processo de fabricação de polpa para a indústria de papel. Atualmente, a terebentina é utilizada como solvente para tintas, verniz, aditivos para perfumes e fármacos. Sua composição pode variar muito de acordo com o processo produtivo da polpa. Compostos como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, além de outros compostos não terpenicos (álcoois, aldeídos, derivados aromáticos e alcanos ramificados) fazem parte de sua composição. Entretanto, observa-se que α - e β -pinenos são seus componentes majoritários, atingindo concentrações nas faixas de 50 a 70% e 30 a 15%, respectivamente (Lindmark-Henriksson 2003).

De forma geral, o metabolismo microbiano de pinenos geralmente leva a diversas rotas de degradação e, conseqüentemente, a uma ampla variedade de produtos com diferentes concentrações. Esse efeito é mais marcante no caso dos pinenos (monoterpenos bicíclicos) se comparados com o limoneno (monoterpeno monocíclico) (Mikami 1988).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm a habilidade de degradar monoterpenos quando esses compostos são a única fonte de carbono presente no meio. Esses microrganismos transformam monoterpenos em compostos oxifuncionalizados antes de degradá-los a CO₂ e H₂O. Muitas outras linhagens de bactérias e fungos filamentosos podem apenas transformar os monoterpenos quando se desenvolvem em meio rico em fonte de carbono, o que se chama co-metabolismo (Lindmark-Henriksson 2003).

2.1. Biotransformação de α -pineno

A biotransformação de α -pineno pode gerar uma ampla variedade de compostos. A tabela 1 mostra alguns produtos da biotransformação de α -pineno descritos na literatura.

Tabela 1. Produtos da biotransformação de α -pineno

Microrganismo /planta/enzima	Oxidação alílica/ oxidações adicionais	Outras reações	Referência
<i>Picea abies</i>	trans-verbenol verbenona mirtenol	α -terpineol, trans- pinocarveol, trans-sobrerol	Lindmark-Henriksson 2003
Citocromo P-450cam	cis-verbenol verbenona, mirtenol	α -pineno epóxido	Bell, Chen, Sowden, Xu, Williams, Wong & Rao 2003
<i>Nicotiana tabacum</i>	Verbenona	Verbanona, α -pineno epóxido	Hirata, Ikeda, Izumi, Shimoda, Hamada & Kawamura 1994
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>trans</i> -verbenol	<i>trans</i> -pinocarveol	Agrawal, Deepika & Joseph 1999
<i>Penicillium sp.</i>	verbenona	sobrerol	Prema & Bhattacharyya 1962
<i>Aspergillus niger</i>	<i>trans</i> -verbenol verbenona	<i>trans</i> -sobrerol	Van Dyk, van Rensburg & Moleleki 1998
<i>Hormonema sp.</i>	<i>trans</i> -verbenol verbenona		Wright, Caunt, Carter & Baker 1986
<i>Serratia marcescens</i>	<i>trans</i> -verbenol, mirtenol	<i>trans</i> -sobrerol	Agrawal & Joseph 2000
<i>Aspergillus niger</i>	verbenone		

Os rendimentos obtidos pela maioria dos processos descritos de biotransformação de α -pineno são insuficientes para uma aplicação em escala

industrial. Algumas tentativas foram realizadas com o intuito de contornar esse problema.

Um aumento de 15 vezes na eficiência da biotransformação de α -pineno por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. foi alcançada quando a linhagem foi submetida a mutação em luz UV. A linhagem de *Aspergillus niger* transformou α -pineno em verbenol com rendimento de conversão de 23%. O passo subsequente (transformação do álcool na respectiva cetona, verbenona) foi inibido por meio do tratamento com luz UV. Esse resultado sugere que métodos clássicos de melhoramento de linhagens tais como tratamento com luz UV ainda é uma estratégia interessante para desenvolvimento de bioprocessos, especialmente para aplicações na indústria de alimentos na qual a engenharia genética ainda encontra impedimentos para sua aplicação (Agrawal, Deepika & Joseph 1998).

O potencial biotransformador de α -pineno por uma linhagem de levedura, *Hormonema* sp foi reconhecido. Os dois produtos formados da biotransformação de α -pineno, *trans*-verbenol e verbenona, atingiram concentrações de 0,4 e 0,3 g/L após 96 h (Van Dyk, van Rensburg & Moleleki 1998).

Uma outra seleção de microrganismos levou à seleção de uma linhagem de *Aspergillus niger* que foi capaz de converter α -pineno a verbenona (Agrawal & Joseph 2000). Concentrações elevadas de α -pineno e tempo prolongado de incubação ocasionaram uma diminuição no rendimento da bioconversão, indicando toxicidade do substrato e degradação do produto. A verbenona é um dos componentes majoritários do aroma de morango, framboesa e *spearmint*, assumindo uma nota de cânfora e menta. A verbenona é de grande importância

para a indústria de alimentos, e é obtida principalmente por extração de pinho e eucalipto.

Recentemente, a biotransformação de α -pineno foi realizada com cultura de células de *P. abies*. Os produtos principais foram *trans*-verbenol e verbenona. *trans*-Pinocarveol, *cis*-verbenol, mirtenol e α -terpineol foram produtos minoritários. Dessa forma, a biotransformação de α -pineno por suspensão de células de *P. abies* foi caracterizada, principalmente, pela oxidação na posição alílica. Outras reações observadas foram clivagem oxidativa do anel ciclobutano e oxidação dos carbonos terminais produzindo álcoois mooterpênicos monocíclicos (Lindmark-Henriksson 2003). A figura 4 exemplifica os compostos obtidos no estudo supracitado.

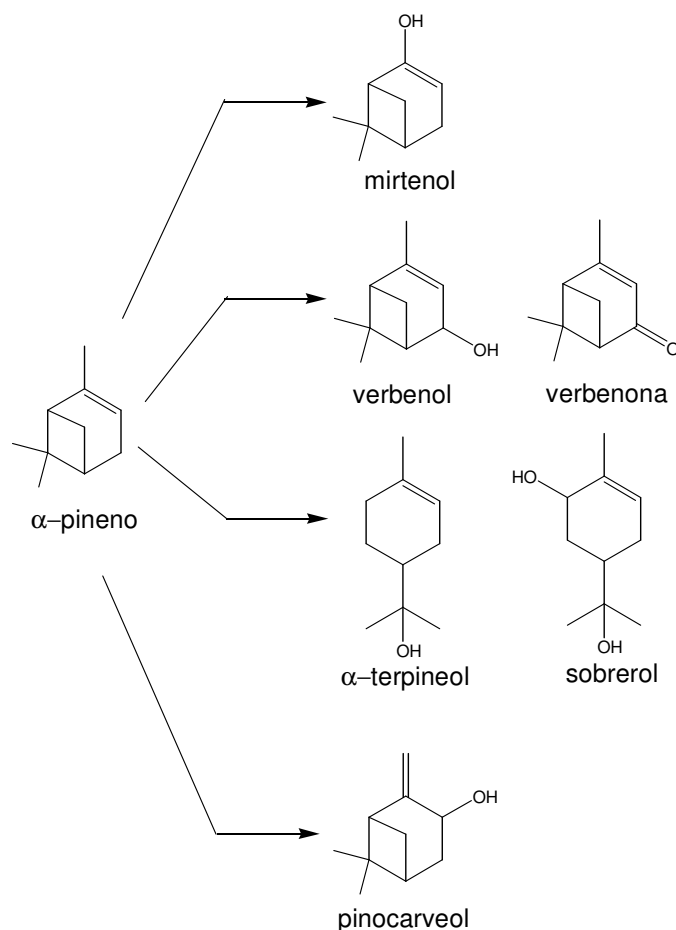


Figura 4 – Biotransformação de $(1R)$ - α -pineno por cultura celular de *P. abies*. As estruturas dos compostos obtidos em maiores concentrações estão em destaque (Lindmark-Henriksson 2003)

2.2. Biotransformação de β -pineno

Diversas rotas estão também descritas para a biotransformação do β -pineno. A biotransformação de β -pineno por *Homonema* sp resultou na produção de pinocanfona (0,1 g/L) e da hidróxicetona 3-hidróxi-pinocanfona (0,2 g/L) após 72h (Van Dyk, van Rensburg & Moleleki 1998). Busmann e Berger (1994) relataram a biotransformação de β -pineno por basidiomicetos. Os produtos obtidos foram

verbenol, verbenona, mirtenol e trans-pinocarveol. Mais recentemente, Lindmark-Henriksson (2003) relatou algumas rotas metabólicas para sua biotransformação. A figura 5 mostra alguns dos produtos obtidos da biotransformação de β -pineno.

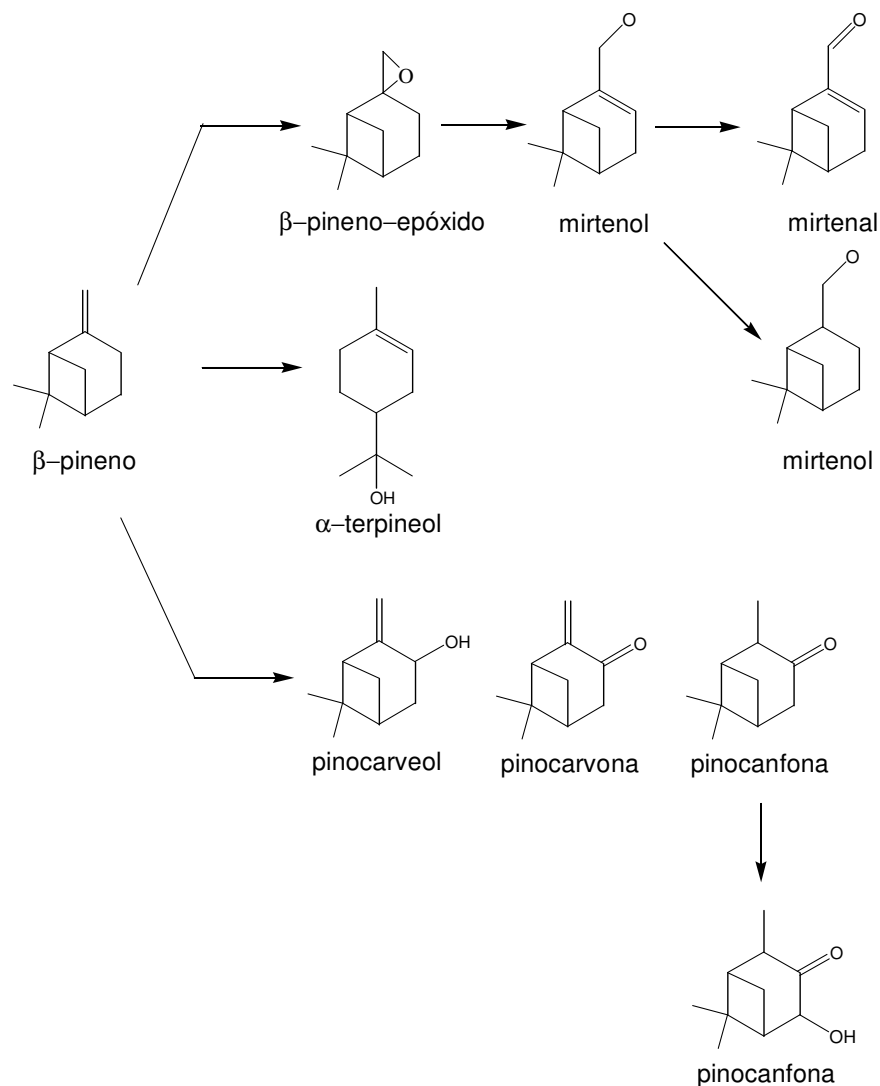


Figura 5 – Rotas metabólicas para a biotransformação de β -pineno (Lindmark-Henriksson 2003; Van Dyk, van Rensburg, Moleleki 1998; Busmann e Berger 1994).

Quando β -pineno foi submetido à biotransformação por diversos organismos, vários produtos foram originados: *trans*-pinocarveol por linhagens de *Aspergillus*

niger e *Armillariella mellea*; 1,4-cineol, 1,8-cineol, mirtenol e mirtenal por *Ganoderma applanatum* e *Pleurotus flabellatus*; borneol, cânfora e ácido β -isopropimérico por *Pseudomonas* sp.; e pinocanfona e isopinocanfona por *Hyssopus officinalis* são alguns dos principais relatos (revisado em Lindmark-Henriksson, Isaksson, Vanek, Valterová, Högberg, Sjödin 2004).

3. Biotransformação de citronelol

Citronelol é um composto de grande interesse industrial uma vez que possui notas de aroma floral (Shrader & Berger 2001) para ser aplicado em alimentos e fragrâncias e ainda pode ser utilizado para sintetizar outros compostos de aroma como óxido de rosa (Boersma, Scheltinga, Dröge, Bos & Quax 2005; Kaminska, Markowicz, Stolowska & Gora 1989). A biotransformação de citronelol pode gerar muitos metabólitos (Brunerie, Benda, Bock & Schreier 1987; Demyttenaere, Vanoverschelde, De Kimpe 2004; Kaminska, Markowicz, Stolowska & Gora 1989; Onken & Berger 1999) e um dos mais interessantes deles é o óxido de rosa.

A biotransformação pode ser considerada como uma alternativa para a síntese química uma vez que enzimas são capazes de realizar hidrólise enantiosseletiva de alguns substratos, gerando compostos rotulados como 'naturais' (Serra, Fuganti & Brenna 2005).

Por esta razão, alguns autores têm proposto a biotransformação de citronelol. Apesar de gerar compostos de alto valor agregado como óxido de rosa,

a biotransformação de citranelol não foi extensivamente investigada como limoneno e α -pineno.

Fungos filamentosos como *Botrytis cinerea* (Brunerie, Benda, Bock & Schreier 1987), *Cystoderma carcharias* (Onken & Berger 1999), *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp (Demyttenaere, Vanoverschelde, De Kimpe 2004) são alguns dos microrganismos relatados como biotransformadores de citranelol.

A Figura 6 apresenta alguns produtos obtidos da biotransformação de citranelol e seus respectivos organismos catalisadores.

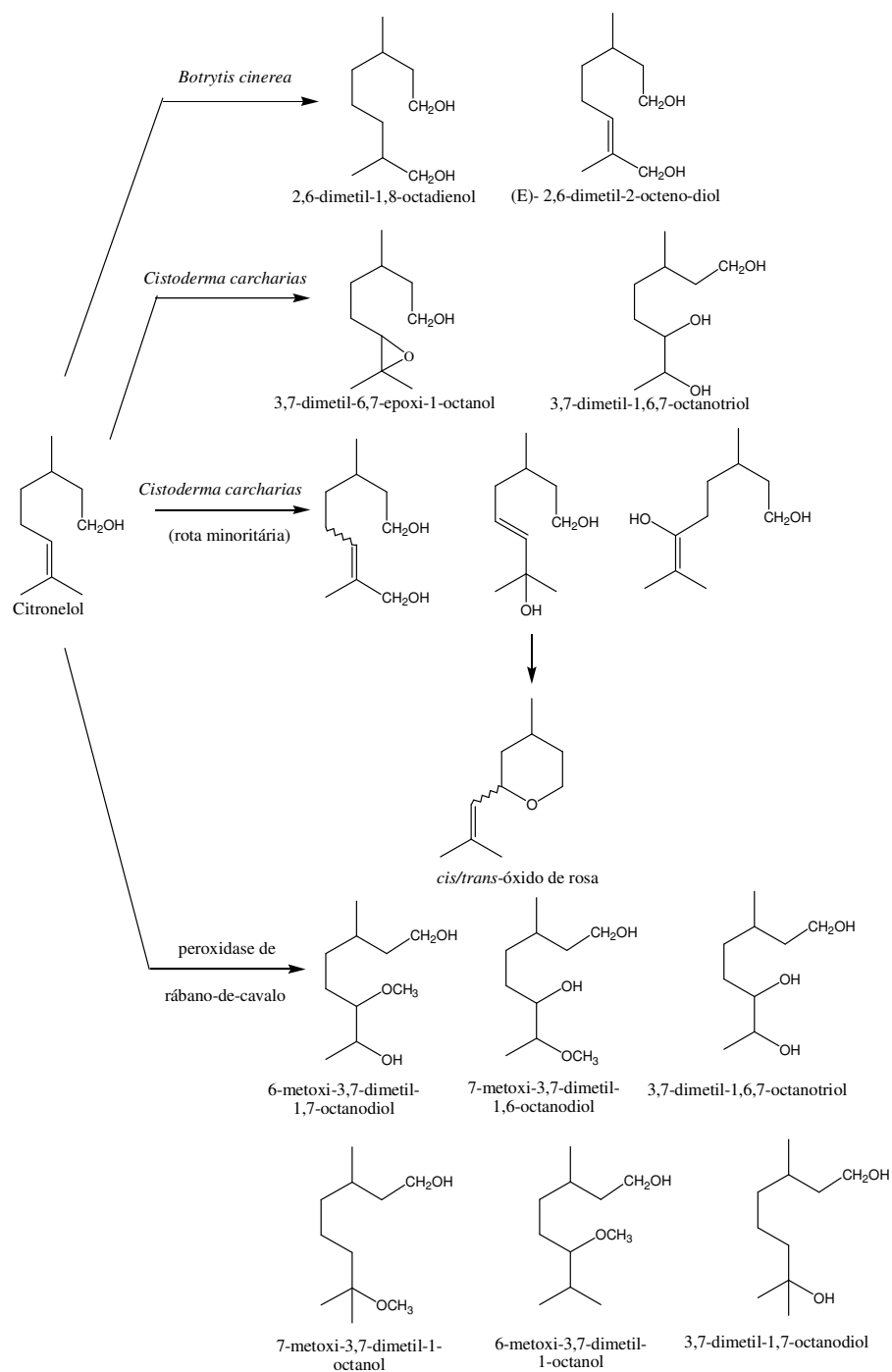


Figura 6 – Biotransformação de citronelol e seus metabólitos (Brunerie, Benda, Bock & Schreier 1987; Kaminska, Markowicz, Stolowska & Gora 1989; Onken & Berger 1999; Demyttenaere, Vanoverschelde, De Kimpe 2004)

O *Botrytis cinerea* é um fungo filamentososo de grande importância na fabricação de vinhos. Esse microrganismo foi descrito pela capacidade de degradar alguns terpenóides. Em 1987, um grupo de estudo descreveu a biotransformação de citrionelol por diversas linhagens de *Botrytis cinerea*. As linhagens foram testadas em diferentes tipos de meio de cultura com e sem a adição de citrionelol. Os meios de cultura foram mosto de uva, meio sintético de sais e uma mistura dos dois anteriores. O fenômeno da inibição foi constatado nas culturas adicionadas de citrionelol. Diferentes rendimentos foram alcançados de acordo com a linhagem e o meio de cultura utilizado. Baseados em seus resultados, os autores propõem duas rotas metabólicas para a biotransformação de citrionelol observadas para mosto de uva e para meio sintético. Para o primeiro meio, o citrionelol foi predominantemente metabolizado por ω -hidroxilação. Com o meio sintético, ocorreu oxidação do citrionelol a ácido citrionélico (Brunerie, Benda, Bock & Schreier 1987).

A biotransformação de citrionelol pelo basidiomiceto *Cistoderma carcharias* originou concentração final de produtos da ordem de $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ em um biorreator de 2 L. A aeração foi aumentada com um sistema de membrana, o que promoveu maiores taxas de crescimento e biotransformação. Os autores defendem o envolvimento de enzimas do citocromo P-450. Isso foi evidenciado pela inibição na formação dos produtos quando 1-aminobenzotriazol ou SKF-525 A (dois inibidores do citocromo P-450) foram adicionados ao meio de cultura. Os compostos da biotransformação foram recuperados principalmente na corrente de saída dos gases do biorreator. Como observado na figura 6, os principais produtos

obtidos da biotransformação de citronelol pelo basidiomiceto foram 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol e 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol, além de uma produção minoritária de óxido de rosa, importante produto industrial (Onken & Berger 1999).

A biotransformação de *R-(+)*- e *S-(-)*-citronelol foi investigada por linhagens de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Os autores propõem uma nova e prática metodologia para a seleção de microrganismos biotransformadores de terpenos. De acordo com esta metodologia, as linhagens foram inoculadas em vials específicos para MEFS (Micro Extração em Fase Sólida). A cultura de superfície foi adicionada do terpeno para a biotransformação. Após alguns dias, ocorreu a adsorção da fibra de MEFS e dessorção em cromatógrafo gasoso. As linhagens selecionadas foram submetidas à biotransformação em cultura líquida. Os autores relatam a autooxidação do citronelol em meio sólido. O citronelol em contato com meio sólido acidificado a pH 3,5 transformou-se em *cis/trans*-óxido de rosa após 3 dias, diferentemente do que ocorreu para meio líquido (pH 3,5), no qual não foi detectada autooxidação do terpenóide. Os principais produtos da biotransformação de citronelol foram *cis/trans*-óxido de rosa (Demyttenaere, Vanoverschelde, De Kimpe 2004).

A oxidação de citronelol por meio de um sistema peroxidase/peróxido de hidrogênio na presença de ácido ascórbico como doador de prótons foi estudada (Kaminska, Markowicz, Stolowska & Gora 1989). Os autores relatam que a utilização de solução homogênea metanol-água foi mais eficiente que meios constituídos de duas fases, como água-citronelol ou água-acetato de etila. Relata-se também a autooxidação do citronelol aos produtos nos mesmos sistemas na ausência de enzima, entretanto de acordo com os autores, o processo enzimático

é de 1,5 a 2,5 vezes mais rápido. Os produtos formados da biotransformação de citronelol por peroxidase de rábano-de-cavalo encontram-se na figura 6.

4. Limoneno e seus derivados: compostos funcionais e de aroma

Óleos essenciais são reconhecidos como agentes naturais com potencial para a preservação de alimentos, sendo que sua efetividade contra uma grande variedade de microrganismos já foi demonstrada (Baratta, Dorman, Deans, Figueiredo, Barroso & Ruberto 1998; Baratta, Dorman, Deans, Biondi & Ruberto 1998; Helander, Alakomi, Latva-Kala, Mattila-Sandhom, Pol, Smid, Gorris, von Wright, 1998). Além disso, óleos essenciais, cujos componentes majoritários são monoterpenos, estão sendo qualificados como antioxidantes naturais (Yanishlieva, Marinova, Gordon & Raneva 1999).

Monoterpenos são compostos não tóxicos de plantas bem distribuídos na natureza. Compostos como *R-(+)*-limoneno, álcool perílico e carvona são substâncias encontradas em óleos essenciais de frutas cítricas, alcarávia, cerejas, hortelã e vegetais folhosos (Crowell 1999). Pesquisas revelam que muitos desses monoterpenos podem apresentar potencialidades de aplicação em tratamentos contra alguns tipos de doenças degenerativas, sendo seus efeitos contra diversos tipos de cânceres os mais abordados na literatura.

Dentre esses monoterpenos, um dos exemplos mais significativos é o *R-(+)*-limoneno, que representa mais de 90% do óleo da casca de laranja possuindo seu aroma característico. Segundo algumas investigações, o limoneno parece exercer efeitos quimiopreventivos contra cânceres de mama, pele, fígado e pulmão em roedores (Crowell 1999).

Um outro exemplo é o álcool perílico. Este monoterpene é isolado de óleos essenciais de lavanda, hortelã, cerejas, bergamota e outras plantas. Seu aroma é suave e característico de lavanda. Em estudos com animais, essa substância mostrou a capacidade de regredir tumores de mama, pâncreas e fígado, além de exibir possíveis aplicações como agente quimiopreventivo para cânceres de cólon, pele, pulmão e como agente quimioterápico para neuroblastoma e cânceres de cólon e próstata (Belanger 1998). O álcool perílico inibe a carcinogênese, suprime a proliferação celular, aumenta drasticamente a apoptose tumoral e induz a diferenciação celular das células malignas *in vitro* e *in vivo*, provocando a regressão total de vários tipos de tumores em animais de experimentação, com baixa toxicidade (Unlu, Mason, Schachter & Hughes 2000).

Álcool perílico e *R-(+)*-limoneno também possuem atividade quimioterapêutica contra tumores de mama e pâncreas em roedores. Entretanto, suas atividades quimioterapêuticas, particularmente no que se refere à atuação na Fase I do desenvolvimento do carcinoma, estão sob avaliação clínica (Crowell 1999).

A carvona é um monoterpene de grande importância na indústria de aroma e de bebidas, possuindo aroma característico de menta. Estudos comprovaram a eficácia da carvona em aumentar a expressão da enzima glutatona S-transferase, uma enzima detoxificante. Apesar disso, comparada ao limoneno e ao álcool perílico, a carvona apresenta menor expressão quanto ao combate de doenças.

4.1. Fitoquímicos: a dieta como fator de redução de riscos a doenças

Por reduzir a exposição humana a mutagênicos, tentativas têm sido direcionadas à identificação de potenciais antimutagênicos e anticarcinógenos para uso na proteção da população contra alguns tipos de doenças (Ribeiro & Salvadori 2003).

A ingestão de alguns nutrientes pode influenciar o risco do desenvolvimento do câncer por inibir ou aumentar a carcinogênese por meio de diversos mecanismos de ação. Identificação e elucidação dos mecanismos de ação desses compostos têm sido, por décadas, pontos importantes em pesquisas relacionadas às áreas da nutrição e do câncer propriamente dito (Milner, McDonald, Anderson & Greenwald 2001). Alguns laboratórios têm relatado as atividades antimutagênica e anticarcinogênica de uma ampla variedade de compostos presentes em alimentos (Ribeiro & Salvadori 2003).

Existem poucas dúvidas a respeito da relação entre dieta e prevenção de câncer. Estudos epidemiológicos, pré-clínicos e clínicos têm estabelecido algumas relações entre alguns compostos e o câncer (Milner, McDonald, Anderson & Greenwald 2001). Por meio do aumento da ingestão de compostos quimiopreventivos, pode ser possível melhorar a proteção contra danos causados por genotoxinas ou carcinógenos. De outra forma, a ingestão de níveis inadequados de alguns micronutrientes pode aumentar o risco de doenças (Ferguson 1994). Infelizmente, até o momento, os dados são inconclusivos. Por isso, um melhor entendimento das interações moleculares é uma estratégia para contornar esse desafio, ainda que significativos desafios científicos e tecnológicos

devam ser vencidos para um eficaz conhecimento de mecanismos para a prevenção do câncer (Milner, McDonald, Anderson & Greenwald 2001).

A 'American Cancer Society' apresenta recomendações gerais para diminuir os riscos de desenvolvimento de câncer, sendo que a primeira delas é "ingerir uma variedade de alimentos 'saudáveis', com ênfase naqueles advindos de fontes vegetais". As pesquisas realizadas até o momento não foram suficientes para demonstrar quais componentes das frutas exercem efeito protetor. Uma teoria bem aceita é de que fitoquímicos como carotenóides, flavonóides, terpenos, esteróis e fenóis podem exercer uma ação sinérgica na prevenção de doenças por meio de mecanismos de ação variados (Byers, Nestle, McTiernan, Doyle, Currie-Williams, Gansler & Thun 2002). Alguns estudos revelam que as frutas cítricas possuem efeito protetor contra uma variedade de cânceres humanos. É de conhecimento geral que laranjas, limões, limas e *grapefruits* sejam fontes de vitamina C, folato e fibras. Entretanto, sugere-se que os monoterpenos presentes nas frutas cítricas sejam responsáveis pelo combate a doenças (Hasler 1998; Kris-Etherton, Hecker, Bonanome, Coval, Binkoski, Hilpert, Griel & Etherton 2002).

Uma investigação recente realizou testes de atividade antioxidante com monoterpenos e sesquiterpenos, dentre outras classes de compostos. Dois métodos foram utilizados: um ensaio com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico e um método espectrofotométrico baseado na determinação da taxa de formação de dienos de ácido linolêlico na ausência e presença de antioxidante. Compostos como limoneno, álcool perílico, carvona, além de alguns sesquiterpenos apresentaram potencial antioxidante (Ruberto & Baratta 2000).

4.2. Evidências da atividade anticâncer de alguns monoterpenos

Algumas investigações em curso sugerem a grande potencialidade de monoterpenos encontrados em alimentos no combate a doenças degenerativas, em particular a diversos tipos de cânceres (Kris-Etherton, Hecker, Bonanome, Coval, Binkoski, Hilpert, Griel & Etherton 2002). Limoneno e álcool perílico parecem estar entre os compostos quimioterápicos mais estudados dentre os monoterpenos, seguidos da carvona. A atividade antitumor dos monoterpenos manifesta-se tanto pela habilidade em prevenir a formação ou progressão do câncer como pela capacidade de regressão de tumores malignos já desenvolvidos (Crowell 1999).

Um dos fatores favoráveis à aplicação dos monoterpenos no combate a doenças degenerativas é o fato de muitos deles, principalmente *R-(+)*-limoneno e álcool perílico, possuírem alta disponibilidade quando administrados oralmente (Phillips, Malspeis & Supko 1995).

Em ratos, o aparecimento de limoneno e seus metabólitos é evidente em 20 minutos depois da administração por gavagem. Esses compostos são detectáveis em alguns tecidos (como fígado e pulmão), sendo encontradas em concentrações mais elevadas em tecidos adiposos e glândulas mamárias em comparação com tecidos menos adiposos (Crowell, Lin, Vedejs & Gould 1992). A meia-vida do limoneno em ratos e humanos é estimada em 12-24 h e sua excreção ocorre principalmente pela urina (Igimi, Nishimura, Kodama & Ide 1974; Kodama, Noda, Ide 1976). O limoneno é metabolizado em compostos oxigenados, sendo os ácidos perílico e dihidroperílico, os principais metabólitos em ratos e em humanos,

juntamente com limoneno-1,2-diol, o que foi confirmado por meio de ensaios *in vitro* do metabolismo de limoneno por microsossomos de fígado (Watabe, Hiratsuka, Isobe & Ozawa 1980).

O limoneno possui comprovada atividade contra muitos tipos de cânceres, exibindo inibição ao desenvolvimento de neoplasmas espontâneos e redução da incidência de linfomas espontâneos em camundongos com ingestão de 1200 mg/kg (Hursting, Perkins, Haines, Ward & Phang 1995). Quando administrado tanto em forma pura quanto como em óleo de casca da laranja (95% de *R*-(+)-limoneno), o limoneno inibiu o desenvolvimento de cânceres de mama, pele, fígado e pulmão (Birt 1995).

Os efeitos quimiopreventivos do limoneno foram evidentes durante a fase de iniciação de carcinomas induzidos com 7-12-dimetilbenzo-antraceno (DMBA) e durante a fase de promoção de carcinomas induzidos com DMBA e nitrosometiluréia (NMU) (Maltzman, Hurt, Elson, Tanner & Gould 1989). Ratos alimentados com 5 % de limoneno na dieta antes da administração dos agentes carcinogênicos CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e DCNB (3,4-dicloronitrobenzeno), apresentaram níveis de glutathione transferase (GST) hepática dobrados, quantidade total de GST aumentada em 40 % e níveis de glutathione no fígado aumentados em 28%. O limoneno não apresentou efeitos na expressão da GST quando EPNP (1,2-epóxi-3-[*p*-nitrofenoxi]propano), outro carcinógeno, foi administrado (Maltzman, Hurt, Elson, Tanner & Gould 1989).

Adicionalmente à prevenção por inibição da apoptose, o álcool perílico pode exercer atividade protetora contra câncer de colon e outros tipos de cânceres por aumentar a detoxificação da carcinogênese pelo fígado. O limoneno, um

monoterpeno que origina os mesmos metabólitos que o álcool perílico têm mostrado aumentar 2,3 vezes a excreção urinária do carcinógeno DMBA e de seus metabólitos comparados a ratos controle. Quando alimentados com dieta contendo 5 % de limoneno por duas semanas antes da administração de DMBA, o limoneno mostrou capacidade de reduzir a interação do carcinógeno com o DNA. Dieta com 5 % de limoneno pode aumentar a expressão de CYP2B e 2C, membros da família do citocromo P-450 e aumentar a epóxido-hidratase, que fazem parte da Fase I do sistema de detoxificação do fígado e podem induzir o sistema de detoxificação da Fase II (Maltzman, Christou & Gould 1991).

Alguns monoterpenos presentes em alimentos possuem promissora atividade quimioterapêutica contra tumores pancreáticos e de mama. Ambos, limoneno e álcool perílico possuem atividade quimioterapêutica contra câncer de mama em ratos, causando a completa regressão dos carcinomas induzidos por DMBA ou NMU. Carvona e limoneno obtidos da extração de *Anethum graveolens* L. e *Carum carvi* L. foram capazes de induzir a enzima de detoxificação glutathione S-transferase em diversos tecidos de camundongo (Zheng, Kenney & Lam 1992a).

A aflatoxina B1 é um grande contaminante de alimentos em regiões tropicais e úmidas da África e da Ásia e tem sido relacionada, juntamente com hepatites B e C, às altas incidências de câncer de fígado nestas regiões (Montalto, Cervello, Giannitrapani, Dantona, Terranova & Castagnetta 2002; Sarin, Thakur, Guptan, Saigal, Malhotra & Thyagarajan 2001; Wild, Yin, Turner, Chemin, Chapot, Mendy, Whittle, Kirk & Hall 2000). O efeito do limoneno e álcool perílico no estágio de iniciação de carcinoma de fígado induzido por aflatoxina B1 foi investigado. Amostras de sangue e fígados de ratos alimentados por 5 dias com aflatoxina B1

mostraram que os tratamentos com limoneno e álcool perílico inibiram a formação de adutos nos hepatócitos (Elegbede & Gould 2002).

Álcool perílico inibiu significativamente o crescimento de tumores de fígado em ratos induzidos por dietilnitrosamina por aumentar a frequência de apoptose (Mills, Chari, Boyer, Gould & Jirtle 1995). Além disso, o álcool perílico possui atividade quimiopreventiva durante a fase de promoção de carcinoma induzido em fígado de ratos (Mills, Chari, Boyer, Gould & Jirtle 1995) e é muito eficiente em prevenir tumores reincidentes em animais tratados com quimioterapia (Haag & Gould 1994). O metabolismo do álcool perílico é similar ao do limoneno, sendo seus metabólitos detectáveis após 10 horas de sua administração oral (Phillips, Malspeis & Supko 1995). Seu metabólito principal é o ácido perílico em ratos e cachorros (Phillips, Malspeis & Supko 1995; Haag, Gould 1994). A meia-vida do álcool perílico em cachorros tratados com 250 mg/kg peso corpóreo é de aproximadamente 3 h, não causando toxicidade detectável a esta dose (Phillips, Malspeis & Supko 1995; Haag, Gould 1994). Além de promover efeito protetor contra câncer de cólon, o álcool perílico também pode inibir a metástase de tumores de cólon já desenvolvidos (Broitman, Wilkinson, Cerda & Branch 1996).

Outros estudos revelaram a potencialidade anticâncer do álcool perílico no tratamento de tumores em células pancreáticas humanas e de hamsters. Valores de IC₅₀ de 290 e 480 µM para humanos e para hamsters respectivamente foram encontrados. A partir desses resultados, testes *in vivo* em hamsters com carcinoma pancreático de 2 mm de diâmetro foram realizados. Os animais foram tratados com álcool perílico em doses de 1,2-2,4 g/kg/dia. Após 3 semanas de

quimioterapia, foi observada regressão dos tumores em todos os animais e regressão completa em 20 % deles. Efeitos tóxicos não foram observados nessa dosagem (Stark, Burke, McKinzie, Ayoubi & Crowell 1995).

Ratos com tumores mamários maiores ou iguais a 10 mm de diâmetro foram alimentados com 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 % de álcool perílico adicionados à dieta durante 15 dias. Dietas com 1,0 % de álcool perílico ou maiores mostraram um nível significativo de redução tumoral completa. A dieta de 2,0 % de álcool perílico mostrou as melhores respostas com 50% dos animais com completa regressão e 25% delas com regressão parcial (Haag & Gould 1994). Uma outra investigação aponta que a dieta com 3% de álcool perílico causou algumas mortes entre os animais testados, o que difere de outros estudos (Stark, Burke, McKinzie, Ayoubi, Crowell 1995). Alguns fatores que podem explicar essas diferenças são diversidade de rações administradas, além do tipo de animal utilizado em cada caso.

Ratos com tumores de fígado induzidos por dietilnitrosamina por um mês foram tratados com ração contendo de 2,0 % de álcool perílico. Após 19 semanas de tratamento, a massa tumoral foi reduzida por 10 vezes no grupo tratado com álcool perílico em comparação ao não tratado. Álcool perílico causou um aumento de 5 vezes no índice apoptótico em tumores grandes e aumento de 10 vezes em tumores menores. Animais tratados com álcool perílico apresentaram decréscimo de 10 % na massa corpórea em comparação aos ratos controle, o que é atribuído ao decréscimo na taxa de gordura corpórea (Mills, Chari, Boyer, Gould & Jirtle 1995).

O álcool perílico parece ser útil na redução da ocorrência de cânceres de pele. Ratos foram tratados três vezes com álcool perílico uma semana antes de serem expostos à radiação UV. Uma dose total de irradiação de $1,1 \times 10^6 \text{ J/m}^2/\text{s}$ foi alcançada em 18 semanas com exposições de 30 minutos, 5 dias por semana. Após 30 minutos da irradiação, 3 dias por semana, 50 μl de álcool perílico foram aplicados superficialmente a cada orelha e 100 μl de álcool perílico aplicados à superfície dorsal exposta. Após 17 semanas de irradiação, ratos controle e aqueles tratados com 1 mM de álcool perílico mostraram uma média de incidência tumoral de 37%, enquanto os animais tratados com 10 mM de álcool perílico tiveram apenas 7% de incidência. A incidência de tumores aumentou a partir da 18ª semana. Na 20ª semana, 2 semanas após a descontinuação da radiação UV e do tratamento com álcool perílico, a incidência de tumores de pele aumentou nos ratos tratados com álcool perílico, atingindo os mesmos níveis dos ratos controle. Este resultado sugere que o álcool perílico atrasou a formação dos tumores de pele. A aplicação tópica de álcool perílico não causou mudanças no peso corpóreo ou alterações de comportamento, sugerindo não ser tóxico nas dosagens utilizadas no experimento. Como determinado por meio de biópsias, aplicações tópicas de 100 mM de álcool perílico inibiram a transativação induzida pela radiação UV da proteína ativadora-1 (AP-1) em 75 %. A AP-1 é induzida por radiações UVB e UVC por meio de uma fosforilação em castata. A inibição dos *ras* bloqueia a transativação da AP-1 induzida por radiação UVC. É possível que o álcool perílico bloqueie um desses sinais transdutores e iniba a transativação da AP-1 (Barthelman, Chen, Gensler, Huang, Dong, Bowden 1998). Outra

investigação ratifica esses resultados ao relatar a capacidade do álcool perílico em agir contra melanomas. Células de melanoma murino B16 foram incubadas com álcool perílico por 48 h. Uma concentração de 250 $\mu\text{mol/L}$ diminuiu a população de células com melanoma em 50 % (Barthelman, Chen, Gensler, Huang, Dong & Bowden 1998).

Álcool perílico pode também prevenir cancer de pulmão induzido por tabagismo. Ratos tiveram câncer de pulmão induzido por NNK, 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, um agente etiológico em câncer humano. O NNK é metabolizado pelas enzimas do citocromo P-450 em compostos que podem alquilar genes K-ras resultando em transformação oncogênica. Câncer de pulmão humano apresenta mutações nos genes K-ras freqüentemente. O tratamento com álcool perílico começou uma semana antes da introdução do carcinoma e continuou por 22 semanas. A incidência de câncer em animais tratados com álcool perílico foi 22 % menor em comparação aos não tratados (Lantry, Zhang, Gao, Crist, Wang, Kelloff, Lubet & You 1997).

Carvona e seus derivados apresentaram capacidade quimiopreventiva, uma vez que a atividade anticarcinogênica é correlacionada com a habilidade de induzir a expressão de enzimas detoxificantes (Carvalho & Fonseca 2006). Óleo de semente de alcarávia (cujo principal monoterpene é a carvona) quando administrado previamente, previne o desenvolvimento de carcinoma de pulmão e pré-estômago de ratos induzidos quimicamente (Wattenberg, Sporn & Barany 1989). Adicionalmente, carveol e mentol possuem atividade quimiopreventiva contra câncer de mama em fase de iniciação em ratos induzido por DMBA quando alimentados com 1% de cada um dos monoterpenos na dieta (Crowell, Kennan,

Haag, Ahmad, Vedejs & Gould 1992). Isso foi ratificado por outro grupo de pesquisadores que mostrou que (4S)-(+)-carvona possui capacidade de induzir a atividade da glutatona S-transferase em diversos tecidos de ratos (Zheng, Kenney & Lam 1992a; Zheng, Kenney & Lam 1992b).

4.3. Mecanismos de ação anticâncer de alguns monoterpenos

O DNA, material genético de todas as células, age como modelador na produção de formas específicas de RNA transportador, RNA ribossômico e RNA mensageiro e, deste modo, determina qual enzima irá ser sintetizada pela célula. As enzimas são responsáveis pela maioria das funções celulares, e a interferência nesses processos irá afetar a função e a proliferação tanto das células normais como das neoplásicas. A maioria das substâncias utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nesse mecanismo celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição clara dos mecanismos de ação da maioria das substâncias (<http://www.sbbq.org.br/>).

Os monoterpenos parecem atuar contra carcinomas segundo vários mecanismos. Com isso, nem todos os mecanismos de ação anticarcinogênica dos monoterpenos estão esclarecidos. Investigações baseadas em evidências dos efeitos dos monoterpenos propõem sugestões de como pode ocorrer a prevenção de carcinomas. Portanto, diversos mecanismos de ação podem ser levados em consideração no que se refere às atividades antitumor dos monoterpenos. Alguns autores sugerem que esses compostos parecem atuar segundo múltiplos mecanismos para a quimioprevenção do câncer (Crowell 1999).

Os monoterpenos podem atuar antes do estabelecimento do câncer e nos casos onde a doença já estiver desenvolvida, podem causar regressão do tumor. Alguns modos de ação são propostos com base na produção científica investigada.

4.3.1. Indução de enzimas detoxificantes.

Durante a fase de iniciação do carcinoma, os monoterpenos induzem as enzimas metabólicas da fase II, resultando em detoxificação do carcinoma (Kensler 1997). Um exemplo é a indução da glutathione S-transferase (van Lieshout, Bedaf, Pieter, Ekkel, Nijhoff & Peters 1998).

O mecanismo de ação de muitos agentes quimiopreventivos envolve a alteração metabólica do carcinoma por modular as atividades das enzimas envolvidas nas fases I e/ou II. A indução de enzimas detoxificantes da fase II aumenta a inativação do carcinoma por facilitar a remoção de metabólitos ativados pela conjugação com a glutathione e/ou glucoronídeos (Maltzman, Hurt, Elson, Tanner, & Gould 1989).

Os agentes quimiopreventivos devem possuir atividade bloqueadora e/ou supressora de câncer. Agentes quimiopreventivos bloqueadores agem durante a fase de iniciação da carcinogênese para prevenir a interação de carcinógenos químicos com o DNA, por exemplo, modulando o metabolismo da carcinogênese para formas menos tóxicas. O efeito quimiopreventivo bloqueador do limoneno e de outros monoterpenos durante a fase de iniciação de câncer de mama é devido ao bloqueio da indução das enzimas metabólicas da Fase II do carcinoma, resultando em processo de detoxificação (Crowell 1999).

4.3.2. Aumento da rediferenciação

Após a fase de iniciação, os monoterpenos parecem aumentar a rediferenciação celular, o que faz com que as potenciais células cancerosas tomem uma morfologia normal. Agentes quimiopreventivos supressores agem durante a fase de promoção do carcinoma para prevenir o desenvolvimento das células. A atividade quimiopreventiva de supressão de tumores apresentada pelos monoterpenos pode ser devida à indução de apoptose e/ou inibição da isoprenilação pós-translacional das proteínas reguladoras do crescimento. No caso de cânceres de mama e fígado, a atividade quimiopreventiva supressora dos monoterpenos durante a fase de promoção pode estar relacionada à inibição da proliferação celular do tumor, aceleração da taxa de morte das células do tumor e/ou indução da diferenciação celular das células do tumor (Crowell 1999).

4.3.3. Indução da apoptose

Os monoterpenos podem induzir a apoptose em células mutantes, as quais, segundo o processo carcinogênico, perdem a característica de sofrer apoptose. A atividade quimiopreventiva do álcool perílico durante a fase de promoção de carcinoma de fígado é associado com aumento na morte celular por apoptose ou morte celular programada (Mills, Chari, Boyer, Gould & Jirtle 1995). Sob as mesmas condições, não há efeito de incorporação do álcool perílico ao DNA.

Um modelo de simulação de câncer gástrico foi estabelecido pela implantação ortotópica de tecido tumoral humano na parede gástrica de camundongos. *R-(+)*-limoneno (em solução de 1%) foi administrado na dose de 15 mL/kg diariamente por 7 semanas. Concluiu-se que o limoneno é eficaz para

redução de tumor e da metástase. A massa do tumor foi significativamente reduzida nos ratos tratados em comparação com os não tratados com limoneno. A taxa de inibição foi de 47%. Os autores consideram que o mecanismo principal dos efeitos inibitórios do *R-(+)*-limoneno foi induzir a apoptose das células cancerosas. Isto está em concordância com outros autores (Lu, Zhan, Feng, Qu, Yu & Xie 2004).

Pesquisas apontam que os efeitos inibitórios do álcool perílico no crescimento de células pancreáticas tumorais é devido à estimulação da apoptose. Células pancreáticas cancerosas tratadas com 100, 300 e 500 μ M de álcool perílico apresentaram taxas de apoptose respectivamente 2,6; 8,8; e 18 vezes maiores que as células malignas não tratadas. O álcool perílico causa apoptose às células cancerosas por aumentar os níveis da proteína proapoptótica Bak. A expressão dessa proteína foi 2 vezes maior nas células tratadas com álcool perílico em comparação às não tratadas. A proteína Bak é conhecida por ser induzida pelo gene supressor tumoral p53 em resposta à danificação do DNA. Entretanto, todas as linhagens de células testadas continham mutantes do gene p53 e não do tipo original, sugerindo que o aumento da expressão induzido pelo álcool perílico é independente do gene p53 da linhagem original (Stayrook, McKinzie, Burke, Burke & Crowell 1997).

4.3.4. Inibição da isoprenilação de proteínas

Os monoterpenos parecem inibir a isoprenilação de produtos celulares (*Ras* 16) da oncogênese. De um modo simples, as proteínas da oncogênese, que são

proteínas reguladoras do crescimento celular, precisam sofrer modificação pós-translacional de acordo com um processo chamado isoprenilação para serem alocadas em uma membrana onde são ativas. A isoprenilação de proteínas envolve a modificação pós-translacional de uma proteína pela ligação covalente de um grupo farnesil ou geranyl-geranyl isoprenóide a um resíduo de cisteína em grupo carboxil terminal ou próximo dele (Kawata, Hagase, Yamasaki, Ishiguro & Matsuzawa 1994). A prenilação das proteínas *ras* possibilita que se associe com a membrana plasmática, o que é requerido para sua atividade oncogênica (Kato, Cox, Hisaka, Graham, Buss & Der 1992). Muitas proteínas preniladas regulam o crescimento e/ou transformação celular e o prejuízo da prenilação de uma ou mais dessas proteínas pode contribuir para a atividade anticarcinogênica dos monoterpenos. Se as proteínas da oncogênese não sofrem isoprenilação, as células não se comportam mais como células cancerosa e, dessa forma, a inibição acontece.

Substratos isoprenóides para prenil:proteína transferases incluem farnesilpirofosfato e geranyl-geranylpirofosfato, dois intermediários na rota do mevalonato. Monoterpenos podem inibir diretamente prenil:proteína transferases *in vitro* em doses atingíveis *in vivo*, sugerindo que a inibição da prenilação de proteínas por monoterpenos ocorre no nível de prenil-proteína transferases (Gelb, Tamanoi, Yokoyama, Ghomashchi, Esson & Gould 1995; Phillips, Malspeis & Supko 1995; Crowell, Lin, Vedejs & Gould 1992).

Monoterpenos podem bloquear a atividade de intermediários da rota metabólica do mevalonato que são responsáveis pela produção de ubiquinona, colesterol e precursores da prenilação de proteínas (farnesil- e geranyl-geranyl-

pirofosfatases) (Crowell, Lin, Vedejs & Gould 1992). Alguns monoterpenos são também fracos, porém específicos, inibidores de farnesil e geranyl-geranyl transferases (Gelb, Tamanoi, Yokoyama, Ghomashchi, Esson & Gould 1995). A atividade anticâncer de monoterpenos correlaciona-se com a inibição da prenilação de pequenas proteínas, como ras (Crowell, Kennan, Haag, Ahmad, Vedejs, Gould, 1992; Crowell, Lin, Vedejs & Gould 1992; Crowell, Lin, Vedejs & Gould 1994; Crowell, Chang, Ren, Elson, Gould 1991; Schulz, Buhling & Ansorge 1994; Stayrook, McKinzie, Barbhaiya, Crowell 1998) e propõe-se que isto pode explicar sua ampla atividade antitumoral (Gould 1995). Pelo fato de a prenilação postranslacional ser necessária para ligar ras na membrana plasmática (onde se torna funcional), a habilidade de monoterpenos em inibir a prenilação de ras poderia interferir com a sinalização da Bcr/Abl tirosina quinase através do ras (Clark, Zhong, Filiault, Perman, Ren, Gould & Yang 2003).

Em um estudo de prevenção de tumores mamários em ratos, monoterpenos adicionados à dieta reduziram o número médio de tumores por rato em 50 % mas não alteraram a porcentagem de tumores com ras ativado. Isso sugere que a inibição da farnesilação por álcool perílico não é a base para explicar a prevenção de câncer de mama por monoterpenos. Entretanto, não foi descartado que a inibição da prenilação por GGPTase tipo I induzida por álcool perílico inibe o crescimento de tumores mamários. Rac1 e RhoA, dois substratos para a GGPTase tipo I, tem potencial transformador em culturas de células e tem importantes funções na sinalização celular (cell signaling) e na organização do cito-esqueleto. Ao inibir sua prenilação pós-translacional previne-se sua entrada através da membrana plasmática e, conseqüentemente, as inativa (Ripple, Gould,

Stewart, Tutsch, Arzoomanian, Alberti, Feierabend, Pomplun, Wilding & Bailey 1998).

Análises da expressão dos ciclos de regulação da célula G1 revelaram que monoterpenos aumentam a expressão da ciclina E, e diminuiu a expressão da ciclina D1, ciclina-dependente quinase (cdq) 4 e cdq2. Esses resultados sugerem que monoterpenos induzem o crescimento das células de cancer de cólon por meio da ciclina-dependente quinase 4 (Bardon, Foussard, Fournel & Loubat 2002).

4.3.5. Ativação da sinalização do TGF – beta (Transforming Growth Factor – beta)

Para que a ativação da sinalização do TGF – beta aconteça, primeiramente ocorre o aumento da M6P/IGFR-II (Manose 6 Fosfato/Insulin Growth Factor II Receptor) e depois a ativação do TGF- beta. A ativação do TGF-beta dispara sinal de transdução que acarreta a parada do ciclo celular em G1 e apoptose. O álcool perílico suprime o crescimento de tumores de fígado de rato e este efeito se associa à grande elevação dos níveis de mRNA do receptor M6P/IGF-II e de receptores do TGF-beta. No carcinoma de mama de rata, o álcool perílico ativa imediatamente a via de sinalização TGF-beta a qual ativa fatores pró-apoptóticos como Bax, Bak e Bad , sem afetar a expressão do p53 ou do Bcl-2.O aumento dos sinais apoptóticos são seguidos pela ativação de sinais relacionados com a parada do ciclo celular, tais como o aumento da expressão do gene p21 e a diminuição da expressão do CdK-2 (Ciclin dependent Kinase-2) e da ciclina-E (<http://www.medicinacomplementar.com.br/tema080805.asp>).

A expressão do receptor mannose-6-fosfato fator II de crescimento e TGF-beta é aumentada em tumores de mama tratados com limoneno, mas não na

minoria de tumores que não são atingidos pelo limoneno, sugerindo que a rediferenciação das células tumorais induzidas pelo limoneno é TGF β -dependente (Crowell 1999).

Relata-se que ratos com câncer de fígado induzido por DEN alimentados com uma dieta com 2 % de álcool perílico por 19 semanas aumentaram os níveis de mRNA os receptores TGF-beta tipos I, II e III em 100 % em tumores grande, em 38 %, e 49 % respectivamente, comparados aos níveis de mRNA em tumores grandes de animais não tratados. Álcool perílico não causou efeitos nos níveis de TGF-beta mRNA em fígados normais. Álcool perílico também aumentou o nível médio de mRNA em M6P/IGF II (mannose-6-phosphate/insulin growth factor II receptor) em mais de 100 % em tumores grandes de fígado comparados a tecidos normais (Shi & Gould 1995). IGFII pode ter um efeito mitogênico em tumores de mama por ligar-se a receptors IGF-I. Os altos níveis do receptor M6P/IGFII induzidos por álcool perílico podem interferir no crescimento do tumor mamário por assimilar e degradar o fator de crescimento associado, IGF-II (Jirtle & Gould 1993). Células tumorais como células de câncer de mama humano sintetizam e secretam uma forma latente de TGF-beta que requer o receptor manose 6-fosfato e plasmina para ativá-lo; dessa forma, o álcool perílico indiretamente ativa o TGF-beta por aumentar os receptores M6P. TGF-beta ativados induzem ao bloqueio do ciclo celular G1 síntese de DNA em baixas concentrações (0,5 ng/mL), e apoptose em maiores concentrações (2,5 ng/mL) (Yu, Heim, Qian, Simmons-Menchaca, Sanders & Kline 1997).

Para determinar como o álcool perílico atua *in vivo*, ratos com tumores de mama foram tratados com dieta com 2 % de álcool perílico. Após duas semanas,

10 µl de [14C]mevalonolactona foi inserida em suas glândulas mamárias e após 3 horas, as glândulas foram removidas e as células mamárias epiteliais foram analisadas quanto à prenilação de proteínas, síntese de coenzima Q e síntese de colesterol. Nos ratos controle, proteínas G, coenzima Q, e colesterol foram detectados 3 horas após a infusão. Os ratos alimentados com álcool perílico tiveram uma inibição de 20% da isoprenilação de proteínas G e síntese de coenzima Q. A síntese de colesterol não foi afetada. Das proteínas G, a prenilação de proteínas ras por farnesil proteína transferase (FPTase) foi inibida em 17 % e a prenilação de RhoA por geranyl-geranyl proteína transferase (GGPTase) tipo I foi inibida em 28 % (Belanger 1998).

Tem sido mostrado que uma perda de sensibilidade à inibição do crescimento por TGF-beta endógeno pode contribuir com o processo de tumorogênese em câncer de cólon. Alguns estudos, entretanto, mostram que a sobre-expressão de TGF-beta pode aumentar a tumorigenese e quando anticorpos a TGF-beta 1,2 e 3 são injetados em camundongos com carcinomas de mama, a metástase do pulmão é prevenida (Jirtle, Haag, Ariazi & Gould 1993).

4.4. Considerações

Muitos monoterpenos presentes em alimentos têm mostrado ser efetivos na quimioprevenção e quimioterapia de câncer. Pesquisas estão sendo direcionadas para desvendar os mecanismos de ação dos monoterpenos no que se refere à sua relação com o câncer, além de outras doenças crônicas.

Monoterpenos também possuem muitas características de agentes quimiopreventivos ideais: eficaz atividade antitumor, disponibilidade comercial, baixo custo, biodisponibilidade oral e baixa toxicidade, sendo considerados para testes de prevenção de carcinomas em humanos. Em áreas de subdesenvolvimento e acesso restrito à saúde, essas questões tornam-se altamente relevantes, uma vez que a prevenção pode oferecer uma alternativa para a redução da incidência de câncer de fígado humano em regiões de alto risco. As condições econômicas de muitos dos países em desenvolvimento sugerem que o agente quimiopreventivo utilizado deve ser barato e acessível à população.

Uma vez que os monoterpenos estão amplamente distribuídos em frutas, o seu consumo parece ser acessível a uma certa parcela da população. Uma vez que os compostos bioativos parecem não agir isoladamente, mas possuem efeitos sinérgicos com outros, os quais também estão presentes em grande variedade de vegetais, parece ser consensual que uma dieta rica em frutas, verduras e legumes é uma das chaves para a prevenção de doenças.

Referências Bibliográficas

Abraham, W. R., Hoffman H.M.R., Kieslich, K., Reng, H., & Stumpf, B. (1985). Microbial transformation of some monoterpenoids and sesquiterpenoids. *Ciba Found Symposium*, 111, 146-160.

Abraham, W. R., Stumpf, B. & Kieslich, K. (1986) Microbial transformations of terpenoids with 1-*p*-menthene skeleton *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 24-30.

Adams A., Demyttenaere J.C.R. & De Kimpe N. (2003) Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. *Food Chemistry*, 80, 525–534.

Agrawal, R. & Joseph, R. (2000) Bioconversion of alpha-pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 335-337

Agrawal, R., Deepika, N.U.A. & Joseph, R. (1999) Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of α -pinene to verbenol. *Biotechnology Bioengineering*, 63, 249-252.

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A.C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and anti-oxidant properties of some commercial oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 235-244.

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and anti-oxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 618-627.

Bardon, S., Foussard, V., Fournel, S. & Loubat, A. (2002) Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Letters*, *181*, 187-194.

Barthelman, M., Chen, W., Gensler, H. L., Huang, C., Dong, Z. & Bowden, G. T. (1998) Inhibitory effects of perillyl alcohol on UVB-induced murine skin cancer and AP-1 transactivation *Cancer Research*, *58*, 711-716.

Bauer, K., Garbe, D. & Surburg, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, 2a ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1990. p. 67-84.

Belanger, J.T. (1998) Perillyl alcohol: applications in oncology *Alternative Medicine Review*, *3*, 448- 457.

Bell S.G., Sowden, R.J. & Wong, L-L (2001) Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450_{cam} for monoterpene oxidation *Chem Commun.* **2001**, 7, 635-636.

Bell, S.G., Chen, X., Sowden, R.J., Xu, F., Williams, J.N., Wong, L.-L. & Rao, Z. (2003). Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450_{cam}. *Journal of American Chemical Society*, *125*, 705-714.

Berger R.G., Krings U., & Zorn H. (2002) Biotechnological flavour generation, In A. J. Taylor, Food flavour technology. Weimar: C.H.I.P.S Press. p. 60-104.

Berger, R.G. (1995), *Aroma biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.

Birt, D.F. (1995) Dietary modulation of epidermal protein kinase C: mediation by diacylglycerol. *Journal of Nutrition* *25*: S1673-S1676.

- Boersma, Y.L.; Scheltinga, P.C.; Dröge, M.J.; Bos, R. & Quax, W.J. (2005) A validated gas chromatographic method for the evaluation of enzymatic enantioselectivity in kinetic resolution applications. *Journal of Separation Science*, 28, 501-505.
- Bowen, E.R. (1975) Potential by-products from microbial transformation of D-limonene. *Florida State Horticultural Society*, 88, 304-308.
- Broitman, S.A. Wilkinson, J. Cerda, S. & Branch, S.K. (1996) Effects of monoterpenes and mevinolin on murine colon tumor CT-26 in vitro and its hepatic, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 401, 111-130.
- Brunerie, P. Benda, I. Bock, G. & Schreier, P (1987) Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 6-10.
- Burdock, G.A.; *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*, 3rd ed., CRC: Boca Raton, 1995, p. 20-45.
- Busman, D. & Berger, R.G. (1994) Oxyfunctionalization of α - and β -pinene by selected basidiomycetes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 49, 545-552.
- Byers, T., Nestle, M., McTiernan, A., Doyle, C., Currie-Williams, A., Gansler, T. & Thun, M. (2002) Activity prevention: reducing the risk of cancer with healthy. Food Choices and Physical American Cancer Society. Guidelines on nutrition and physical activity for cancer, *CA Cancer Journal for Clinicians*, 52, 92-119
- Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E. & Higgins, D.P (1989) Bioconversion of d-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *Journal of Food Science*, 54, 1241-1245.

- Carter, O. A., Peters, R.J. & Croteau, R. (2003) Peters and R. Croteau, Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*, *Phytochemistry*, *64*, 425-433.
- Carvalho, C.C.C.R. & Fonseca M.M.R. (2006) Biotransformation of Terpenes, *Biotechnology Advances* *24*, 134-142.
- Carvalho, C.C.C.R. & Fonseca, M.M.R. (2006) Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*, *95*, 413-422.
- Chang, H.C. & Oriel, P. (1994) Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Food Science*, *59*, 660-662.
- Chang, H.C, Gage, D.A. & Oriel P.J. (1995) Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Journal of Food Science*, *60*, 551-553
- Chatterjee, T. & Bhattacharyya, D.K. (2001) Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*, 541-546
- Cheong, T.K. & Oriel, P.J. (2000) Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and utilization in two-phase limonene conversions. *Applied Biochemistry Biotechnology*, *84*, 903-915.
- Clark, S.S., Zhong, L., Filiault, D., Perman, S., Ren, Z.; Gould, M. & Yang, X. (2003) Anti-Leukemia Effect of Perillyl Alcohol in Bcr/Abl-Transformed Cells Indirectly Inhibits Signaling through Mek in a Ras- and Raf-Independent Fashion *Clinical Cancer Research*, *9*, 4494-4504.
- Clarke, S. (1992) Protein Isoprenylation and Methylation at Carboxyl-Terminal Cysteine Residues *Annual Review of Biochemistry*, *61*, 355-386.

Crane, F.L., Sun, I.L.; Crowe, R.A.; Alcain, F.J. & Löw, H. (1994) Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control *Molecular Aspects of Medicine* 15, 1-11.

Crowell, P. L.; Chang, R. R.; Ren, Z. B.; Elson, C. E. & Gould, M. N. (1991) Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites *Journal of Biological Chemistry*, 266, 17679-17685.

Crowell, P. L.; Kennan, W. S.; Haag, J. D.; Ahmad, S.; Vedejs, E. & Gould, M. N. (1992) Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene *Carcinogenesis*, 13, 1261-1264.

Crowell P. L., Lin S., Vedejs E. & Gould M. N. (1992) Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 31, 205-212.

Crowell, P. L.; Lin, S.; Vedejs, E. & Gould, M. N. (1994) Structureactivity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochemical Pharmacology* 47, 1405–1415, 1994

Crowell, P.L. (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes *Journal of Nutrition* 1999, 129, 775-778.

Demyttenaere J.C.R., Van Belleghem K. & De Kimpe N. (2001) Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry* 57,199–208

Demyttenaere, J. C. R.; Vanoverschelde, J. & De Kimpe, N. (2004) Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and

Penicillium sp. and the use of solid phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A*, 1027, 137-146, 2004.

Demyttenaere, J. & De Kimpe, N. (2001) Biotransformation of terpenes by fungi - Study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 265-270.

Dhavalikar, R.S. & Bhattacharyya, PK (1966) Microbiological transformations of terpenes. VIII. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad. *Indian Journal of Biochemistry* 3,144-157

Dhavalikar, R.S., Rangachari, P.N. & Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbiological transformations of terpenes. IX. Pathways of degradation of limonene in a soil pseudomonad. *Indian Journal of Biochemistry*, 3,158–164

Duetz, W. A.; Bouwmeester H.; Beilen J. B.; Witholt B. (2003) Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 269-277.

Duetz, W.A., Fjallman, A.H.M., Ren, S.Y., Jourdat, C. & Witholt, B. (2001) Biotransformation of d-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2829–2832.

Elegbede J.A., Maltzman, T.H., Elson, C.E. & Gould, M.N. (1993) Effects of anticarcinogenic monoterpenes on phase II hepatic metabolizing enzymes, *Carcinogenesis*, 14, 1221-1223.

Elegbede, J.A. & Gould, M.N. (2002) Monoterpenes reduced adducts formation in rats exposed to aflatoxin B, *African Journal of Biotechnology*, 1, 46-49.

- Ferguson, L.R. (1994) Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research*, 307, 395-410.
- Gatfield, I. L. (1988) Production of flavour and aroma compounds by biotechnology, *Food Technology*, 42, 111-123.
- Gelb, M. H., Tamanoi, F., Yokoyama, K., Ghomashchi, F., Esson, K. & Gould, M. N. (1995) The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Letters*, 91, 169-175.
- Gould, M. N. (1995) Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes *Journal of Cellular Biochemistry*, 22, 139-144.
- Haag, J. D. & Gould, M. N. (1994) Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, 477-483.
- Hasler, C. M. (1998) Functional foods: their role in disease prevention and health promotion, *Food Technology*, 52, 63-70.
- Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F. & Croteau, R. (2000) Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 379, 127–136
- He, L., Mo, H.; Hadisusilo, S.; Qureshi, A. A.; Elson C. E. (1997) Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo *Journal of Nutrition.* 127, 668-674.
- Helander, I. M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandhom, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M.; von Wright, A. (1998) Characterization of the Action of

Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

Hill, R.A. (1993) Terpenoids, in: *The Chemistry of Natural Products* (Thompson RH, Ed),. London; New York: Blackie Academic & Professional; Champman & Hall p. 106-139.

Hirata, T., Ikeda, Y., Izumi, S., Shimoda, K., Hamada, H., Kawamura, T. (1994) Introduction of oxygenated functional groups into 3-carene and 2-pinene by cultured cells. *Phytochemistry*, 37, 401-403.

<http://umbbd.ahc.umn.edu>, acessada em fevereiro de 2006

<http://www.abecitrus.com.br>, acessada em dezembro 2004.

<http://www.medicinacomplementar.com.br/tema080805.asp>, acessada em 30/01/2006.

<http://www.sbbq.org.br/>, acessada em janeiro de 2006

Hursting, S. D.; Perkins, S. N.; Haines, D. C.; Ward, J. M.; Phang, J. M. (1995) Chemoprevention of Spontaneous Tumorigenesis in p53-Knockout Mice, *Cancer Research*, 55, 3949-3953.

Igimi, H., Nishimura, M., Kodama, R. & Ide, H. (1974) Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene): I. The absorption, distribution and excretion of d-limonene in rats. *Xenobiotica*, 4,77-84.

Imagawa, D. K.; Ming-Sing, S. Derivatives of perillyl alcohol and other immunosuppressants in organ transplantation *US pat.* 6,133,324, 2000.

Janssens L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. (1992) Production of Flavours by Microorganisms, *Process Biochemistry*, 27, 195-215

Jirtle R. L., Haag J. D., Ariazi E. & Gould M. N. (1993) Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor β 1 levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. *Cancer Research*, 53, 3849-3853.

Kaminska, J.; Markowicz, L.; Stolowska, J. & Góra, J. (1989) Biotransformation of citronellol by means of horseradish peroxidase. *Enzyme Microbiology Technology*, 11, 436-438.

Kato, K., Cox, A. D., Hisaka, M. M., Graham S. M., Buss, J. E. & Der, C. J. (1992) Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proceedings. National Academic Science U.S.A.*, 89, 6403-6407.

Kawasaki, K. (2004) Flavor compositions and dentifrices containing them. Jpn. JP2004018431, 56 pp. (CAN 140:133439)

Kawata S., Hagase T., Yamasaki E., Ishiguro H. & Matsuzawa Y. (1994) Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2) *British Journal of Cancer*, 69, 1015-1020.

Kensler, T.W. (1997) Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environmental Health Perspectives* 105, 965-970.

Kodama R., Noda K. & Ide H. (1976) Studies on the metabolism of d-limonene (*p*-mentha-1,8-diene). II: The metabolic fate of d-limonene in rabbits. *Xenobiotica*, 4, 85-95.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M, Marchant, R. & Koutinas A.A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology*, 21, 377–397.

Kraidman G, Mukherjee BB, Hill ID (1969) Conversion of d-limonene into an optically active isomer of α -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriological Proceedings*, 1969, 63.

Krings, U., Berger, R.G. (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 1-8

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. & Etherton, T.D. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113, 71-88.

Langenheim, JH. (1994) Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemistry and Ecology*, 20, 1223-1280

Lantry, L. E.; Zhang, Z.; Gao, F.; Crist, K. A.; Wang, Y.; Kelloff, G. J.; Lubet, R. A.; You M. (1997) Chemopreventive effect of perillyl alcohol on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced tumorigenesis in (C3H/HeJ X A/J)F1 mouse lung. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 27, 20-25.

Lindmark-Henriksson M (2003) Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification, Doctoral Thesis, Mid Sweden University, Stockholm, SWEDEN, 67p.

- Lindmark-Henriksson M, Isaksson D, Vanek T, Valterová I, Högberg H-E, Sjödin K (2004) Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture, *Journal of Biotechnology* 107, 173–184
- Lockwood, K. (1994) Partial and complete regression of breast cancer in patients in relation to dosage of coenzyme Q10, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199, 1504-1508.
- Lockwood, K., Moesgaard, S., Yamamoto, T. & Folkers, K. (1994) Progress on therapy of breast cancer with vitamin Q10 and the regression of metastases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212, 172-177.
- Lu, X.G., Zhan, L.B., Feng, B.A., Qu, M.Y. Yu, L.H. & Xie, J.H. (2004) Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene *World Journal of Gastroenterology*, 10, 2140-2144.
- Lupien, S., Karp, F., Wildung, M. & Croteau, R. (1999) Regiospecific Cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (–)-4S-limonene-3-hydroxylase and (–)-4S-Limonene-6-hydroxylase *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368,181-192.
- Maltzman, T. H.; Hurt, L. M.; Elson, C. E.; Tanner, M. A. & Gould, M. N. (1989) The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil, *Carcinogenesis* 1989, 10, 781-783.
- Maltzman, T.H.; Christou, M.; Gould, M.N. & Jeffcoat, C.R. (1991) Effects of monoterpenoids on *in vivo* DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes, *Carcinogenesis*, 12, 2081-2087.

Mikami Y (1988) Microbial conversion of terpenoids, in: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol 6 (Russell, GE Ed). Newcastle upon Tyne: Intercept. p 271-320.

Mills J. J., Chari R. S., Boyer I. J., Gould M. N. & Jirtle R. L. (1995) Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Research*, 55, 979-983

Milner, J. A., McDonald, S. S., Anderson, D. E. & Greenwald, P. (2001) Reviews. *Nutrition and Cancer*, 41, 1-16

Mimoun, H. 1996 Catalytic opportunities in the flavor and fragrance industry, *Chimia* 50, 620-625.

Montalto, G, Cervello, M., Giannitrapani, L., Dantona, F., Terranova, A. & Castagnetta, L.A. (2002) Epidemiology, Risk Factors, and Natural History of Hepatocellular Carcinoma, *New York Academy of Sciences*, 963, 13-20.

Noma, Y., Yamasaki, S. & Asakawa, Y. (1992) Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry* 31, 2725–2727.

Nonino, E.A. (1997) Where is the citrus industry going? *Perfumer & Flavorist*, 22, 53-58.

Ohloff, G.; *Scent and Fragrances. The Fascination of Odors and their Chemical Perspectives*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 1994

Onken, J. & Berger, R.G. (1999) Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in a aerated-membrane bioreactor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 158-163.

Phillips, L. R.; Malspeis, L.; Supko, J. G. (1995) Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl Alcohol. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 676.

Prema, B.R. & Bhattacharyya, P.K. (1962) Microbiological transformation of terpenes. II. Transformations of α -pinene. *Applied Microbiology*, **10**, 524-528.

Raphael, T. J. & Kuttan, G. (2002) Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. *Journal of Experimental Clinical and Cancer Research*, **22**, 419-424.

Ren, Z. & Gould, M. N. (1994) Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Letters*, **76**, 185-190.

Ren, Z.; Gould, M.N. (1998) Modulation of small G protein isoprenylation by anticancer monoterpenes in *in situ* mammary gland epithelial cells. *Carcinogenesis* **1998**, **19**, 827-832.

Ribeiro, L. R. & Salvadori, D. M. F. (2003) Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. *Mutation Research*, **544**, 195-201.

Ripple, G.H., Gould, M.N., Stewart, J.A., Tutsch, K.D., Arzoomanian, R.Z., Alberti, D., Feierabend, C., Pomplun, M., Wilding, G. & Bailey, H.H. (2003) Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clinical Cancer Research*, **4**, 1159-1164.

Ruberto, G. & Baratta, M. T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food Chemistry*, **69**, 167-174.

Sarin, S.K., Thakur, V., Guptan, R.C., Saigal, S. Malhotra, V. & Thyagarajan, S.P. (2001) Profile of hepatocellular carcinoma in India: An insight into the possible etiologic associations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16, 666-673.

Schrader, J. & Berger, R. G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (2nd Ed), **Biotechnology**. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p 373-422.

Schulz, S., Buhling, F. & Ansorge, S. (1994) Prenylated proteins and lymphocyte proliferation: inhibition by d-limonene and related monoterpenes. *European Journal of Immunology* 24, 301-307.

Serra, S., Fuganti, C. & Brenna, E. (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends in Biotechnology*, 23,193-198.

Shi, W. & Gould, M.N. (1995) Induction of differentiation in neuro-2A cells by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Letters*, 95, 1-6.

Shi, W. & Gould, M.N. (1997) The anticancer monoterpene perillyl alcohol causes a decrease in cellular cyclin D1 levels contributing to an early G1 arrest in mammary cells. *Proceedings of American Association Cancer Research*, 38, 263.

Speelmans, G., Bijlsma, A., Eggink, G. (1998) Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 538–544.

Stark, M. J., Burke, Y. D., McKinzie, J. H., Ayoubi, A. S. & Crowell, P. L. (1995) Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Letters*, 96, 15-21.

Stayrook, K. R., McKinzie, J. H., Barbhaiya, L. H. & Crowell, P. L. (1998) Effects of the antitumor agent perillyl alcohol on H-Ras vs. K-Ras farnesylation and signal transduction in pancreatic cells. *Anticancer Research* 18, 823-828.

Stayrook, K.R., McKinzie, J.H., Burke, Y.D., Burke, Y.A. & Crowell, P. L. (1997) Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 18, 1655-1658.

Tan, Q. & Day, D.F. (1998a) Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)-alpha-terpineol. *Process Biochemistry* 33, 755–761

Tan, Q. & Day, D.F. (1998b) Bioconversion of limonene to a-terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 96-101.

Tan, Q.; Day, D.F. & Cadwallader, K.R. (1998) Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*, 33, 29–37

Trytek, M. & Fiedurek, J. (2005) A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnology Letters*, 27,149-153.

Unlu, S.; Mason, C.D.; Schachter, M.; Hughes, A.D. (2000) Perillyl alcohol, an inhibitor of geranylgeranyl transferase, induces apoptosis of immortalized human vascular smooth muscle cells in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35, 341-344.

Van der Werf, M.J., Swarts, H.J. & De Bont, J.A.M. (1999) *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied Environmental Microbiology* 65, 2092–2102.

- Van der Werf, M.J., Keijzer, P.M. & Van der Schaft, P.H. (2000) *Xanthobacter* sp C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal of Biotechnology* 84, 133–143.
- Van Dyk, M.S., van Rensburg, E. & Moleleki, N. (1998) Hydroxylation of (+)limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters*, 20, 431-436
- van Lieshout, E.M.M., Bedaf, M.M.G., Pieter, M., Ekkel, C., Nijhoff, W.A., Peters, W.H.M. (1998) Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis*, 19, 2055-2057.
- Van Rensburg, E., Moleleki, N., VanderWalt, J.P., Botes, P.J. & VanDyk MS (1997) Biotransformation of (+)limonene and (-)piperitone by yeasts and yeast-like fungi. *Biotechnology Letters* 19, 779–782.
- Vanek, T., Valterova, I., Vankova, R. & Vaisar, T. (1999) Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. *Biotechnology Letters* 21, 625–628.
- Watabe, T., Hiratsuka, A., Isobe, M. & Ozawa, N. (1980) Metabolism of d-limonene by hepatic microsomes to non-mutagenic epoxides toward *Salmonella typhimurium*. *Biochemical Pharmacology*, 29, 1068-1071.
- Wattenberg, L. W., Sparnins, V. L. & Barany, G. (1989) Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Research*, 49, 2689-2692.

- Welsh, F. W.; Murray, W. D.; Williams, R. E. (1989) Microbiological and Enzymatic Production of Flavour and Fragrance Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9, 105-169
- Wild, C.P., Yin, F., Turner, P.C., Chemin, I., Chapot, B., Mendy, M., Whittle, H., Kirk, G.D. & Hall, A.J. (2000) Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in The Gambia. *International Journal of Cancer*, 86, 1-7.
- Wright, S. J., Caunt, P., Carter, D. & Baker, P.B. (1986). Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23, 224-227.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., Raneva, V.G. (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.
- Yoo, S.K. & Day, D.F. (2002) Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN, *Process Biochemistry*, 37, 739-745.
- Yu, W., Heim, K., Qian, M., Simmons-Menchaca, M., Sanders, B.G. & Kline, K. (1997) Evidence for role of transforming growth factor-beta in RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human MDA-MB-435 breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 27, 267-278.
- Zheng, G.; Kenney, P. M.; Lam, L. K. T. (1992a) Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 751-755.

Zheng, G.Q., Kenney, P.M. & Lam, L.K. (1992b) Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Planta Medica*, 58, 338-341.

Capítulo 2 – Biotransformação de Limoneno

***R*-(+)- α -terpineol production by limonene biotransformation in cassava medium**

Mário Roberto Maróstica Junior*; Gláucia Maria Pastore

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of
Campinas, P.O. Box. 6121, 13083-862 Campinas, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-3887, fax.: +55-19-3788-3887; e-mail
addresses: mario@fea.unicamp.br (Mário Roberto Maróstica Junior),
glaupast@fea.unicamp.br (Glaucia Maria Pastore).

Abstract

The use of two agro-residues (liquid cassava waste and orange essential oil) in the biotransformation of *R*-(+)-limonene was investigated. The main components of orange essential oil were determined by GC-MS and *R*-(+)-limonene was shown to be the predominant constituent, accounting for more than 94% of the total content. Cassava wastewater proved to be a suitable substrate for mycelial growth, leading to good, rapid growth with all the fungal strains tested, reaching 29.4 g/L (dry

weight) after three days of growth (*Penicillium sp* 2025). The best *R-(+)-α*-terpineol yields were achieved when the strains were grown in cassava media and the mycelia then transferred to a new flask containing mineral medium and orange essential oil as the sole C- and energy source. One of the strains tested, *Fusarium oxysporum* 152B, converted *R-(+)*-limonene to *R-(+)-α*-terpineol, yielding nearly 450 mg/L after three days of transformation. Growth in the presence of a 1% solution of orange essential oil in decane did not increase the transformation yields.

Key words: biotransformation, industrial residues, R-(+)-limonene, R-(+)-α-terpineol, Fusarium oxysporum.

1. Introduction

In recent years, there has been an increasing trend towards efficient utilization and value addition of agro-industrial residues such as coffee pulp and husk, cassava bagasse, cassava flour wastewater (manipueira), sugar cane bagasse, sugar beet pulp and apple pomace, as well as many essential oils. The application of agro-industrial residues in bioprocesses provides alternative substrates while at the same time helping to solve pollution problems. With the advent of biotechnological innovations, many new possibilities are emerging in this field (Pandey, Soccol, Nigam, Brand, Mohan, & Roussos, 2000).

Liquid cassava waste (manipueira) arises from the pressing of cassava roots (generated at the rate of 250 L per ton of cassava) (Damasceno, Cereda, &

Pastore, 1999) and can be considered as a “harmful” (Vieites, 1998) pollutant waste because of its high organic content and the presence of cyanide. On the other hand, this waste can be considered as a residue rich in nutrients, and can therefore be used for other applications. Studies of such applications include the production of biosurfactant by a wild-type *Bacillus* sp (Nitschke, & Pastore, 2003), production of fruit flavour by *Geotrichum fragrans* in manipueira (Damasceno, Cereda & Pastore 1999) and the production of citric acid by *Aspergillus niger* (Leonel, & Cereda, 1995).

Essential oils are dominated by monoterpene hydrocarbons, which are regarded as process waste, mainly because of their low sensory activity, low water solubility and tendency to autoxidise and polymerise (Berger, Krings, & Zorn, 2002), which makes terpene hydrocarbons, such as limonenes, pinenes and terpinenes, ideal starting materials for microbial transformations. Furthermore, *R*-(+)-limonene is a popular starting product for bioconversions because of its widespread and cheap availability (Adams, Demyttenaere, & De Kimpe, 2003). “Natural” flavours can be produced via biotransformation or bioconversion, while satisfying consumer demand for natural products (Berger, 1995; Carvalho, & Fonseca, 2002).

An interesting end product resulting from the bioconversion of limonene is the monoterpene alcohol α -terpineol. Bioconversion of limonene to *R*-(+)- α -terpineol has been described using a wide range of microorganisms as catalysts including a *Cladosporium* strain (Kraidman, Mukherjee, & Hill, 1969), *Penicillium digitatum* DSM 62840 (Abraham, Stumpf, & Kieslich, 1986), *Pseudomonas gladioli* (Cadwallader, & Braddock, 1992), *Aspergillus cellulosa* M-77 (Noma, Yamasaki, & Asakawa, 1992), *Bacillus stearothermophilus* BR388 (Chang, Gage, & Oriel,

1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Acosta, Mazas, Mejias, & Pino, 1995), *Escherichia coli* (expressing a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* BR388) (Chang, Gage, & Oriel, 1995) and *Penicillium digitatum* (Tan, & Day, 1998a; Tan, & Day, 1998b; Tan, Day, & Cadwallader 1998; Adams, Demyttenaere & De Kimpe 2003).

R-(+)- α -terpineol has a floral, typically lilac odour, while (*S*)-(-)- α -terpineol has a characteristic coniferous odour. α -Terpineol, one of the most commonly used fragrance compounds, is mostly produced chemically and is thus commercially available at a relatively low price. A great advantage of enzymatic processes as compared to chemical synthesis is their enantiospecificity. Terpene transformations generally suffer from the volatility of the substrate and from the toxicity of terpenes towards microorganisms (Onken, & Berger, 1999).

This study reports the use of two Brazilian industrial wastes (orange essential oil and cassava waste water) in a biotechnological process. The biotransformation of limonene (present in great amounts in the essential oil) as the sole C-source by a *Fusarium oxysporum* strain grown in cassava waste water was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Agro-industrial residues

The industrial residues, orange essential oil and manipueira (cassava water flour) were obtained, respectively, from an orange juice industry and from a cassava flour plant, both located in the State of São Paulo, Brazil.

2.2. Chemicals

R-(+)- α -terpineol (~99%ee), *S*-(-)- α -terpineol (~99%ee), *R*-(+)-limonene (~99%ee) and *S*-(-)-limonene (~96%ee) were purchased from Aldrich Chemical Company. All of the chemicals and solvents were analytical grade.

2.3. Microorganisms and cultivation

The strains *Penicillium sp* 2025, *Aspergillus sp* 2038, *Fusarium oxysporum* 152B from the Bioflavours Laboratory culture collection, were cultivated and conserved by periodic replications (once a week) on yeast-malt agar (YM: bacteriological peptone 0.5%, glucose 1.0%, malt extract 0.3%, yeast extract 0.3%, and agar 2.0%, pH 6.0).

2.4. Cassava medium preparation

Cassava effluent obtained from the manufacture of cassava flour was collected and stored at -18°C until needed. The medium was prepared by heating the waste to boiling to remove solids. After cooling, the substrate was centrifuged at 10,000 rpm (15,500 G) at 5°C for 20 min. The supernatant was sterilized (121°C for 20 min). The pH prior to autoclaving was 5.3 and was not adjusted.

2.5. Total carbohydrates analyses in cassava medium

Total carbohydrates were determined by a colorimetric method based on the reaction of Phenol reaction with glucose (Daniels; Hanson, & Phyllips, 1994).

2.6. Determination of reducing sugars contents in cassava medium

Total reducing sugars were quantified according to Somogy (1945) ($\lambda = 540$ nm).

2.7. Determination of nitrogen content in cassava medium

The protein content was calculated from the nitrogen determination by the Kjeldahl procedure using 6.25 as the conversion factor (AOAC, 1995)

2.8. Determination of minerals contents in cassava medium

One milliliter of cassava medium was “incinerated” for 3 h at 500 °C. Five milliliters of HCl 6 M were added and evaporated. The solid was transferred to a 50 mL flask volumetric and filtered. The minerals were determined by an atomic emission spectrophotometry (Jobin Yvon, model JY 50P). The spectral lines for each element were (in nm): P, 178; K 766, Ca, 317; Mg, 279; Mn, 257; Fe, 259; Cu, 324; Zn, 213; and S, 180.

2.9. Analysis of chemical oxygen demand (COD) of cassava waste water and total solids

The chemical oxygen demand (COD) and total solids of cassava waste water were determined according to the procedures described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995).

2.10. Mineral medium composition

The composition was 0.5 g of Mg SO₄, 3.0 g of NaNO₃, 1.0 g of K₂HPO₄, 0.5g KCl and 0.01 g of Fe₂SO₄ in 1.0 L of distilled water (Brunerie, Benda, Bock, & Schreier, 1987). The medium was sterilized at 121°C for 20 min. The pH was 7.0 and was not adjusted.

2.11. Biotransformation experiments

Biotransformation experiments with all of the strains and media were run for seven days, (all in duplicate). The fungi were cultivated in 250 mL conical flasks containing 50 mL of liquid medium.

2.11.1. Biotransformation experiments in cassava medium (CM) and mineral medium (MM)

For experimental cultures, 50 mL of culture medium was inoculated with 2.5 mL of an aqueous spore suspension ($1-7 \times 10^7$ spore mL⁻¹) and incubated in a rotary shaker at 160 rpm and 30°C. After three days, biotransformation was initiated with the addition of 50 µL of orange essential oil (under sterile conditions). Two subsequent additions of 50 µL were done every 24 h. Incubation was continued for two more days after the last addition.

2.11.2. Biotransformation experiments in two steps

For experimental cultures, 50 mL of CM culture was inoculated with 2.5 mL of an aqueous spore suspension ($1-7 \times 10^7$ spore mL⁻¹) and incubated in a rotary shaker at 160rpm and 30°C. After three days, the culture was filtered through Whatman

filters under sterile conditions. The mycelia were washed three times with sterile (121°C for 20 min) distilled water and transferred to another flask containing 50 mL of mineral medium. Biotransformation was started by adding 50 µL of orange essential oil (under sterile conditions). Two subsequent additions of 50 µL were made every 24 h. The experiments were continued for two more days after the last addition.

In the same way, chemical blanks at the same final pH values (the pH was adjusted with HCl prior to autoclaving) as the biotransformation experiments were also done, but without mycelium, to ensure the absence of chemical transformation reactions. At 24, 48, 72 and 96 h after the addition of orange essential oil, 5 mL samples were taken and extracted with 5 mL of Et₂O. The samples were analyzed directly by GC/FID with decane as the internal standard.

2.12. Fusarium oxysporum grown in the presence of orange essential oil in decane

A 200 µL aliquot of an aqueous cell suspension was spread on a yeast-malt agar slant. After cultivation for two days, 10 mL of a 0.1% solution of orange essential oil in decane was added to the tubes and incubated at 30°C for five days without stirring (Oda, Sugai, & Ohta, 1999).

An aliquot of 2.5 mL of the suspension was then inoculated into a conical flask containing 50 mL of cassava medium. The biotransformation experiments were done in the same way as described in section 2.11.2. Camphor was used as the internal standard.

2.13. Analysis of the samples by GC and GC-MS

GC-analyses for the biotransformation products were done with a Chrompack CP9001 gas chromatograph equipped with a split/splitless-injector, an FID-detector and a WCOT Fused Silica column. The stationary phase was CP-Sil CB (60 m length x 0.25 mm i.d.; coating thickness of 0.25 μm). The working conditions were: injector 220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 40 to 210 at 5°C/min with an initial holding time of 1 min and a final holding time of 5 min. Quantification was done by calibration according with the internal standard (decane or canfor). Chiral GC-analyses were done with the same GC, equipped with a Beta Dex 120 chiral column (60 m x 0.25 mm i.d. coating thickness 0.25 μm). The working conditions were: injector 220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 110°C to 170°C at 1°C/min with an initial holding time of 10 min and a final holding time of 5 min.

GC-MS-analyses were done using a Varian Saturn gas chromatograph equipped with an EM-IT mass selective detector, a CP-Sil 8CB Low bleed/MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and a split/splitless CP1177 injector. The working conditions were: injector 280°C, transfer line to MSD 260°C. The oven temperature was programmed from 40°C (1 min) to 160°C (3 min) at 5°C/min and from 160°C to 250°C with a final holding time of 5 min, scan range m/z 40-500, carrier gas (He) 1 mL/min, split 1/50, ionisation EI 70 eV, mass range 40-500 amu and scan rate, 1 s⁻¹.

Positive identifications were made by matching sample retention indices (RI) and mass spectra of the samples with those of the standards, analysed under identical conditions.

3. Results and Discussion

3.1. Orange essential oil composition

The orange essential oil used in this study was analysed by GC-MS. The compounds identified and their percentages are shown in Table 1. Ten compounds, representing 99% of the GC profile, were identified, but other minor compounds could not be identified. Compounds with concentrations below 0.1% were not considered. According to the composition, the major constituents of the oil were limonene, myrcene, carvone and carveol. Some oxidation compounds, such as carvone, carveol and limonene oxide, were identified. These were taken into account in the biotransformation analyses and were recovered mainly in the chemical blank (medium with orange essential oil, but without the culture). The chromatographic profiles obtained from the biotransformation experiments were compared to those from the diluted orange essential oil (to confirm that the α -terpineol was really a biotransformation product and did not come from the oil) and to those from the chemical blanks (to ensure that the α -terpineol was not chemically transformed).

Table 1. Composition of orange essential oil analyzed by GC-MS

Compound	%
α -pinene	0.53
Myrcene	1.21
Terpinene	0.20
Limonene	94.29
Dyhydromircene	0.55
Unknown	0.26
trans-p-2,8-menthadien-1-ol	0.10
Carveol	0.72
Carvone	1.12
Limonene oxide	0.15
Z-citral	0.17
Unknown	0.10

3.2. Composition of cassava wastewater (manipueira)

Manipueira is a residue generated in great amounts during the manufacture of cassava flour, a very common ingredient used in Brazilian cookery. The major nutrients present in cassava waste are sugars (sucrose, glucose, fructose and maltose), nitrogen and mineral salts. Although disposal of this residue is an interesting problem because of its high organic load, it is also a very attractive substrate for biotechnological processes. Economic aspects are very important for an industrial process and the raw material represents 30% of the total costs of biotechnological processes (Cameotra, & Makkar, 1998). The composition of the manipueira used in this study is shown in Table 2.

Table 2. Composition of the manipueira used in this work compared with (Nitscke & Pastore, 2003) and (Damasceno, Cereda & Pastore 1999)

Components	Concentration			
	This study	Nitschke (2003)	Damasceno (1999)	
Total solids	60.00	62.00	62.00	g/L
COD ^a	53.40	55.80	60.00	g/L
Total sugars	39.50	41.45	58.18	g/L
Non-reducing sugars	20.12	23.27	20.22	g/L
Reducing sugars	19.38	18.25	37.96	g/L
Total Nitrogen	1.72	2.08	1.60	g/L
Phosphorous	368.8	244.5	83.30	mg/L
Potassium	3641.0	3472.60	895.00	mg/L
Calcium	236.0	292.53	184.00	mg/L
Magnesium	438.1	519.00	173.00	mg/L
Sulphur	61.35	154.00	38.00	mg/L
Iron	2.72	7.80	8.00	mg/L
Zinc	3.01	2.80	4.50	mg/L
Manganese	3.46	1.70	1.50	mg/L
Copper	1.11	1.00	0.75	mg/L
pH	5.3	5.8	5.5	

^aChemical Oxygen Demand

3.3. Manipueira as a bioconversion medium

Cassava medium (CM) has high contents of C-source and minerals. Manipueira also has high contents of substances, such as cyanide, that could limit the growth or inhibit the capacity of biotransformation. CM was tested in the bioconversion of *R-(+)*-limonene by the strains *Penicillium sp* 2025, *Aspergillus sp* 2038, *Fusarium oxysporum* 152B. CM was an excellent medium for the growth of all the fungal strains. The dry matter obtained is shown in table 3 and indicates that manipueira was an excellent medium for biomass production and was an appropriate biotransformation medium for *Fusarium oxysporum*.

Table 3. Amounts of α -terpineol, residual non-converted limonene after the biotransformation experiments, final pH and dry matter^e.

Strain	Medium	α -terpineol (mg/L)	Limonene ^a (mg/L)	pH	Dry matter (g/L)
2025	CM ^b	0.0	4.8	3.8	29.1
2025	MM ^c	7.4	2.3	6.7	0 ^f
2025	CM + MM ^d	15.9	1.3	6.5	29.4
2038	CM	15.2	5.2	3.7	28.7
2038	MM	5.5	1.1	6.6	0 ^f
2038	CM + MM	23.2	1.4	5.8	27.9
152B	CM	204.5	5.3	6.1	24.5
152B	MM	6.1	1.6	6.3	0 ^f
152B	CM + MM	448.7	0.9	6.0	23.5

^aConcentration of residual limonene in the medium

^bCM (Cassava medium)

^cMM (Mineral medium)

^dCM + MM (Cassava medium + Mineral medium). The strains were grown in cassava medium and then transferred to the mineral medium - biotransformation started on the addition of orange essential oil.

^eThe values in table 3 are the mean of the final concentrations (duplicate), and were obtained after seven days of experiments.

^fThe mycelium did not develop, only spores remaining in the medium.

3.4. Comparison of the strains and media

The three strains were compared using the different media, designated as CM, MM and CM+MM for biotransformation (see section 2). The concentrations of *R*-(+)- α -terpineol and the residual limonene (from the orange essential oil), and the final broth pH, are shown in table 3. It is clear that of the strains tested, the strain *Fusarium oxysporum* 152B produced the best yields. The concentration of non-converted limonene was very small in all cases. Losses can be explained on the basis of volatility. Differences with respect to growth and bioconversion were observed. The mineral medium (MM) had no C or N sources, and did not therefore allow for the development of cellular mass, but a small amount of *R*-(+)- α -terpineol

was produced by all the strains, indicating spore activity. The influence of the medium was different for each strain tested and it was not possible to establish a rule, but for all the strains the *R*-(+)- α -terpineol concentration was much higher when the mycelium developed in CM was transferred to MM, and the bioconversion occurred with orange essential oil as the sole C-source.

The degradation of limonene via the perillyl alcohol route by *Pseudomonas putida* has been reported (Dhavalikar, & Bhattacharyya, 1966; Duetz, Bouwmeester, van Beilen, & Witholt, 2003), and the authors also reported that limonene was used as the sole C and energy source. Thus, it can be concluded that the medium has a great influence on bioconversion activity, and the presence of limonene as the sole C and energy source in the presence of developed mycelia increases the biotransformation yields.

R-(+)- α -terpineol was not the only product. Small concentrations of perillyl alcohol could be detected. The strain 2025 produced this alcohol in very low concentrations (approximately 1.4 mg/L) after 48 h in the presence of cassava medium (data not shown). The strain 152B also produced perillyl alcohol. The concentrations reached up to 10 mg/L after 96 h of biotransformation, when the fungi developed in the cassava medium were transferred to the mineral medium (Fig. 1).

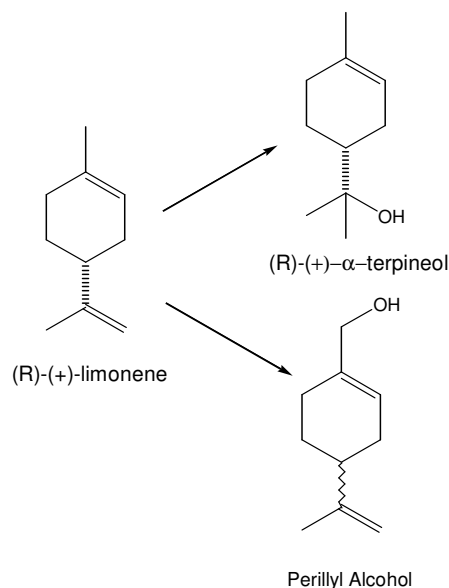


Fig. 1 – Biotransformation of (R)-(+)-limonene by the *Fusarium oxysporum* strain.

3.5. Influence of a solution of orange essential oil in decane on strain growth

The parameter expressing the toxicity of a solvent for microorganisms is the $\log P_{OW}$ (logarithm of the partition coefficient of the substance in an n-octanol/water system). Greatest toxicities were observed for solvents with a $\log P_{OW}$ between 1 and 5 (Onken, & Berger, 1999). Thus limonene ($\log P_{OW} = 4.8$) is considered toxic for microorganisms. On the other hand, compounds such as decane ($\log P_{OW} = 6.0$) are less toxic and can supply oxygen to the cells because of the high solubility of the gas in the solvent. The effect of co-solvents in biotransformations/bioconversions has already been studied (Adams, Demyttenaere & De Kimpe, 2003; Tan & Day, 1998b). In the present study, a 0.1% solution of orange essential oil in decane was used to induce the limonene-converting enzymatic system in the 152B strain, which was placed in contact with limonene after two days of growth in slants. Some authors have reported the use of

an interface bioreactor as a way of alleviating toxicity (Oda, Inada, Kato, Matsudomi, & Ohta, 1995; Oda, Sugai, & Ohta 1999; Oda, & Ohta, 1992). In this work, a different attempt at inducing the strain was made, by placing it in contact with the substrate. The toxicity of limonene at the growth interface (in which the strain was developed) was somewhat attenuated by the presence of decane. Aliquots of 200 μ L were withdrawn aseptically from the slants and analysed by GC to confirm that *R*-(+)- α -terpineol was not produced in significant amounts during the induction time, only trace amounts were found to be produced.

Growth in the presence of orange essential oil in decane was tested with the *Fusarium oxysporum* strain, and the results for yields of *R*-(+)- α -terpineol and amounts of non-converted limonene are shown in Fig 2. The inhibition caused by limonene was seen by comparing the cellular mass obtained in cassava medium without orange essential oil (reaching 32.3 g of cellular mass/L), with 0.1% of the oil (23.5 g of cellular mass/L), and 0.1% of oil in the presence of decane (27.0 g/L). This result show that decane alleviates the toxicity caused by limonene.

The strain grown in the presence of orange essential oil in decane produced similar yields of *R*-(+)- α -terpineol to that grown in the absence of the solvent. Higher yields were expected because of the induction promoted by the addition of limonene, and the consequent fungal growth in the presence of the substrate (orange essential oil).

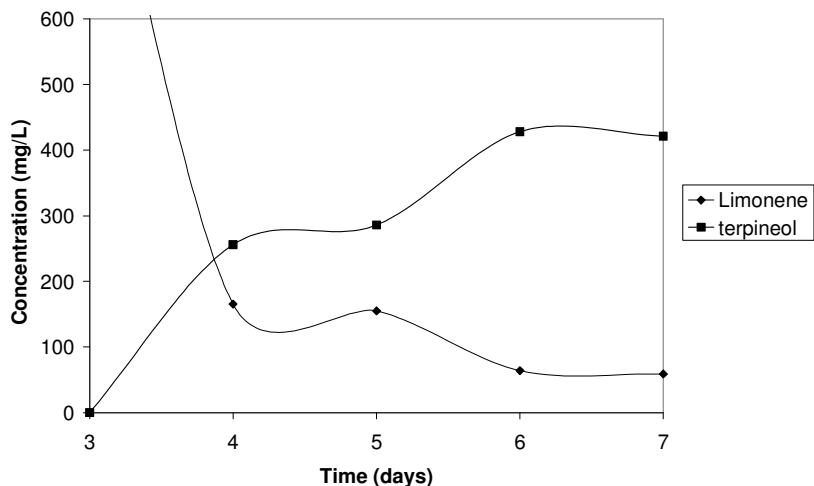


Fig. 2. Biotransformation of limonene by induced *Fusarium oxysporum* strain in the presence of decane, developed in cassava waste water and transferred into mineral medium.

The enzyme system converting limonene to α -terpineol was shown to be inducible in *Penicillium digitatum* (Tan, Day & Cadwallader 1998). When a small amount of limonene (200 ppm) were spiked into growing cell cultures, a strong synergetic rise in α -terpineol production was observed. Despite having a suitable log P_{OW} , the fungus was inhibited by the high solvent concentration. Unfortunately, in this experiment, the production of *R*-(+)- α -terpineol was not higher in the induction experiments.

4. Conclusions

In this study we showed high growth of the fungi tested in the cassava medium. The biotransformation of orange essential oil and the production of α -terpineol as the main product were investigated. The production of α -terpineol was higher (2-

fold for the *Fusarium oxysporum* 152B strain) when orange essential oil was the sole source of C and energy, as compared to experiments with a transformation medium that included other C and N-sources (bioconversion in the presence of cassava medium). Induction with the substrate and solvent did not enhance the yields of α -terpineol. To date, no studies have reported the use of manipueira as a medium for the biotransformation of terpenes.

Acknowledgements

This project was funded by CNPq (process number 141601/2004-3), Brazil.

References

- Abraham W.R., Stumpf, B., & Kieslich, K. (1986). Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 24-30.
- Acosta, M., Mazas, N. , Mejias, E., & Pino, J. (1996). Obtencion de aromatizantes mediante biotransformacion del limoneno. *Alimentaria*, 272, 73-75.
- Adams A., Demyttenaere J.C.R., & De Kimpe N. (2003). Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. *Food Chemistry*, 80, 525–534.
- APHA. (1995). *Standard methods for examination of water and wastewater* (19th ed.), Washington DC: APHA.
- AOAC (1995). *Official Method of Analysis* (16th ed.), Virginia: AOAC International.
- Berger R.G., Krings U., & Zorn H. (2002) Biotechnological flavour generation, In A. J. Taylor, Food flavour technology. (p. 60-104). Weimar: C.H.I.P.S Press.
- Berger, R. G. (Ed.). (1995). *Aroma biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Brunerie, P.; Benda, I.; Bock, G.; & Schreier, P. (1987). Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 6-10.
- Cadwallader, K. R., & Braddock, R. J. (1992). Enzymatic hydration of (4*R*)-(+)-limonene to (4*R*)-(+)- α -terpineol. *Developments in Food Science*, 29, 571–584.
- Cameotra S.S., & Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.

Carvalho, C.C.C.R., & Fonseca, M. M.R. (2002). Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 389-398.

Chang H.C., Gage D.A., & Oriel, P.J. (1995). Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Food Science*, 60, 551-553.

Chang H.C., Gage, D.A., & Oriel, P. (1994). Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Food Science*, 59, 660-662.

Damasceno, S., Cereda, M. P., & Pastore, G.M. (1999). Desenvolvimento de *Geotrichum fragrans* em manipueira. *Energia na Agricultura*, 14(2), 7-14.

Daniels, L., Hanson, R., & Phyllips, J.A. (1994). Chemical analysis. In: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg, (pp. 518-519). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC.

Dhavalikar, R.S., & Bhattacharyya, P.K. (1966). Microbiological transformations of terpenes: Part VIII-fermentation of limonene by a soil pseudomonad. *Indian Journal of Biochemistry*, 3, 144-157.

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen J. B., & Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, :269-277.

Kraidman, G., Mukherjee, B.B., & Hill, I.D. (1969). Conversion of D-limonene into an optically active isomer of α -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriological Proceedings*, 1969, 63.

Leonel, M.; & Cereda, M. P. (1995). Citric acid production by *Aspergillus niger* from "Manipueira", a manioc liquid residue. *Scientia Agricola*, 52(2), 299-304.

Nitschke. M., & Pastore, G.M. (2003). Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 106, 295-302.

Noma; Y., Yamasaki, S., & Asakawa, Y. (1992). Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*, 31 (8), 2725-2727.

Oda, S., Inada, Y., Kato, A., Matsudomi, N., & Ohta H. (1995). Production of (S)-citronellic acid and (R)-citronellol with an interface bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(6), 559-564;

Oda, S., & Ohta, H. (1992). Alleviation of toxicity of poisonous organic compounds on hydrophilic carrier/hydrophobic organic solvent interface. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56(9), 1515-1517.

Oda, S., Sugai, T., & Ohta, H. (1999). Optical resolution of racemic citronellol via a double coupling system in an interface bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(4), 473-480.

Onken, J., & Berger, R.G. (1999). Effects of *R-(+)*-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69, 163-168.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 153-162.

Somogy M. (1945). Determination of blood sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 160, 69–73.

Tan, Q., & Day, D. F. (1998a). Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 96–101.

Tan, Q., & Day, D. F. (1998b). Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- α -terpineol. *Process Biochemistry*, 33(7), 755–761.

Tan, Q., Day, D. F., & Cadwallader, K. R. (1998c). Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*, 33(1), 29–37.

Vieites, R.L. (1998) Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. *Revista PAB Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 5, 59-65.

Capítulo 3 – Biotransformação de citronelol

Rose oxide production by citronellol biotransformation in cassava medium

Mário Roberto Maróstica Junior*; Gláucia Maria Pastore

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box. 6121, 13.083-862 Campinas, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-3887, fax.: +55-19-3788-3887; e-mail addresses: mario@fea.unicamp.br (Mário Roberto Maróstica Junior), glaupast@fea.unicamp.br (Glaucia Maria Pastore).

Abstract

The use of liquid cassava waste (manipueira) as the medium for biotransformation of citronellol using a *Penicillium* sp strain was studied. The strain was able to grow in the waste and the production of cellular mass reached 25 g/L during three days of contact of the spores with the medium. Submerged cultures of *Penicillium* sp grown in manipueira were able to convert the substrate into *cis*- and *trans*-rose oxides when the cells were transferred into a mineral medium for the biotransformation experiments. The production of rose oxide increased by more than 2.4 fold using this two media process as compared to processes using only manipueira medium (cassava medium). Auto-oxidation products were not detected in the control experiments.

Key words: biotransformation, manipueira, citronellol, Penicillium sp.

1. Introduction

Citronellol is a perfumery, flavoring compound of great interest to industrial companies since it can be used to synthesize other aroma compounds, such as rose oxide (Brunerie, Benda, Bock & Schreier, 1987; Kumar, Umar, Singh, Brij, Raj & Virendra 2003). Citronellol can be used to generate floral notes (Serra, Fuganti & Brenna 2005). The biotransformation of citronellol can generate a wide number of metabolites (Cameotra & Makkar 1998; Demyttenaere, Vanoverschelde & De Kimpe 2004; Griffin, Wyllie & Markham 1999; Onken & Berger 1999) and one of the most interesting compounds is rose oxide.

Rose oxide is found in small amounts in some plants such as the Bulgarian rose, Geranium, Damask rose (Babu, Singh, Joshi & Singh 2002), *Laggera* spp (Kuiate, Bessière, & Zollo 2002), *Eucalyptus citriodora* (Taneja, Sethi, Andotra, Koul & Qazi 2005) and *Dracocephalumheterophyllum Benth*, a cold desert plant containing 1.6% cis-rose oxide, 0.5% trans-rose oxide and 7.4% citronellol in its essential oil (Kumar, Umar, Singh, Brij, Raj & Virendra 2003).

L-*cis*-rose oxide is an impacting fruity flavor compound and has a small odor threshold (0.5 ppb), while d-*cis*-rose oxide has an herbal odor and odor threshold of 50 ppb. L-*cis*-rose oxide can be chemically synthesized from S-citronellol (Boersma, Scheltinga, Dröge, Bos & Quax 2005). The organic synthesis of (+)-*cis*-rose oxide from R-(+)-methylcyclohexanone as the starting material has been described (Gravel & Bordeleau 1998).

Biotransformation can be considered an advantageous alternative for chemical synthesis since enzymes are capable of enantioselective hydrolysis generating enantiospecific compounds labeled as 'natural' according to the American and European legislations (Serra, Fuganti & Brenna 2005).

For this reason some authors have proposed the biotransformation of citronellol. In 1987, a research group described the biotransformation of citronellol using a strain of the noble grape rot fungus *Botrytis cinerea* (Brunerie, Benda, Bock & Schreier 1987). The main metabolites were 2,6-dimethyl-1,8-octadienol and (E)-2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol as a result of ω -hydroxylation. The authors reported the use of grape must, a synthetic mineral medium and a combination of both (in proportions of 1-5:700 grape must:mineral medium) as media for the biotransformation of citronellol in their experiments.

The use of enzymes for biotransformation is also a feasible approach, as described by Kaminska, Markowicz, Stolowska & Góra (1989). These authors described the biotransformation of citronellol by a horseradish peroxidase-hydrogen peroxide system in the presence of ascorbic acid as the proton donor.

Onken and Berger (1999) proposed a greater scale process for the biotransformation of citronellol in a 2 L bioreactor. A strain of the basidiomycete *Cystoderma carcharias* achieved $0.15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ of biotransformation products in a 2 L aerated-membrane bioreactor. The increased gas-exchange surface provided higher oxygen saturation, growth and transformation rates. The main product was 3,7-dimethyl-1,6,7-octanetriol. 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol was identified as an important intermediary product of the biotransformation and the allylic diols 2,6-

dimethyl-2-octene-1,8diol, 3,7-dimethyl-5-octene-1,7-diol and 3,7-dimethyl-7-octene-1,6-diol, as well as *cis/trans*-rose oxide (first report of the microbial formation of rose oxide) were found to be minor products. Onken and Berger (1999) suggested that a cytochrome P-450 monooxygenase was involved in the first oxy-functional step, and that subsequent steps were catalyzed by hydrolase and transferase enzymes.

More recently, Demyttenaere, Vanoverschelde and De Kimpe (2004) proposed the use of SPME (Solid Phase Micro Extraction) for the screening of strains capable of biotransforming citronellol. These authors found that rose oxide was obtained by a combination of biotransformation and acid-catalyzed heat conversion.

The use of agro-industrial residues in bioprocesses is an attractive alternative since it provides alternative substrates and helps to solve pollution problems. Liquid cassava waste originates from the pressing of cassava roots (Damasceno, Cereda & Pastore 1999). This waste is considered to be a “harmful” pollutant because of its high organic content and presence of cyanide, resulting from the cyanidic glycosides (linamarin and lantaustralin) of cassava roots. These compounds leach into the residual liquid during the process and are hydrolyzed to cyanide by enzymatic action (Nitschke & Pastore 2003). On the other hand, liquid cassava waste can be considered to be rich in nutrients that can be used in other applications.

This study investigated the use of cassava wastewater in the biotransformation of the substrate citronellol into rose oxides, and the effects of citronellol as the sole C- and energy-sources for the biotransformation experiments.

2 - Material and Methods

2.1 - Chemicals and reagents

(+/-)-Citronellol was purchased from Aldrich Chemical Company and *cis*- and *trans*-rose oxides were from Fluka. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.2 - Microorganisms and cultivation

The *Penicillium* sp strain was isolated from a very ripe mango from Northeastern Brazil. The cultures were cultivated and conserved by periodic replications (once a week) on yeast-malt agar (0.5% YM: bacteriological peptone, 1.0% glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract and 2.0% agar, pH 6.0).

2.3 - Cassava medium (CM) preparation

Cassava effluent obtained from the manufacture of cassava flour (the residue was donated by a cassava flour factory located in the State of São Paulo, Brazil) was collected and stored at -18°C until needed. The medium was prepared by heating the waste to boiling to remove solids. After cooling, the substrate was centrifuged at 10,000 rpm (15,500 G) at 5°C for 20 min. The supernatant was sterilized in an autoclave at 121°C for 20 min. The resulting pH of the medium was 6.0 and was not adjusted.

2.4 - Determination of the cassava medium composition

2.4.1 - Determination of the total carbohydrates

Total carbohydrates were determined by a colorimetric method based on the phenol reaction with glucose, as described by Daniels, Hanson and Phyllips (1994).

2.4.2 - Determination of the reducing sugar contents in the cassava medium

Total reducing sugars were quantified according to Somogy (1944) and Nelson (1945) using glucose as the standard.

2.4.3 - Determination of the nitrogen content

The protein content was calculated from the nitrogen content as determined by the Kjeldahl procedure, using 6.25 as the conversion factor (AOAC 1995).

2.4.4 - Determination of the mineral content

Cassava medium (1 mL) was incinerated for 3 h at 500°C, after which 5.0 mL of 6 M HCl was added and evaporated to dryness. The residue was transferred to a 50 mL volumetric flask, water was added to volume, shaken and filtered. The minerals were determined using an atomic emission spectrophotometer (Jobin Yvon, model JY 50P). The spectral lines for each element were (in nm): P, 178; K, 766, Ca, 317; Mg, 279; Mn, 257; Fe, 259; Cu, 324; Zn, 213; and S, 180.

2.5 - Mineral medium (MM)

The composition was 0.5 g of Mg SO₄, 3.0 g of NaNO₃, 1.0 g of K₂HPO₄, 0.5 g KCl and 0.01 g of Fe₂SO₄ in 1.0 L of distilled water (Brunerie, Benda, Bock, & Schreier 1987). The medium was sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min. The pH was 7.0 and was not adjusted.

2.6 - Biotransformation experiments

The strain was cultivated in 250 mL conical flasks containing 50 mL of liquid medium. Three ways of biotransformation was investigated under 3 conditions (all in duplicate). In the first experiment, using CM, 50 mL of culture medium were inoculated with 2.5 mL of a spore suspension ($1-7 \times 10^7$ spore mL⁻¹) in water. Cultivation was done in a rotary shaker at 160 rpm and 30 °C. After three days, the biotransformation process was started by adding 50 µL of citronellol (under sterile conditions). In the second experiment, MM was used, but the procedure was the same as in the first experiment. In the third experiment, culture growth was started in CM and continued for three days. The culture was then filtered through Whatman filter paper (sterilized in an autoclave at 121°C for 20 min) under sterile conditions. The cell mass was rinsed three times with distilled, sterilized (121 °C for 20 min) water and transferred into another flask containing 50 mL of MM. Biotransformation was initiated by adding 50 µL of citronellol (under sterile conditions). In all of the experiments, biotransformation was started three days after the inoculation by adding 50 µL of citronellol directly into the culture flasks. Two subsequent additions of 50 µL were made every 24 h. The experiments were

done for another three days after the last addition. Chemical blanks with the pH adjusted to 3.0, 4.0 and 5.0 using HCl prior to autoclaving were performed for each of the biotransformation experiments, but without mycelium, to ensure the absence of chemical transformation reactions. At 24, 48, 72, 96 and 120 h after the addition of citronellol, 5 mL samples were obtained and extracted with 5 mL Et₂O. The samples were analyzed immediately by GC/FID (decane was the internal standard).

2.7 - Induction experiments

The same strain was cultivated in 50 mL conical flasks with 20 mL of CM and inoculated with 1 mL of spore suspension ($1-7 \times 10^7$) in water, with cultivation being done as described above. After two days, 10 μ L of citronellol was added to the flask. Two more additions were made after two and three days. After five days, the culture was transferred to an agar plate (YM medium). After four days of growth on the agar plate, this culture was used for the biotransformation of citronellol as described above (using the composition labeled as CM+MM).

2.8 - Analysis of the samples by GC

GC-analyses for the biotransformation products were done using a Chrompack CP 9001 chromatograph equipped with an split/splitless-injector, an FID-detector, a WCOT fused silica column and a stationary phase of CP-Sil CB (60 m length x 0.25 mm i.d.; coating thickness 0.25 mm). The working conditions were: injector

220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 40° to 210° at 5°C/min with an initial holding time of 1 min and a final holding time of 5 min, split 1/10.

Chiral GC-analyses were done using the same GC equipped with a Beta Dex 120 chiral column (60 m x 0.25 mm i.d. coating thickness 0.25 µm). The working conditions were: injector 220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 110°C to 170°C at 1°C/min with an initial holding time of 10 min and a final holding time of 5 min.

GC-MS-analyses for the determination of the biotransformation products were done with a Shimadzu GC/MS Class 5000 system with helium as the carrier gas and fused silica capillary columns of SUPELCO SIMPLICITY 1™ (30 m×0.25 mm×0.25 µm). The working conditions were: injector at 260°C, an oven temperature programmed from 50°C (1 min of initial holding time) to 150°C (1 min of holding time) at 4°C/min and from 150°C to 280°C (2 min) at 30°C/min, with a final holding time of 2 min, scan range of m/z 40-500, carrier gas (He) 1.7 mL/min; split 1/50 and ionization EI 70 eV.

3 - Results and Discussion

3.1 - Manipueira as a bioconversion medium

Manipueira is a residue resulting from the pressing of cassava roots during the process of cassava flour manufacturing and is generated at the rate of 250 liters per ton of cassava (Damasceno, Cereda & Pastore 1999). The major nutrients present in cassava waste are sugars (sucrose, glucose, fructose and

maltose), nitrogen and mineral salts. Its richness in C-source turns manipueira into a suitable medium for the cultivation of microorganisms, contributing to make this a feasible industrial biotechnological process, since the raw material represents 30% of the total costs (Cameotra & Makkar 1998).

Cassava medium (CM) has a high content of C, N-sources and minerals, that are responsible for mycelial development. This medium also contains high levels of substances, such as cyanide, that could limit growth or inhibit biotransformation. Cassava water was tested as a medium for the bioconversion of citronellol by a Brazilian *Penicillium* sp strain. Table 1 presents the composition of the cassava medium used in this study. Cassava medium was a suitable medium for cell mass production, as shown by the rate of cell mass development. After three days of contact with CM, the *Penicillium* strain cell mass reached 25 g/L in CM. This finding indicates the possibility of cheaper and advantageous biotechnological process since, in this case, a valuable flavor compound can be produced.

Table 1. Physicochemical composition of manipueira (cassava wastewater)

Components	Concentration	
Total carbohydrates	39.50	g/L
Non-reducing sugars	20.12	g/L
Reducing sugars	19.38	g/L
Total nitrogen	1.72	g/L
Phosphorous	368.8	mg/L
Potassium	3641.0	mg/L
Calcium	236.0	mg/L
Magnesium	438.1	mg/L
Sulfur	61.35	mg/L
Iron	2.72	mg/L
Zinc	3.01	mg/L
Manganese	3.46	mg/L
Copper	1.11	mg/L
pH	6.0	

3.2 - Chemical stability of citronellol in submerged liquid broths

Blank experiments with citronellol in the same medium were done to check the chemical stability of the terpenoid in submerged liquid broths. The flasks were filled with mineral and cassava water media. The pH of each was adjusted to 3.0, 4.0 and 5.0 and shaken. After seven days of shaking, no chemical oxidation or auto-oxidation was detectable in the culture broths. This finding agrees with Demyttenaere, Vanoverschelde & De Kimpe (2004) who reported the chemical stability of citronellol in submerged liquid broths with an YMPG medium (pH adjusted to 5.0 and 3.5) in a rotary shaker for one week. However, these authors proposed an acid-catalyzed chemical reaction for citronellol in YMPG solid media, and found that citronellol was converted to *cis/trans*-rose oxide, nerol oxide, linalol and α -terpineol in solid media (pH 3.5) after three days of contact. The commercial

production of rose oxides started with the photooxygenation of citronellol (Demyttenaere, Vanoversheld & De Kimpe 2004).

3.3 - Comparison of the strains and media

Lipophilic compounds, such as terpenoids, are preferentially dissolved in the lipophilic membrane systems of fungal cells (Abraham, Onken & Berger 1997). Terpenoids and other lipophilic compounds induce changes in the membrane properties that cause toxic effects, which explains the low yields related to the biotransformation of terpenoids (Onken & Berger 1999).

The biotransformation experiments were done in media with three different compositions (CM, MM and CM+MM; see Material and Methods).

The MM medium had no C sources and, consequently there was no cell mass development occurred and no transformation compounds could be detected, implying there was no spore activity with respect to the biotransformation of citronellol by the strains examined here. The final pH of the mineral medium after biotransformation was 6.0.

Inhibition of fungal growth by the addition of citronellol was evident. When terpene was added, the cell mass remained constant (about 25 g/L), while in the control cultures without citronellol, the strain continued to grow after three days, reaching a value of 40 g/L.

The biotransformation of citronellol in cassava medium generated very low concentrations of the expected compounds and reached approximately 10 mg of

trans-rose oxide/L after four days of biotransformation. The final pH of the cassava water medium was around 3.5.

For the strain tested, rose oxide concentrations were much higher when the mycelium developed in CM was transferred to MM and bioconversion occurred with citronellol as the sole C- and energy sources (final pH around 5.0). The concentrations of the products recovered are shown in Table 2.

Table 2. Products recovered from cassava liquid culture broths (three days after the last citronellol addition) (concentrations in mg/L)

Medium	<i>cis</i> -Rose oxide (I)	<i>trans</i> -Rose oxide (II)	1-Octen (III)	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (IV)	Citronellol (V)	6-Methyl-5-hepten-2-ol (VI)	Yield (mg/L/h) ^a
CM	30.6	11.9	t.a.	5.3	275.5	t.a.	0.33
CM+MM	73.4	31.5	n.d.	4.9	292.5	t.a.	0.76

t.a.= trace amounts (< 1mg/L)

n.d.= not detected

^a The yield is the sum of biotransformation products concentrations/144h

Sporulated surface cultures of *Penicillium* sp. were able to convert citronellol into *cis*- and *trans*-rose oxides. Other biotransformation products were 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol and 6-methyl-5-hepten-2-ol. The presence of 1-octen was also detected, but this is not an usual biotransformation product of citronellol. No chemical oxidation or auto-oxidation products were detected in the liquid control broths. When the medium was composed by cassava water, the production of rose oxide reached about 40 mg/L whilst the other minor products only reached trace amounts. However, when the mycelium was developed in CM and than transferred into MM (citronellol as the sole C-source), the concentrations of rose oxide increased, reaching more than 70 and 30 mg/L for the *cis*- and *trans*-isomers,

compounds (Onken & Berger 1999). Figure 2 illustrates the conversion of citronellol into rose oxide.

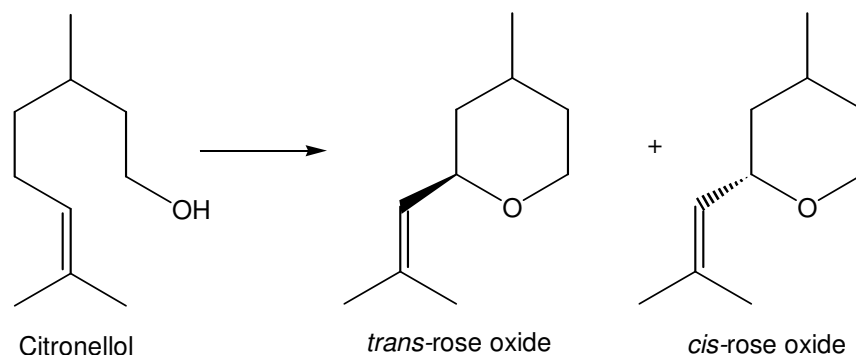


Fig. 2 - Conversion of citronellol in *cis*- and *trans*-rose oxides by *Penicillium* sp in cassava medium.

3.4 - Induction experiments

A parameter expressing the toxicity of solvents for microorganisms is the log P_{OW} (logarithm of the partition coefficient of the substance in an n-octanol/water system). The strongest toxicities were observed for solvents with a log P_{OW} between 1 and 5 (Onken & Berger 1999). Compounds such as citronellol [log P_{OW} = 3,5 (Griffin, Wyllie, Markham 1999)] are toxic for microorganisms.

In the present study, the resistance of the *Penicillium* sp strain in the presence of the monoterpene citronellol was checked. The cells were placed in contact with citronellol for eight days to deplete the C and N sources and force the strain to metabolize citronellol. The culture was transferred to an agar plate after five days. After four days on the plate, the appearance of the culture was significantly different from that of the wild one, although it still looked like a

Penicillium strain. The possibility of contamination cannot be considered since all of the procedures were done under sterile conditions and the 'induced strain' still looked like a *Penicillium* strain. This type of morphological modification has already been reported. van Dyk, van Rensburg & Moleleki (1998) reported that a *Hormonema* sp. yeast strain biotransformed the inexpensive limonene with a non-reproducible conversion to *trans*-iso-piperitenol. This non-reproducible process was explained on the basis of morphological modifications of the strains during biotransformation.

In the present study, morphological modifications were not detected during biotransformation, but the appearances of the 'wild' and 'induced' strains were different. Biotransformation using the 'induced strain' was tested in the same way as for the 'wild strain'. Unfortunately, the production of rose oxides by the 'induced strain' was not significantly higher than the 'wild' strain, with an increase of less than 10% being observed in the production of rose-oxides.

4 - Conclusions

In this study, rapid growth of the fungi tested was observed in the presence of cassava medium. The biotransformation of citronellol resulted in the production of *cis*- and *trans*- rose oxides as the main products. The production of rose oxides was much higher when citronellol was the sole C-source as compared to experiments in a transformation medium where other C and N-sources were present (bioconversion in the presence of cassava medium). Induction resulted in only a very slight increase in the concentration of the targeted products. There was a clear modification in the appearance of the 'induced strain'.

Acknowledgements

This project was funded by CNPq, Brazil (process number 141601/2004-3).

References

Abraham B., Onken, J. G. & Berger, R.G. (1997) Strategies toward an efficient biotechnology of aromas. In: Proceedings of the 5th Wartburg Aroma Symposium, Eisenach, Eigenverlag Universität Potsdam, p. 357-373.

AOAC (1995) Official Method of Analysis - The Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. Virginia.

Babu, K.G.D., Singh, B., Joshi, V.P. & Singh, V (2002) Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena Mill.*) distilled under different pressures and temperatures. *Flavor and Fragrance Journal*, 7, 136-140.

Berger, R. G. (1995) Aroma biotechnology. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.

Boersma, Y.L., Scheltinga, P.C., Dröge, M.J., Bos R. & Quax, W.J (2005) A validated gas chromatographic method for the evaluation of enzymatic enantioselectivity in kinetic resolution applications. *Journal of Separations Science*, 28, 501-505.

Brunerie, P., Benda, I., Bock, G. & Schreier, P. (1987) Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 6-10.

Cameotra, S.S. & Makkar, R.S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.

Damasceno, S., Cereda, M. P. & Pastore, G.M. (1999) Desenvolvimento de *Geotrichum fragrans* em manipueira. *Energia na Agricultura*, 14, 7-14.

Daniels, L., Hanson, R. & Phyllips, J.A. Chemical analysis. In: Gerhardt, P.; Murray, RGE.; Wood, W.A.; Krieg, N.R (Ed.) Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC., p. 518-519, 1994.

Demyttenaere, J. C. R., Vanoverschelde, J. & De Kimpe, N. (2004) Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography: A*, 1027, 137-146.

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen J. B. & Witholt, B. (2003) Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 269-27.

Gravel, D. & Bordeleau, J. (1998) Photochemical Rearrangement of 2-Phenylthio-1,3-cyclohexanediols to Deoxysugars. Application to a Stereospecific Synthesis of (+)-cis-Rose Oxide. *Tetrahedron Letters*, 39, 8035-8038.

Griffin, S., Wyllie, S. G. & Markham, J. (1999) Determination of octanol–water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography: A*, 864, 221-228.

Kaminska, J., Markowicz, L., Stolowska, J. & Góra, J. (1989) Biotransformation of citronellol by means of horseradish peroxidase. *Enzyme Microbiology and Technology*, 11, 436-438.

Kumar, K. V., Umar, M., Singh, A.P., Brij, L., Raj, N.H. & Virendra, S. (2003) Patent number: WO03080777, Publication date: 2003-10-02, Application number: WO2002IB01205 20020325.

Kuiate, J.R., Bessièrè, J.M. & Zollo, P.H.A. (2002) Composition of the essential oils from three *Laggera* Spp from Cameroon. *Flavor and Fragrance Journal*, 17, 105-108.

Leonel, M. & Cereda, M. P. (1995) Citric acid production by *Aspergillus niger* from "Manipueira", a manioc liquid residue. *Scientia Agricola*, 52, 299-304.

Nelson, N (1945) A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, 153, 375–380.

Nitschke, M. & Pastore, G.M. (2003) Cassava Flour Wastewater as a Substrate for Biosurfactant Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 106, 295-302.

Onken, J. & Berger, R.G. (1999) Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51, 158-163.

Schrader, J. & Berger, R. G. (2001) Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (2nd Ed), *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VHC. p. 373-422

Serra, S., Fuganti, C. & Brenna, E. (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 23, 193-198.

Somogy, M.A. (1944) A new reagent for determination of sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 160, 61–68.

Tan, Q., & Day, D. F. (1998) Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 96–101.

Taneja, S.C., Sethi, V.K., Andotra, S.S., Koul, S. & Qazi, G.N. (2005) Rose oxides: a facile Chemo and Chemo-enzymatic Approach. *Synthetic Communications*, 35, 2297-2303.

van Dyk, M.S., van Rensburg, E. & Moleleki, N. (1998) Hydroxylation of (+)-limonene, (+)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp., *Biotechnology Letters*, 20, 431-436.

Capítulo 4 – Biotransformação de α - e β -pinenos

Fungal Biotransformation of Monoterpenes found in Agro-Industrial Residues from Orange and Pulp Industries into Aroma Compounds: Screening using Solid Phase Microextraction

Mário Roberto Maróstica Junior*, Natasha Onoyama, Nathalie Baudet & Gláucia Maria Pastore

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

*Corresponding author (Fax: +55-19-3788-3887; E-mail: mario@fea.unicamp.br)

Abstract

The biotransformation of monoterpenic agro-industrial wastes (turpentine oil and orange essential oil) was studied. More than 40 fungal strains were isolated from Brazilian tropical fruits, soil samples and eucalyptus trees, and screened for biotransformation of the waste substrates. Solid phase microextraction was used to evaluate the volatiles in the headspaces of sporulated surface cultures. The selected strains were submitted to submerged liquid culture. The biotransformation of R-(+)-limonene and α -, β - pinenes resulted in α -terpineol and perillyl alcohol, and verbenol and verbenone, respectively, as the main products.

Key words: biotransformation, industrial residues, monoterpenes, SPME

1. Introduction

Essential oils are dominated by monoterpene hydrocarbons, which are regarded as process waste, mainly because of their low sensory activity, low water solubility and tendency to autoxidize and polymerize (Berger, Krings & Zorn 2002) which turns terpene hydrocarbons, such as limonenes, pinenes and terpinenes, into suitable starting materials for microbial transformations. Furthermore, limonene, α -pinene and β -pinene are ideal starting compounds for bioconversions because of their cheap, widespread availability (Adams, Demyttenaere & De Kimpe 2003).

There is currently a trend towards efficient use and value addition of agro-industrial residues. The application of agro-industrial residues in bioprocesses provides alternative substrates, helps to solve pollution problems (Pandey, Soccol, Nigam, Brand, Mohan & Roussos 2000) and is economically advantageous.

Pinenes (α - and β -) are major components of turpentine, a by-product of the pulp making industry. Of the turpentine produced in the United States, about 90% is mostly derived from the pulp and paper industry (Yoo & Day 2002). Limonene is present in orange essential oil, a by-product from the orange juice industry, and reaches concentrations of 90-96%.

Microorganisms are suitable biocatalysts for the biotransformation of terpenoids, with the use of whole cells being preferable. In some cases, enzymes are more stable inside the cells, and the addition of co-factors is not needed since these are present in the cells (Chatterjee & Bhattacharyya 2001).

A great advantage of biotransformation as compared to chemical synthesis is that compounds originated via biotransformation or bioconversion are considered as

“natural” compounds according to European and USA legislations (Serra, Fuganti & Brenna 2005). Flavor compounds obtained through such processes can therefore be used to meet the increasing consumer demand for natural products (Carvalho & Fonseca 2002).

Solid phase microextraction (SPME) is a simple and effective adsorption and desorption technique, that eliminates the need for solvents or complicated apparatuses, can be used for concentrating volatile or non volatiles compounds in liquid samples or head spaces, and is compatible with gas chromatography (Alpendurada 2000).

In this work, we used SPME to screen of fungal strains for the biotransformation of monoterpenes present in residues from their orange citrus and paper industries. The monoterpenes from the waste oils were biotransformed into aroma compounds used in the food and flavor industries.

2. Material and Methods

2.1. Agro-industrial residues

The orange essential oil and turpentine oil were obtained, respectively, from an orange juice industry and from a pulp factory, both located in the State of São Paulo, Brazil. The turpentine oil was analyzed by GC-MS and the main compounds (> 0.1% w/w) are shown in table 1. The composition of the orange essential oil has been presented in a previous paper (Marostica Junior & Pastore 2006).

2.2. Chemicals

R-(+)-limonene (~99%), α -pinene (~98%) and (1*S*)-(-)- β -pinene (~97%), *S*-*cis*-verbenol (~95%), (1*S*)-(-)-verbenone (~94%) and *R*-(+)- α -terpineol (~99%*ee*), were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company. All of the chemicals and solvents were of the best available commercial grade.

2.3. Microorganisms and cultivation

The filamentous fungal strains used in this study belonged to the genera *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Mucor* sp and *Chrysosporium* sp. The fungi were isolated from soil samples, from eucalyptus trees and from spoiled Brazilian fruit.

2.4. Optimization of SPME analysis

SPME vials (20 mL) were filled with 5 mL of YM agar medium (YM: bacteriological peptone 0.5% (w/v), glucose 1.0% (w/v), malt extract 0.3% (w/v), yeast extract 0.3% (w/v) and agar 2.0% (w/v), pH 6.0) and autoclaved. Ethanolic solutions (10 μ l) of the orange and turpentine oils containing the expected biotransformation products (α -terpineol, perillyl alcohol and verbenol, verbenone, α -terpineol, respectively) were sprayed over the agar surface and the vials covered with silicone septa. The concentrations of the oils in the ethanolic solutions and the theoretical biotransformation products were 20% (v/v) and 0.1% (v/v) each. The SPME fiber used was CAR/PDMS (SUPELCO). The adsorption parameters used for optimization were temperature (20, 30 and 40 °C) and time (10, 20 and 30 min). Desorption occurred in a gas chromatograph at 250°C for 2 min.

2.5. SPME biotransformation experiments

For the SPME biotransformation experiments, 20 mL SPME vials were filled with 5 mL YM agar medium, plugged with cotton wool, autoclaved and inoculated with fresh spores. The vials were incubated at 30 °C for 6-7 days until complete sporulation, after which 10 µL of each essential oil in ethanol (20 % v/v) was sprayed onto the agar medium and the vials covered with silicone septa (Demyttenaere, Van Belleghem & De Kimpe 2001). The SPME fibers were then exposed to the headspace after 24, 48 and 72 h. The exposure temperature/time was determined by optimizing the SPME analysis for each substrate. The fiber was desorbed in the same way as described above.

2.6. Liquid culture biotransformation experiments

The strains selected using SPME were cultivated [2.5 mL of an aqueous spore suspension ($1-7 \times 10^7$ spore mL⁻¹)] in 250 mL conical flasks containing 50 mL of YM liquid medium (same composition as YM agar medium, but without the agar) and incubated in a rotary shaker at 160 rpm and 30 °C (all in triplicate). After three days of growth, biotransformation was initiated by adding 50 µL of the same oils (α -pinene, β -pinene or limonene) in an alcoholic solution (under sterile conditions). Two subsequent additions of 50 µL every 24 h were made. The total incubation time was six days. Every 24 h, 5 mL samples were taken and extracted with Et₂O. The samples were analyzed directly by GC/FID (decane was the internal standard). Chemical blanks at pH 3.0, 4.0 and 5.0 (pH adjusted with HCl prior to autoclaving) were done, without mycelium, to ensure the absence of chemical transformation reactions.

2.7. Analysis of the samples by GC and GC-MS

GC-analyses were done with a Chrompack CP9001 gas chromatograph equipped with a split/splitless-injector, an FID-detector and a WCOT Fused Silica column. The stationary phase was CP-Sil CB (60 m length x 0.25 mm i.d.; coating thickness of 0.25 μm). The working conditions were: injector 220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 40°C to 210°C at 5°C/min with an initial holding time of 2 min and a final holding time of 5 min. Quantification was done by comparison with the internal standard decane.

GC-MS-analyses were done using a Varian Saturn gas chromatograph equipped with an EM-IT mass selective detector, a CP-Sil 8CB Low bleed/MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and a split/splitless CP1177 injector. The working conditions were: injector 280°C, transfer line to MSD 260°C. The oven temperature was programmed from 40°C (1 min) to 160°C (3 min) at 5°C/min and from 160°C to 250°C, with a final holding time of 5 min, scan range m/z 40-500, carrier gas (He) 1 mL/min, split 1/50, ionization EI 70 eV and scan rate, 1 s⁻¹. Positive identifications were made by matching the sample retention indices (RI) and mass spectra of the samples with those of the standards, analyzed under identical conditions.

3. Results and discussion

3.1. Turpentine oil

The turpentine oil used in this study was analyzed by GC-MS. The major compounds identified and their percentages are shown in table 1. The composition

of the orange essential oil used in this work has been reported in a previous paper (Marostica Junior & Pastore 2006).

Table 1. Composition of the turpentine oil as determined by GC-MS

Compound	Turpentine oil (%)
α -pinene	71.0
β -pinene	16.0
Camphene	4.0
Terpinene	1.4
Limonene	1.1
Myrcene	0.5
Unknown	0.7
Carvone	0.1

In several regions of the world, different parts of the turpentine tree are exploited for various purposes. Little is known about the composition of the essential oil of some turpentine trees. Some investigations have characterized certain turpentine species. The major components of the essential oil of Chios turpentine resin are α -pinene, β -pinene, sabinene and terpinen-4-ol (Papageorgiou, Assimopoulou & Yannovits-Argiriadis 1999). Similarly, the most prominent components in the oils from different parts of *Pistacia terebinthus* are α -pinene, β -pinene, limonene and germacrene D (Couladis, Özcan, Tzakou & Akgül 2002). The major compounds in the turpentine oil used in this work were α -pinene and β -pinene. This finding is certainly in accordance to the literature data.

The presence of carvone in orange essential oil was detected in the biotransformation analyses. Carvone was recovered mainly in the chemical blanks of liquid cultures (medium with orange essential oil, but without the culture), but was not identified as a biotransformation product by the strains used in this work. The chromatographic profiles obtained from the biotransformation experiments were compared to those from the diluted orange essential oil (to confirm that α -terpineol and perillyl alcohol were really biotransformation products and did not come from the oil) and to those from the chemical blanks (to ensure that the compounds were not chemically transformed).

3.2. Optimization of SPME analysis

In the present work, we used a CAR/PDMS SPME fiber was used. The influence of different temperatures and exposure times in the recovery of terpenes by an ethanolic solution sprayed into the SPME vials were considered. For the turpentine oil - verbenone - verbenol system, the chosen temperature/time was 20 °C/20 min, while for the orange essential oil-perillyl alcohol- α -terpineol system the temperature was 40 °C/20 min. For the turpentine oil system, all of the conditions tested yielded satisfactory compound recovery and so the milder/faster condition was preferred. For the orange oil system, 40°C gave more suitable results, based on the recovery of the oxygenated compounds. Chemical oxidations of the monoterpenes were not detected in the SPME conditions analyzed.

3.3. Screening experiments using surface cultures and headspace analysis by SPME

More than 40 fungal strains were tested for their capacity to transform the terpenes contained in the waste oils. The recovery of volatiles from the headspace was done by SPME. The strains *Mucor* sp. 2276, *Penicillium* sp. 2319 and *Mucor* sp. 2288 bioconverted the terpenes from the turpentine oil mainly into verbenol, while *Penicillium* sp. 2327 and *Penicillium* sp. 2360 produced verbenone after one day of contact with an alcoholic solution of turpentine oil sprayed onto the sporulated surface cultures. Previous investigations also reported that the α -pinene underwent two distinct biochemical reactions (hydroxylation and dehydrogenation) to produce verbenol and verbenone, respectively. These compounds have previously been described as the major biotransformation products of α -pinene formed by fungi (Agrawal & Joseph 2000, van Dyk, van Rensburg & Moleleki 1998). Fig. 1 shows the structures of the compounds reported in this investigation.

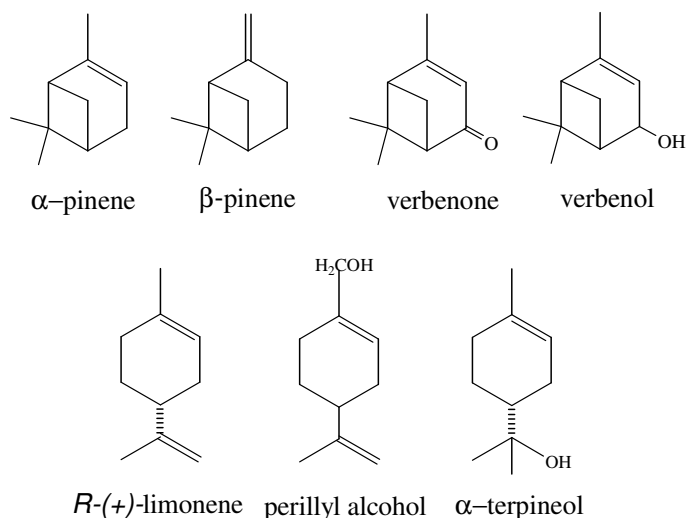


Fig. 1 - Structures of α -, β -pinenes, verbenol, verbenone, limonene, α -terpineol and perillyl alcohol, precursors and products of the biotransformation compounds identified by GC-MS.

Similarly, the strains *Mucor* sp. 2276, *Aspergillus* sp. 2357, *Penicillium* sp. 2319, *Penicillium* sp. 2327 biotransformed the *R*-(+)-limonene present in the orange essential oil into α -terpineol, and the strain *Penicillium* sp. 2360 transformed this substrate into the valuable monoterpene perillyl alcohol (see Fig. 1). These results are agree with those in the literature. The production of oxygenated compounds originating from the transformation of inexpensive limonene has been described: carvone, carveol, α -terpineol and perillyl alcohol are some of the most commercially important biotransformation products derived from limonene (Duetz, Bouwmeester, van Beilen & Witholt 2003).

3.4. Liquid culture biotransformation

The strains selected in the SPME experiments were studied in submerged liquid cultures. After three days of growth in YM medium, the strains were placed in contact with the terpenic solutions. The same compounds found in the SPME analyses were recovered by solvent extraction from the liquid cultures. SPME is a fast and simple technique, but cannot be used for quantification. On the other hand, solvent extraction is more reliable for quantification. Tables 2 and 3 show the concentrations of the biotransformation products in the liquid mediums 24, 48 and 72 h after the first additions of turpentine and orange oils respectively. No oxidation products were recovered from the chemical blanks, indicating that the compounds recovered originated from the biotransformation. Of the bioconversion products obtained from limonene, perillyl alcohol is important since it can protect against hepatic, mammary and pulmonary carcinogenesis (Chatterjee & Bhattacharyya 2001). In general, however, oxygenated monoterpenes are mainly used as food flavorizers.

Penicillium sp 2360 produced the highest concentrations of verbenone, an important impacting flavor compound in industry. Verbenone is a well described biotransformation product of α -pinene.

Table 2. Concentration of biotransformation products in liquid medium 24, 48 and 72 h after the first addition of turpentine oil (concentrations are expressed in mg/L and are the mean of triplicate experiments).

Strain	Verbenol			Verbenone			α -Terpineol		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Mucor</i> sp. 2276	37.1	46.0	51.3	n.d. ^a	n.d.	n.d.	tr ^b	tr	tr
<i>Penicillium</i> sp. 2319	25.4	11.4	17.0	3.7	6.7	11.0	5.1	7.4	12.9
<i>Mucor</i> sp. 2288	28.8	17.5	6.1	tr	tr	tr	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Penicillium</i> sp. 2327	tr	tr	tr	35.3	41.9	45.7	7.4	5.1	6.9
<i>Penicillium</i> sp. 2360	tr	tr	tr	41.5	77.4	72.2	tr	tr	tr

^a n.d. – not detected

^btr - trace amounts (< 1.0 mg/L)

Aspergillus sp 2357 produced the highest amounts of α -terpineol, while *Penicillium* sp 2360 was the only strain capable of transforming limonene in perillyl alcohol. Besides the small yields, this data should be carefully considered, since perillyl alcohol has chemopreventive properties against several types of cancer.

Table 3. Concentration of biotransformation products in liquid medium 24, 48 and 72 hours after the first addition of orange essential oil (concentrations are expressed in mg/L and are the mean of triplicate experiments).

Strain	Perillyl alcohol			α -Terpineol		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Mucor</i> sp. 2276	n.d. ^a	n.d.	n.d.	8.6	5.2	9.0
<i>Penicillium</i> sp. 2319	n.d.	n.d.	n.d.	50.3	63.7	70.2
<i>Penicillium</i> sp. 2327	tr ^b	tr	tr	37.4	31.5	45.1
<i>Penicillium</i> sp. 2360	12.3	8.5	9.7	tr	tr	tr
<i>Aspergillus</i> sp. 2357	n.d.	n.d.	n.d.	42.6	83.1	88.4

^a n.d. – not detected

^btr - trace amounts (< 1.0 mg/L)

Application of the monoterpenic oils in ethanolic solution was used to decrease the toxicity and increase the solubility of the substrate in the medium. A parameter used to express the toxicity of a solvent for microorganisms is the log P_{OW} (logarithm of the partition coefficient of the substance in an *n*-octanol/water system). The greatest toxicities are observed for compounds with a log P_{OW} between 1 and 5 (Onken & Berger 1999). Limonene (log P_{OW} = 4.8), α -pinene (log P_{OW} = 4.9) and β -pinene (log P_{OW} = 4.8) are toxic for microorganisms (van Keulen, Correia & Fonseca 1998). Ethanol (log P_{OW} = -0.32) was a suitable solvent for the biotransformation of limonene by *Penicillium digitatum* strains (Adams, Demyttenaere, & De Kimpe 2003). Removing the terpenoids from contact with the

aqueous phase is expected to improve the stability of these compounds while preventing their toxicity towards the biocatalyst (van Keulen, Correia & Fonseca 1998).

Limonene, α -pinene and β -pinene were not detectable at the end of the experiments (perhaps because of their high volatility at the temperature used for the experiment). The addition of increased volumes of the substrate should be carefully considered. In a recent study, Agrawal and Joseph (2000) reported the influence of the α -pinene concentration on the yields of verbenone produced by a strain of *A. niger*. The authors concluded that the optimum concentration was 20 mg of α -pinene in 100 mL of medium. A concentration of 40 mg/100 mL was inhibitory, confirming the toxicity caused by terpenes to microorganisms.

The low final concentrations of the biotransformation products are a great drawback to a direct application of this process on an industrial scale, and obtaining higher final yields of flavor compounds from biotransformation is a challenge. In a recent investigation, Agrawal, Deepika & Joseph (1999) reported improved production of verbenol/verbenone from α -pinene by *Aspergillus* sp and *Penicillium* sp strains. These authors used UV radiation, ethyl methanesulphonate and colchicine to mutate the strains, and for some of the mutant strains, substantial increases in the ability to biotransform α -pinene into verbenol were found, but the production of verbenone decreased. In plants, further modification of monoterpenes involves P-450 cytochromes and redox transformations. The oxygenated compounds are the result of allylic oxidations. One example is the use of *P. abies* suspensions cultures to transform α -pinene, β -pinene and limonene

into *trans*-verbenol, *trans*-pinocarveol or carveol and perillyl alcohol, respectively (Lindmark-Henriksson, Isaksson, Vanek, Valterová, Högberg & Sjödin 2004). Some authors have proposed that the cloning and expression of P-450 cytochrome in suitable organisms for use in fermentation processes is one of the most promising solutions for terpene biotransformation (Duetz, Bouwmeester, van Beilen & Witholt 2003; Haudenschild, Schalk, Karp & Croteau 2000).

In this work, we tried to deal with inexpensive industrial wastes as monoterpenes sources. Small amounts of oil were added because of the well known inhibition caused by monoterpenes in microorganisms. The yields were very low to a direct industrial application. However, some interesting compounds were produced, such as verbenol, verbenone and α -terpineol, which are potent flavor compounds used in industry. Next investigations should focus on the reduction of costs of the process (perhaps by using industrial wastes as culture medium) and focus on the strain improvement (by using several techniques) to obtain higher yields than the ones obtained so far.

4. Conclusions

Screening experiments by SPME resulted in the selection of six strains capable of biotransforming monoterpenes. SPME was a fast, simple technique for screening fungal strains for their ability to biotransform monoterpenes from two agro-residues. The production of verbenol and verbenone as the main biotransformation products from turpentine oil was monitored by SPME and confirmed by liquid culture transformations (solvent extraction). In addition, the production of

α -terpineol and perillyl alcohol from limonene was detected. However, the yields obtained were not great enough for direct industrial application. Substrate and biotransformation product inhibition is a major obstacle in the biotransformation of α -, β -pinenes and limonene.

The use of industrial wastes as inexpensive substrates for biotransformation of terpenes on an industrial scale can make the process economically advantageous.

Acknowledgements

This project was funded by CNPq, Brazil (process Number 141601/2004-3).

References

- Adams, A., Demyttenaere, J.C.R. & De Kimpe N (2003) Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. *Food Chemistry* 80, 525–534.
- Agrawal, R., Deepika, N.U.A. & Joseph, R. (1999) Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of α -pinene to verbenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 249-252.
- Agrawal, R. & Joseph, R. (2000) Bioconversion of α -pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 335-337.
- Alpendurada, M.F. (2000) Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography: A*, 889, 3-14.
- Berger, R.G., Krings, U., Zorn, H. (2002) Biotechnological flavour generation. In: Taylor JA (ed) Food flavour technology, Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 60-104.
- Carvalho, C.C.C.R. & Fonseca, M.M.R. (2002) Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 389-398
- Chatterjee, T. & Bhattacharyya, D.K. (2001) Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 541-546.

Couladis, M., Özcan, M., Tzakou, O. & Akgül, A. (2002) Comparative essential oil composition of various parts of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L) growing wild in Turkey. *Journal of Science and Food Agriculture*, 83,136–138.

Demyttenaere, J.C.R., Van Belleghem, K. & De Kimpe N (2001) Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, 57,199-208.

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen, J.B. & Witholt B (2003) Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 269-277.

Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F. & Croteau R (2000) Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379, 127-136.

Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Vanek, T., Valterová, I., Högberg, H.E. & Sjödin, K. (2004) Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *Journal of Biotechnology*, 107, 173-184.

Marostica Junior, M.R., Pastore, G.M. (2006) Production of *R*-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*. In press.

Onken, J., Berger, R.G. (1999) Effects of *R*-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69, 163-168.

- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. & Roussos S (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. *Biochemistry Engineering Journal*, 6, 153-162.
- Papageorgiou, V., Assimopoulou, A.N. & Yannovits-Argiriadis, N. (1999) Chemical composition of the essential oil of Chios turpentine. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 367–368.
- Serra, S., Fuganti, C. & Brenna E (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 2, 193-198.
- van Dyk, M.S., van Rensburg, E. & Moleleki, N. (1998) Hydroxylation of (+)limonene, (-)- α -pinene and β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters*, 20, 431-436.
- van Keulen, F., Correia, C.N. & Fonseca, M.M.R. (1998) Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, 5, 295-299.
- Yoo, S.K. & Day, D.F. (2002) Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry*, 37, 739-745.

Capítulo 5 – Biotransformação de α -farneseno

Biotransformation of α -Farnesene by *Aspergillus niger*

Mario Roberto Marostica Junior^a, Björn Hardebusch^b, Holger Zorn^b, Ulrich Krings^b, Glaucia Maria Pastore^a, Ralf G. Berger^b

^a Laboratório de Bioaromas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

^b Zentrum Angewandte Chemie, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hannover, Wunstorfer Straße 14, D-30453 Hannover, Germany

Abstract

The biotransformation of farnesene by two *Aspergillus niger* strains was investigated. Four major oxyfunctionalized compounds were considered. The main biotransformation products were formed in higher amounts in the first 24 hours. GC-O analyses indicated that three of the compounds obtained in biotransformation experiments had very pleasant odors. Another minor compound (also present in the chemical blank experiments) was found to be a very impacting aroma compound. GC-MS analyses indicated that 6-hydroxy-farnesene was produced in the highest amounts, reaching more than 30 mg/L for both *Aspergillus niger* strains.

1. Introduction

Terpenes are unsaturated hydrocarbons consisting of isoprene units and are widely distributed in nature. Some of their oxygenated derivatives are known as flavor compounds. Many of these terpenoids are considered as GRAS (Generally Recognized As Safe) and are frequently used as food additives or as fragrances (Tecalão, van Keulen F & Fonseca 2001).

Farnesene, a sesquiterpene present mainly in fruits, is common in citrus species and occurs in the essential oil of commercial lemon at a concentration of around 1.0% (Sawamura, Son, Choi, Kim, Phi, Fears & Kumagai 2004). α -Farnesene is the major headspace volatile in certain apple cultivars. Headspace volatile analysis in apple wholefruit indicated that farnesene was the most abundant volatile, accounting for approx. 30% of the recovered headspace (Whiting, 1998).

The presence of superficial scald in apples and pears and its development has been associated with the naturally occurring α -farnesene. Inhibitors of ethylene action delay the rise in the production of α -farnesene, reduce the accumulation of its oxidation products and then prevent scald in some apples species (Golding, McGlasson, Wyllie 2001; Pesis 2005).

The biotransformation of farnesene has not been reported, although, the biotransformation of its oxygenated compound, farnesol, has already been described. The biotransformation of (2Z,6Z)-farnesol by the plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata* has been already investigated. Oxidation of the

remote double bond and isomerization of the 2,3-double bond yielded (2Z,6Z)-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadiene-1,10,11-triol and (2E,6Z)-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadiene-1,10,11-triol as the major metabolites. A further degradation compound, (Z)-9,10-dihydroxy-6,10-dimethyl-5-undecen-2-one, was also obtained (Nankai, Miyazawa & Kameoka 1998).

The chemical analysis of the volatile compounds is not always satisfactory for determining food aroma composition, because not all of them are odorants. Rather, an analytical study directed to the identification and quantification of food components that are flavoractive is required. This fact implies the use of an analytical tool that correlates sensory and instrumental analyse. In this context, gas chromatography olfactometry (GC-O) seems to be the most appropriate technique, because the human and electronic responses are blended to maximize the available detection capabilities (Martíã, Mestres, Sala, Busto, Guasch, 2003). Furthermore, the compounds can have different aroma characteristics because of different stereochemistry (Berger, 1995).

In this investigation, we examined the ability of filamentous fungi to convert farnesene in oxyfunctionalized derivatives. This is the first report on the biotransformation of farnesene.

2. Materials and methods

2.1. Strains

All of the 19 strains tested in this work were obtained from the culture collection of the Laboratory of Bioflavors, State University from Campinas, Brazil. The source of

the strains are shown in Table 1. The strains *Aspergillus niger* CCT 7449 and *Aspergillus niger* CCT 7450 were identified by classic biochemical assays and were deposited in the culture collection of the “Fundação Tropical André Toselo”.

Table 1. Strains used in the biotransformation of farnesene and their respective origins

Strain	Isolated from
<i>Aspergillus niger</i> CCT 7449	Well ripe mango
152B	Jenipapo (Brazilian fruit)
2383	Jaca (Brazilian fruit)
<i>Scopulariopsis</i> sp	Soil
Asp 11068	Grape
<i>Aspergillus niger</i> CCT 7450	Well ripe mango
2402	Coconut
2111	Cashew
2242	Sapoti (Brazilian fruit)
M-2-B	Cashew
2395	Grape
2254	Coconut
IV	Jaca
2366	Coconut
Y67	Jaca
128-0	Grape
2276	Coconut
2399a	Grape
Coffee	Coffee

2.2. Cultivation and biotransformation experiments

Standard medium (1 L) contained 30 g D-glucose monohydrate, 4.5 g L⁻¹ asparagine monohydrate, 3 g yeast extract, 1.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·H₂O and 1 mL of trace elements solution (80 mg l⁻¹ FeCl₃·6H₂O, 90 mg l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 30 mg l⁻¹ MnSO₄·H₂O, 5 mg l⁻¹ CuSO₄·5 H₂O and 0.4 g l⁻¹ EDTA). The pH was adjusted to 6.0 with 1 M KOH prior to autoclaving.

Experimental cultures (100 mL culture volume) were inoculated with 10 mL of three-day-old precultures that had been grown in the same medium and homogenized with an ultraturrax homogenizer (Janke&Kunkel, Germany) directly after inoculation. The culturing was done on an orbital shaker (Multitron, Infors, Bottmingen, Switzerland) at 150 rpm and 24 °C.

The broth was centrifuged and the cellular mass was separated and 33.3 g was transferred to another conical flask containing 16.7 mL of the standard medium. High-density culture was done at 200 rpm and 24 °C.

The biotransformations were started by adding 25 mM of α -farnesene (purchased from RC Treatt Ltd, Bury St. Edmunds, UK; 74% purity) directly into the culture flasks. Chemical blanks were done in the same way, but without mycelia.

2.3. Analysis of terpenes in medium and mycelia

After centrifugation of the fungal cultures (100 mL) at 4000 rpm, the pellet was disrupted with liquid nitrogen. The micelia and medium were extracted three times with penthan:ether (azeotropic mixture, 1:1.12, v/v). The organic phase was dried with sodium sulfate and concentrated. GC analysis was done as described below.

2.4. Fractionation of the biotransformation extracts in silica gel

The extracts were fractionated by open microcolumn chromatography. Silica gel 60 (63-200 μ m, Merck, Germany) was heated at 100 °C for 2 h. After cooling, 4% of distilled water was added and homogenized overnight. The compounds from 1 mL

of the extract were selectively separated by the following penthan:ether mixtures: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 (v/v). Each fraction eluted was recovered and analyzed by GC-FID as described below.

2.5. GC analysis of the biotransformation products

After 1, 2 and 3 days, the broths were extracted with penthan-ether (1:1.12, v/v) or ether and concentrated. One microliter of each concentrated sample was injected into a Fisons GC 8360 gas chromatograph equipped with a cool on-column injector, a J&W CW 20 M fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 μm film thickness), hydrogen as the carrier gas (52 cm s^{-1}), and a flame ionisation detector (230°C) using a temperature program from 100°C (2 min) to 160°C with a rate of 5°C min^{-1} to 230°C and a 3°C min^{-1} hold for 5 min. Quantification was done by comparison to the internal standard thymol.

GC-MS and GC-high resolution MS analysis were done using the same chromatographic conditions as for GC-FID analysis and helium as the carrier gas (38 cm s^{-1}). Identification of transformation products was achieved by comparison of EI mass spectra with data from literature (Wiley and NIST spectral libraries) using a Fisons GC 8000 gas chromatograph and a Fisons MD 800 mass selective detector (interface: 230°C , ion source: 200°C , quadrupole: 100°C , EI ionisation (70 eV), scan range m/z 33-400 amu).

Odour impressions and thresholds were determined by means of GC-olfactometry using a Satochrom GC equipped with a cold on column injector, a J&W CW 20M

fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm film thickness) splitted (1:1) into a sniff-port (230 °C) and a FID (230 °C) and the same chromatographic conditions as for GC-FID analysis. A panel of five persons was used to note the odour impression induced by eluting compounds. Characteristic odour impressions were considered valid, if at least three of the five judges reproducibly signalled an sensory perception.

3. Results

3.1. Screening experiments

Nineteen strains were tested for their ability to convert the sesquiterpene farnesene into oxyfunctionalized compounds. *Aspergillus niger* CCT 7450 and *Aspergillus niger* CCT 7449 showed the best yields of oxyfunctionalized compounds.

3.2. Biotransformation of farnesene by Aspergillus niger CCT 7449 and Aspergillus niger CCT 7450

Ascomycetes are known to biotransform terpenes into oxyfunctionalized compounds. Four major compounds were considered in this investigation: 6-hydroxy-farnesene, 15.31, 16.18 and 18.84 (the numbers correspond to the GC-FID retention time of each compound) and one more, with a retention time of 23.50 min, at trace amounts that was not produced by biotransformation, but was also present in the chemical blanks. One of the compounds was identified by GC-MS as 6-hydroxy-farnesene, where as the others could not be identified by GC-MS (they

are probably compounds not yet present in the MS libraries). The four major compounds are probably oxygenated derivatives produced by the action of cytochrome-P450 monooxygenases and were detected in the chemical blanks in trace amounts. Figs. 1 shows the time course of each the major compounds produced by the transformation of farnesene by *A. niger* CCT 7449 (fig. 1 A) and *A. niger* CCT 7450 (Fig. 1 B).

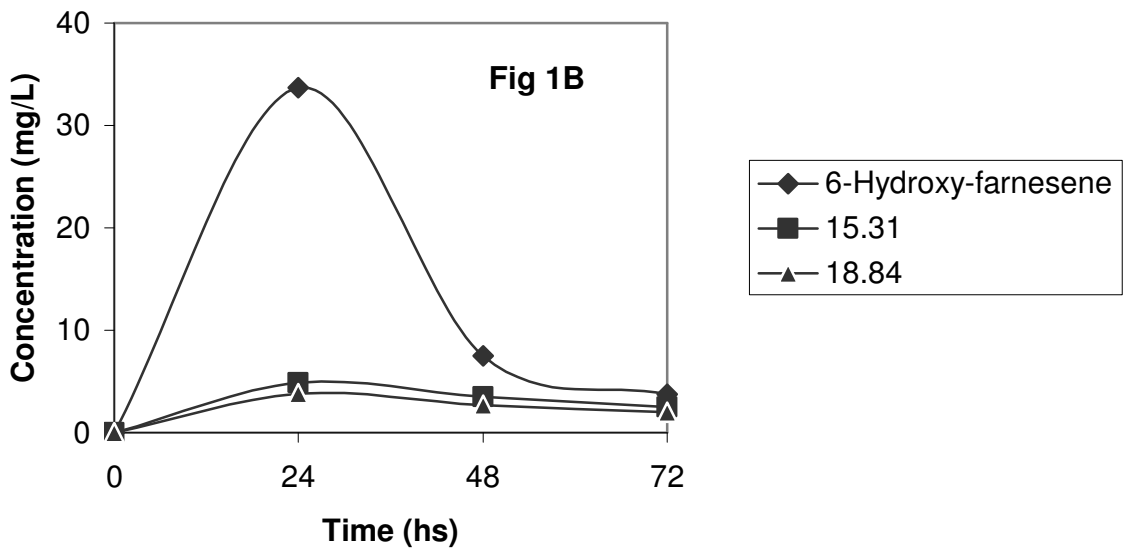
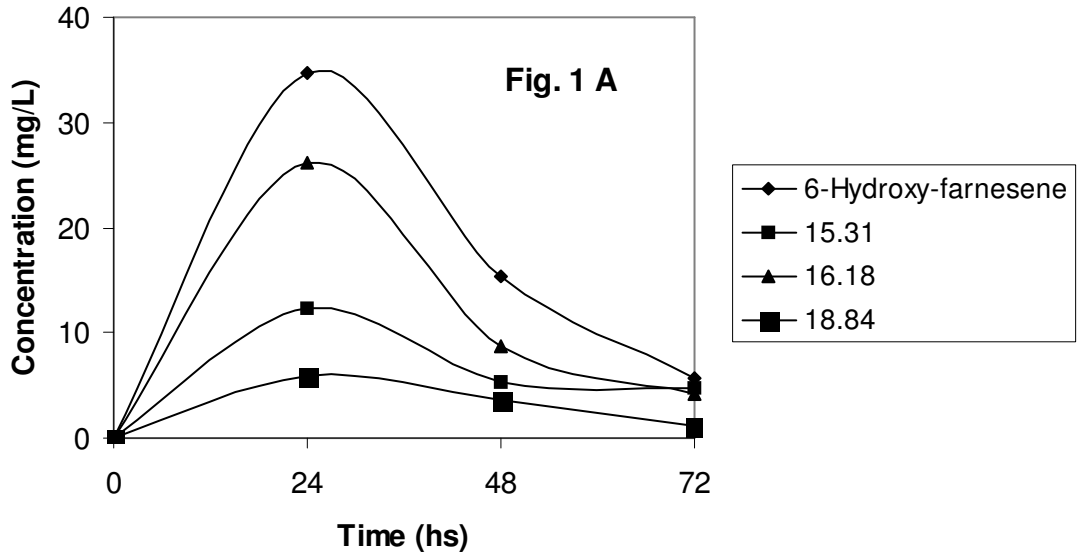


Fig 1. Biotransformation of Farnesene by *Aspergillus niger* CCT 7449 (A) *Aspergillus niger* CCT 7450 (B) (The concentrations are the mean of 3 experiments)

3.3. Distribution of biotransformation compounds between the mycelium and culture medium

The distribution of the oxyfunctionalized transformation products between the mycelia and the aqueous medium was determined. Figs 2 showed that oxyfunctionalized products are well distributed between both the mycelia and medium. Based on these results, a full extraction of the broth should be used for recovering the biotransformation products.

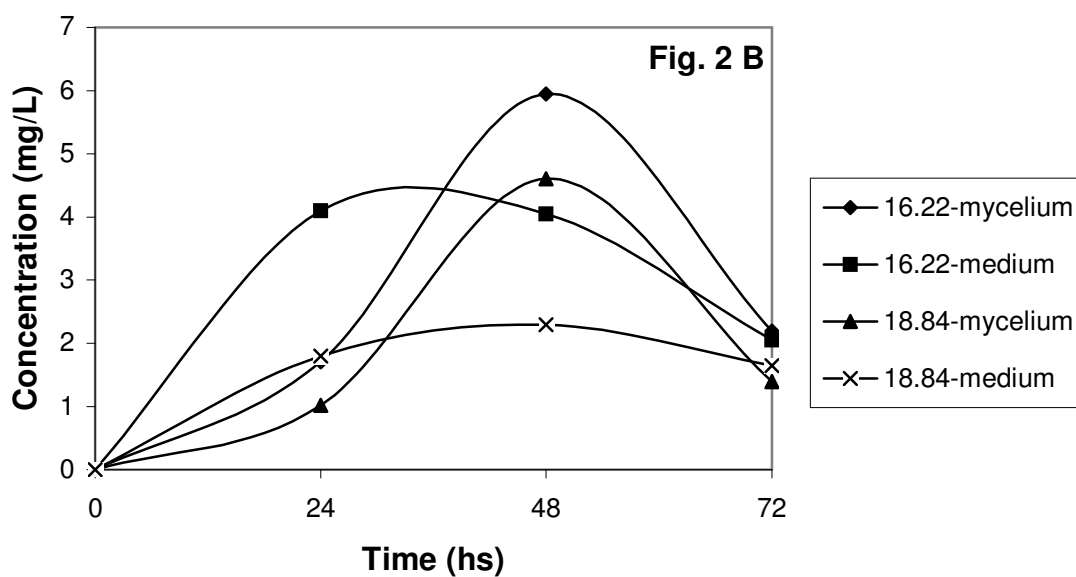
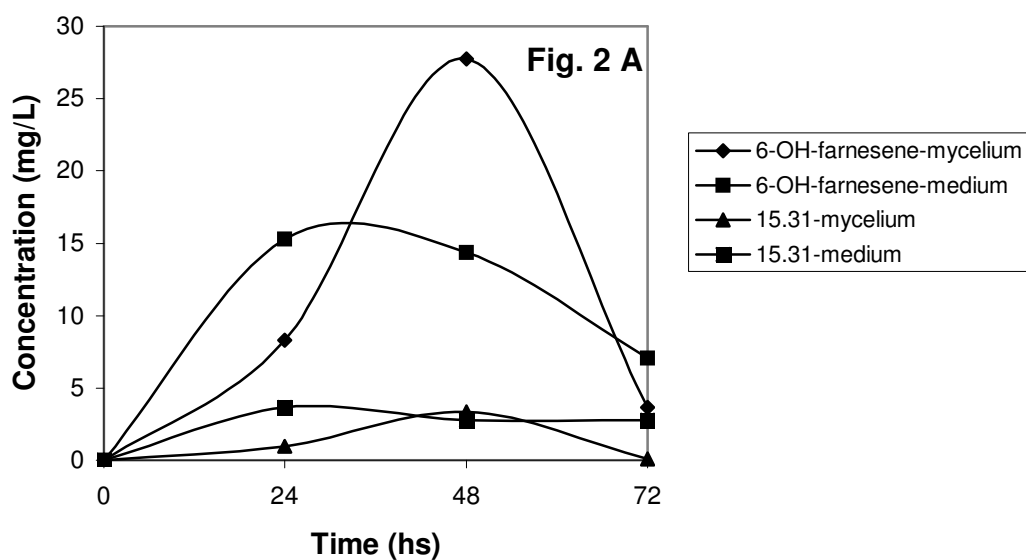


Fig. 2. Distribution of biotransformation compounds between the mycelium and culture medium for 6-hydroxy-farnesene and '15.31' (A); and '16.22' and '18.84' compounds (B) for *A. niger* CCT 7449.

3.4. Fractionation of the biotransformation extracts in silica gel

The extracts obtained from the biotransformation experiments were cleaned-up in a chromatography silica gel microcolumn using combinations of pentan-ether.

The compounds oxygenated compounds were isolated in 60:40 pentan:ether.

3.5. GC-O analyses

GC-O analyses of the 60:40 fraction showed that 6-hydroxy-farnesene was a really impacting aroma compound, with a very pleasant citrus note. Table 2 shows the odor impression of five panelists. All of them detected the major peaks and described the odor similarly. One of the major oxyfunctionalized compounds did not present an odor note. Perhaps the position in which the oxygen occurs in the farnesene molecule determines the aroma activity of the compound.

Table 2. The odor impressions of the farnesene biotransformation products

Compound	GC-O odor description
6-hydroxy-farnesene	Citrus, fresh, very impactant
'15.31'	very sweet, pleasant, intensive
'16.22'	No smell
'18.84'	Herbaceous, fruity

4. Conclusions

The biotransformation of α -farnesene by *A. niger* strains is reported by the first time. The yields were not enough for an industrial application. Four major aroma compounds were formed, one of which was identified as 6-hydroxy-farnesene and had an impacting citrus smell. The other three compounds could not be identified by GC-MS; one of them had no smell, while the other two had sweet and

herbaceous odors. The yields, however, were very small to a direct industrial application.

References

- Berger, R.G. (1995) *Aroma biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Golding, J.B., McGlasson, W.B., Wyllie, S.G. (2001) Relationship between production of ethylene and α -farnesene in apples, and how it is influenced by the timing of diphenylamine treatment, *Postharvest Biology and Technology*, 21, 225-233.
- Martiã, M.P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O., Guasch, J. (2003), Solid-Phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7861-7865.
- Nankai, H., Miyazawa, M., Kameoka, H. (1998) Biotransformation of (2Z,6Z)-farnesol by the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*, *Phytochemistry*, 47, 1025-1028.
- Pesis E., 2005, The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration, *Postharvest Biology and Technology*, 37, 1-19
- Sawamura, M., Son, U.S., Choi, H.S., Kim, M.S.L., Phi, N.T.L., Fears, M. & Kumagai C (2004) Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy, *International Journal of Aromatherapy*, 14, 27-36.
- Tecelão, C.S.R., van Keulen, F., Fonseca, M.M.R. (2001) Development of a reaction system for the selective conversion of (–)-trans-carveol to (–)-carvone with

whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 719-724.

Whiting, M.D. (1998) Volatile evolution, alpha-farnesene catabolism and superficial scald development in 'delicious' apples. A Thesis Presented to The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph In partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science.

Capítulo 6 – Potencial antioxidante de compostos de aroma monoterpênicos

Evaluation of antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil

Mario R. Maróstica Junior^{*,1}, Thomaz Rocha e Silva^{2,3}, Gilberto Franchi³,
Alexandre Nowill³, Glaucia Maria Pastore¹, Stephen Hyslop²

¹Laboratory of Bioflavors, Department of Food Science, State University of
Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

[*mario@fea.unicamp.br](mailto:mario@fea.unicamp.br)

²Laboratory of Biochemical Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State
University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Onco-hematologic Child Research Center, Faculty of Medical Sciences, State
University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

Abstract

The antioxidant activity of a limonene biotransformation extract and some standard monoterpenes present in the extract were analyzed by five antioxidant assays: total antioxidant capacity (DPPH radical-scavenging assay), measurement of lipid peroxidation by the thiobarbituric acid (TBA) assay, inhibition of superoxide formation, superoxide release by leukemic cells and glutathione S-transferase

activity. Limonene biotransformation extract showed free radical scavenging activity (up to 15 %) at a concentration of ~ 0.035% (v/v). Extract, perillyl alcohol and α -terpineol produced ~ 80% inhibition of lipid peroxidation at a concentration of 0.02% (v/v). Perillyl alcohol and α -terpineol also reduced the superoxide release by leukemic cells by 3 and 10 times respectively, at concentrations < 0.02% (v/v).

Keywords: monoterpenes, antioxidant activity, DPPH, TBA, superoxide release, GST.

1. Introduction

The biotransformation of terpenes is of interest because it allows the production of natural flavors and fragrances under mild reaction conditions (Carvalho CCCR & Fonseca MMR 2006). The use of agro-industrial residues in bioprocesses provides alternative substrates while simultaneously helping solve pollution problems (Pandey, Soccol, Nigam, Brand, Mohan, & Roussos, 2000). In addition to their aroma properties, the biological properties of compounds produced by biotransformation have been studied.

Some food monoterpenes are active against certain cancers (Kris-Etherton, Hecker, Bonanome, Coval, Binkoski, Hilpert, Griel & Etherton 2002). Essential oils, rich in monoterpenes, are recognized as food preservatives (Baratta, Dorman, Deans, Biondi, Ruberto 1998; Helander, Alakomi, Latva-Kala, Mattila-Sandhom, Pol, Smid, Gorris & von Wright 1998), and monoterpenic essential oils are natural antioxidants (Yanishlieva, Marinova, Gordon, Raneva 1999).

A number of dietary monoterpenes have antitumor activity that can prevent the formation or progress of cancer, and cause tumor regression. Limonene and perillyl alcohol have well-established chemopreventive activity against many cancer (Crowell 1999).

In this work, we examined the antioxidant activity of an extract from the biotransformation of limonene and of monoterpene standards present in this extract.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

R-(+)- α -terpineol (~99%), *R*-(+)-limonene (~99%), Perillyl alcohol (~96%), Carvone (~98%) were purchased from the Aldrich Chemical Company. All of the chemicals and solvents were of the best available commercial grade.

2.2. Biotransformation extract

The biotransformation of limonene was conducted as described in Maróstica and Pastore (*in press*). Briefly, an *Fusarium oxysporum* strain was grown for three days in manipueira (an effluent from cassava industry) and transferred to a mineral medium (0.5 g of MgSO₄, 3.0 g of NaNO₃, 1.0 g of K₂HPO₄, 0.5 g KCl and 0.01 g of Fe₂SO₄ in 1.0 L of distilled water) (Brunerie, Benda, Bock, Schreier 1987). The biotransformation of limonene was started by adding 0.1% of an orange essential oil to the mineral medium culture. Two more additions were done after 24 and 48 h. The broths were extracted with ethyl acetate 24, 48, 72 and 96 h after the first

addition of orange essential oil. All the extracts obtained were combined and concentrated.

2.3. Analysis of the samples by GC and GC-MS

The GC and GC-MS analyse were done in the same way as described previously (Maróstica and Pastore 2006).

GC-analyses were performed with a Chrompack CP9001 gas chromatograph equipped with a split/splitless-injector, an FID-detector and a WCOT Fused Silica column. The stationary phase was CP-Sil CB (60 m length x 0.25 mm i.d.; coating thickness of 0.25 μm). The working conditions were: injector 220°C, detector 250°C (make-up gas He 1 mL/min). The oven temperature was programmed from 40°C to 210°C at 5°C/min with an initial holding time of 1 min and a final holding time of 5 min. Quantification was done by comparison with the internal standard decane.

GC-MS-analyses were done using a Varian Saturn gas chromatograph equipped with an EM-IT mass selective detector, a CP-Sil 8CB Low bleed/MS capillary column (30m x 0.25mm x 0.25 μm) and a split/splitless CP1177 injector. The working conditions were: injector 280°C, transfer line to MSD 260°C. The oven temperature was programmed from 40°C (1 min) to 160°C (3 min) at 5°C/min and from 160°C to 250°C with a final holding time of 5 min, scan range m/z 40-500, carrier gas (He) 1 mL/min; split 1/50; ionisation EI 70 eV; mass range 40-500 amu and scan rate, 1 s⁻¹. Positive identifications were made by matching the sample retention indices (RI) and mass spectra of the samples with those of the standards analysed under identical conditions.

2.4. Total antioxidant capacity: DPPH radical-scavenging assay

The nitrogen radical-scavenging activity was measured by monitoring the reduction of the free nitrogen radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in the presence of the extract, monoterpene standards and ethyl acetate. The samples (diluted in ethanol) were added to the wells of a 96-well microtitre plate and 200 μ L of a DPPH solution (0.4 mg/L in ethanol) was added. After 30 min, the total antioxidant capacity was determined from the decrease in absorbance at 515 nm. The radical-scavenging activity was expressed as the % quenching of the DPPH radical, calculated as $[(Abs_0 - Abs_{30min}) / Abs_0] \times 100$. All determinations were done in triplicate.

2.5. Measurement of lipid peroxidation by thiobarbituric acid (TBA) assay

The lipid peroxidation activity was determined as described by Singh Chidambara Murthy & Jayaprakasha (2002). Aliquots (240 μ L) of liver homogenate (0.5 mg of protein/mL in tris-HCl buffer 50 mM, pH 7.4 with 150 mM of KCl) were mixed with 30 μ L of extract and monoterpene standards (diluted 100, 500 and 1000 times in ethanol) and 15 μ L of 4 mM ascorbic acid. Peroxidation was initiated by adding 100 μ L of 0.2 mM ferric chloride and the reaction was run at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by adding 500 μ L of an ice-cold mixture of 0.25 N HCl containing 16.8% trichloroacetic acid and 0.86% TBA followed by heating to 80 °C for 15 min. The samples were cooled and centrifuged, and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. An identical experiment control was done to determine the amount of lipid peroxidation obtained in the presence of inducing agents without extract. The percentage of antilipid peroxidative activity (% ALP)

was calculated using the formula: antilipid peroxidation (%) = [1 - (sample OD/blank OD) x 100].

2.6. Inhibition of superoxide formation

The inhibition of superoxide formation was assayed according to Boveris, Fraga, Varsavsky & Koch (1983). The method is based on the inhibition of the spontaneous oxidation (superoxide radical) of epinephrine to adrenochrome (absorbance at 480 nm). Buffer (230 μ L 50 mM glycine, pH=10.2) and samples at several dilutions were distributed in wells followed by the addition of 20 μ L of epinephrine (pH=2). The blank consisted of 250 μ L of buffer and the negative control was 230 μ L of buffer and 20 μ L of epinephrine. The reaction was monitored for 1 min at 480 nm. The % of inhibition was calculated as $[(Abs_{sam} - Abs_{contr}) / (Abs_{contr})] * 100$, where Abs_{sam} is the absorbance of the sample and Abs_{contr} is the absorbance of the control.

2.7. Superoxide released by leukemic cells

Superoxide release by leukemic cells was assayed in 96-well plates. Myeloid leukemia K562 cells were resuspended in Krebs-Ringer phosphate buffer with 2 mg/mL dextrose and 80 μ M cytochrome c (KRPD), at 5×10^6 cells/mL. Cells (10^6 cells in 200 μ L) were distributed in wells and 20 μ L of samples (0.2% v/v) was added immediately before phorbol myristate acetate (PMA) addition (2.16 μ M). Cells without sample were incubated as a positive control and wells without sample

and with 0.5 U of SOD were used for the negative control. The blank consisted of KRPD with PMA, without cells. After incubation for 1 h at 37°C in the dark, the plate was centrifuged and 150 µL of supernatant was transferred to a microwell plate and read at 550 nm. The unit of superoxide released per cell was equivalent to fmol of reduced cytochrome c, using $24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ as the extinction coefficient.

2.8. Glutathione S-transferase activity

All experiments were done in triplicate. Samples at several concentrations and buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.4 with 1 mM EDTA) (total volume of 150 µL) were transferred to wells, followed by the addition of 25 µL of 50 mM GSH (glutathione) solution in buffer and 20 µL of rat liver (2 mg/mL of protein, determined by Bradford method). The mixture was incubated for 5 min at 37°C. The reaction was started by adding 30 µL of 2 mM NPA (nitrophenyl acetate). The blank consisted of sample with GSH and without NPA. Spontaneous reaction was done in a control well without sample (150 µL of buffer). Activity was calculated in terms of mol of NPA per minute according to the formula: $\text{Ativ} = (\text{Sl}_{\text{am}} - \text{Sl}_{\text{sp}}) \cdot \text{Vol} / 8,79 \cdot (\text{Vol} \cdot 0,0031)$ (mmol/min); Sl_{am} = mean of the maximum slope in sample; Sl_{sp} = mean of the maximum slope in the spontaneous reaction; Vol = final volume of each well (205 µL); 0.0031 was a correction factor for 96 well plates. The extinction coefficient was $\epsilon_{400\text{nm}} = 8,79 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3. Results and discussion

3.1. Biotransformation extract

The biotransformation extract was obtained as described in section 2.1 and analyzed as in 2.2. The main compounds present (concentrations > 0.1 mg/L) are shown in table 1.

Table 1. Concentration of monoterpenes present in biotransformation broth extracted with ethyl acetate

Terpene	Concentration (mg/L)
Perillyl alcohol	2.6
Carvone	0.2
Limonene	165.9
α -Terpineol	6.6

3.2. Total antioxidant capacity: DPPH radical-scavenging assay

The free radical scavenging potential of the biotransformation extract and standard monoterpenes at different concentrations were tested by the DPPH method. The results are shown in Fig. 1. According to Singh, Chidambara Murthy & Jayaprakasha (2002), the antioxidant compounds react with DPPH, converting it to α, α -diphenyl- β -picryl hydrazine, and the degree of discoloration indicates the scavenging potential of the compounds tested. The extract showed radical scavenging activity, where as limonene, α -terpineol and carvone had less activity.

Ethyl acetate, the solvent used in the extraction (hence the major compound present on extract) had a pro-oxidant activity. Considering the clear radical scavenging activity of the extract, two possibilities can be considered to explain these results: 1) the extract consists of a mixture of terpenes, that act synergistically to provide a better radical scavenging activity compared to the isolated compounds and 2) the radical scavenging is provided not by the monoterpenes, but by other non-volatile compounds present in the extract. The extract possessed a yellow color, probably due to carotenoids that occur in orange essential oil.

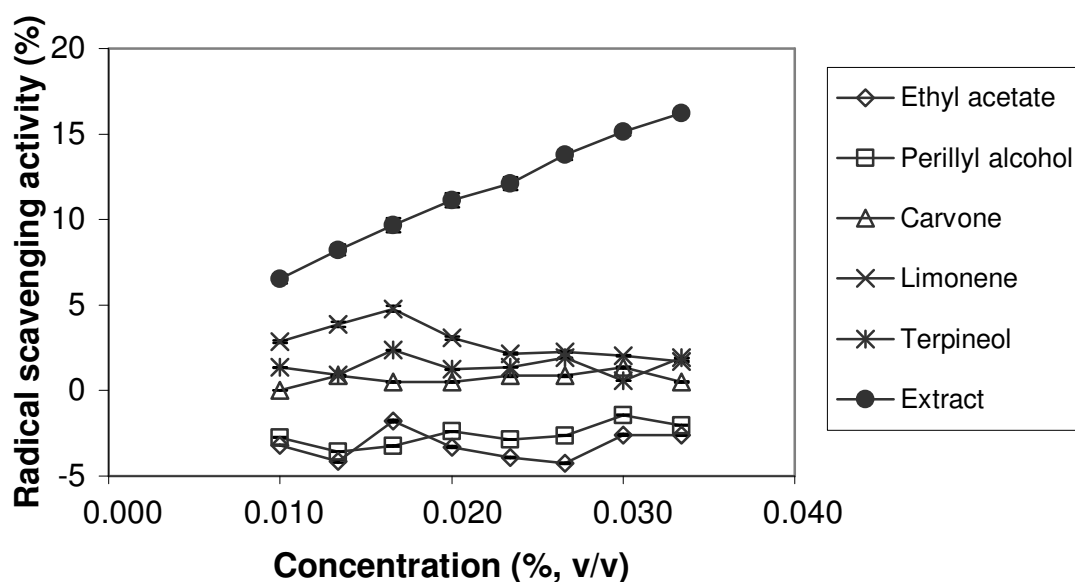


Fig 1. Radical scavenging activity of the biotransformation ethyl acetate extract and monoterpene standards determined by the DPPH method.

3.3. Lipid Peroxidation by the thiobarbituric acid (TBA) assay

The capacity of the extract and monoterpene standards to prevent lipid peroxidation were determined by the TBA assay. Thiobarbituric acid reacts with malondialdehyde (MDA) to form a pink chromogen, that can be detected spectrophotometrically. In biological systems, MDA is a reactive species that takes part in the cross-linking of DNA with proteins, and damages liver cells (Singh, Chidambara Murthy & Jayaprakasha 2002). MDA is the major product of lipid peroxidation and is used to study lipid peroxidation in rat liver homogenates. Determination of the lipid peroxide content was done indirectly by derivatizing MDA with TBA at high temperature and acidic conditions.

Fig 2 shows the results obtained with the TBA assay using the biotransformation extract and standard monoterpenes. All monoterpene standards inhibited lipid peroxidation. Perillyl alcohol showed an elevated capacity to inhibit lipid peroxidation. Perillyl alcohol has antitumor activity and can play a role in antioxidant process (Crowell 1999). The inhibition of lipid peroxidation by monoterpene standards was concentration-dependent. The extract showed a high inhibition at low concentrations, and this did not change significantly with increasing concentrations unlike the monoterpene standards. The two hypotheses discussed in section 3.2 could also explain this inhibitory behavior.

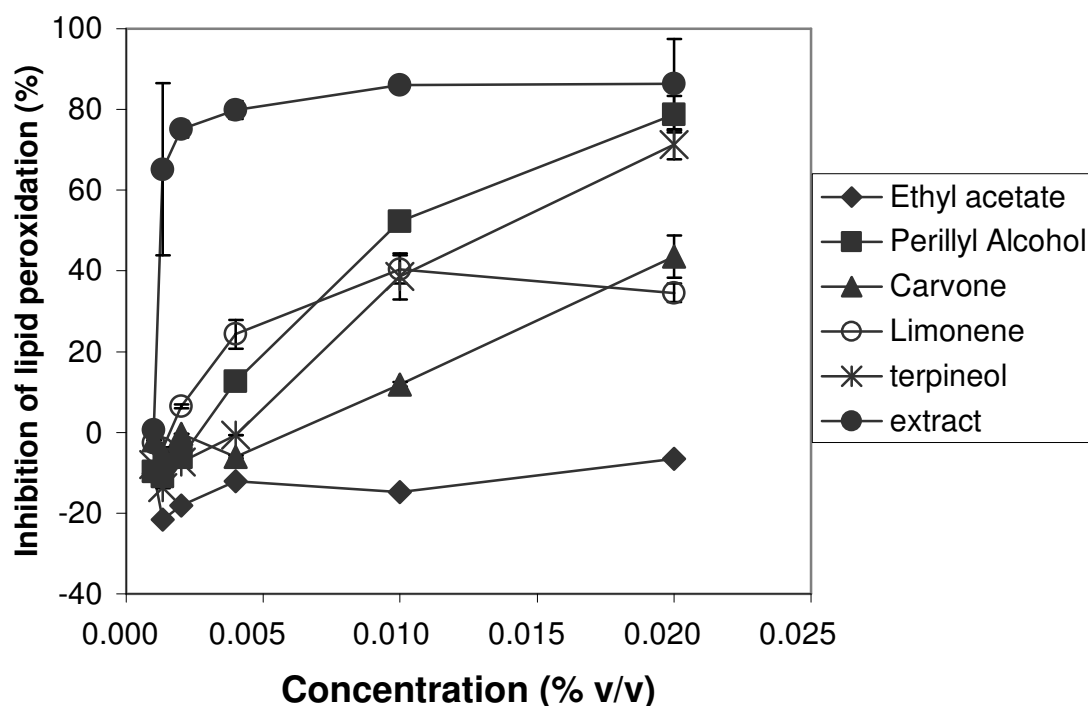


Fig. 2. Inhibition of lipid peroxidation activity by the biotransformation extract and monoterpene standards using the TBA method. The points are the mean \pm SEM of 2 determinations.

3.4. Inhibition of superoxide formation

Oxidative stress or excessive production of reactive oxygen species (ROS) has been implicated in many diseases, such as cancer, atherosclerosis, ageing and diabetes (Kaik, Priyadarsini, Naik, Gangabagirathi, Mohan 2004). The potential targets for ROS in cells are membrane lipids, DNA and proteins. External supplementation through antioxidants is recommended to protect cells from the deleterious effects of oxidative stress. Superoxide anion (O_2^-) is a potentially damaging compound, and hydrogen peroxide is its most common final product. However, in the presence of metals such as Fe^{2+} and Cu^+ , O_2^- is converted to

hydroxyl radical (HO_2^\cdot), which reacts with many organic substances (Stryer 1996). Fig 3 shows the inhibition of superoxide radical formation. The extract and carvone stimulated the production of O_2^\cdot ; limonene had little effect. In contrast, perillyl alcohol and α -terpineol strongly inhibited O_2^\cdot production. An inhibition of 50% was reached for perillyl and α -terpineol at concentrations of 1.6% and 3.0%, respectively.

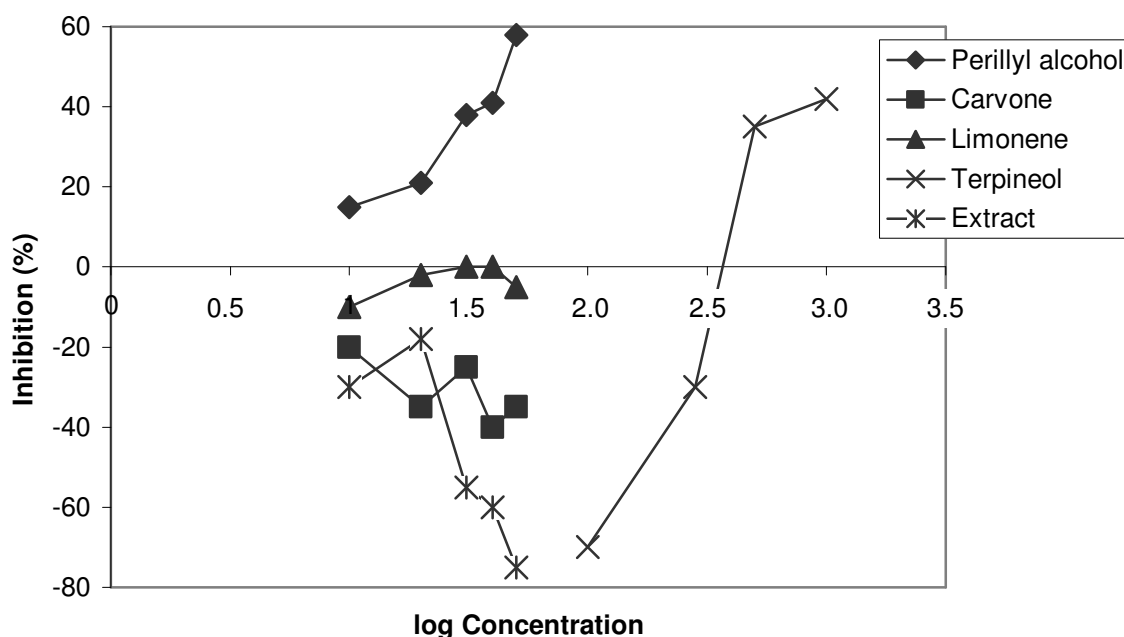


Fig. 3. Inhibition of superoxide radical formation by the biotransformation extract and the monoterpene standards. The results are the mean of 3 experiments.

3.5. Superoxide released by leukemic cells

Phorbol myristate acetate (PMA), a potent tumor promoter, has diverse effects on cellular growth, differentiation, and metabolism. PMA also has a strong inflammatory action that induces O_2^\cdot production in neutrophils by activating their NADPH oxidase (Lehrer, Cohen 1981). The ability of monoterpene standards and extract to inhibit the formation of O_2^\cdot was investigated. Fig. 4 shows the amounts of

$O_2^{\cdot -}$ released in cells in the presence of monoterpenes/extract. A strong inhibition of $O_2^{\cdot -}$ release was observed with perillyl alcohol and α -terpineol, where as limonene stimulated the production of $O_2^{\cdot -}$. Since the extract contains a large amount of limonene and smaller amounts of α -terpineol and perillyl alcohol, the mild effect of the extract could be explained by a possible interaction among the monoterpenes.

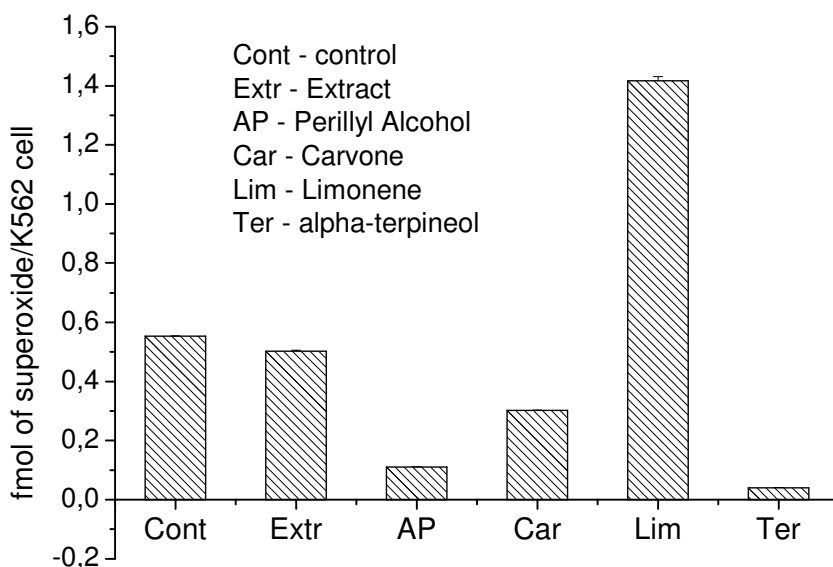


Fig. 4. Effects of monoterpenes on superoxide ($O_2^{\cdot -}$) released in leukemic cells stimulated by PMA. The columns are the mean of two experiments.

3.6. Glutathione S-Transferase activity

Glutathione S-transferases (GSTs) are a group of enzymes specific for GSH (reduced glutathione), a cofactor for GST. GST is the most important enzyme in phase II reactions, playing a physiological role in the detoxification of alchelating agents. Compounds such as toxic xenobiotics and products from lipid peroxidation are substrates for GST. The transferases also catalyze the glutathione-dependent release of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl acetate and *p*-nitrophenyl trimethylacetate. Fig. 5 shows the inhibition of the conversion of NPA in *p*-

nitrophenol by biotransformation extract and monoterpenes. Extract, perillyl alcohol and limonene showed the same pattern, with maximum at a concentration of 2.5%. The inhibition with α -terpineol was concentration dependent.

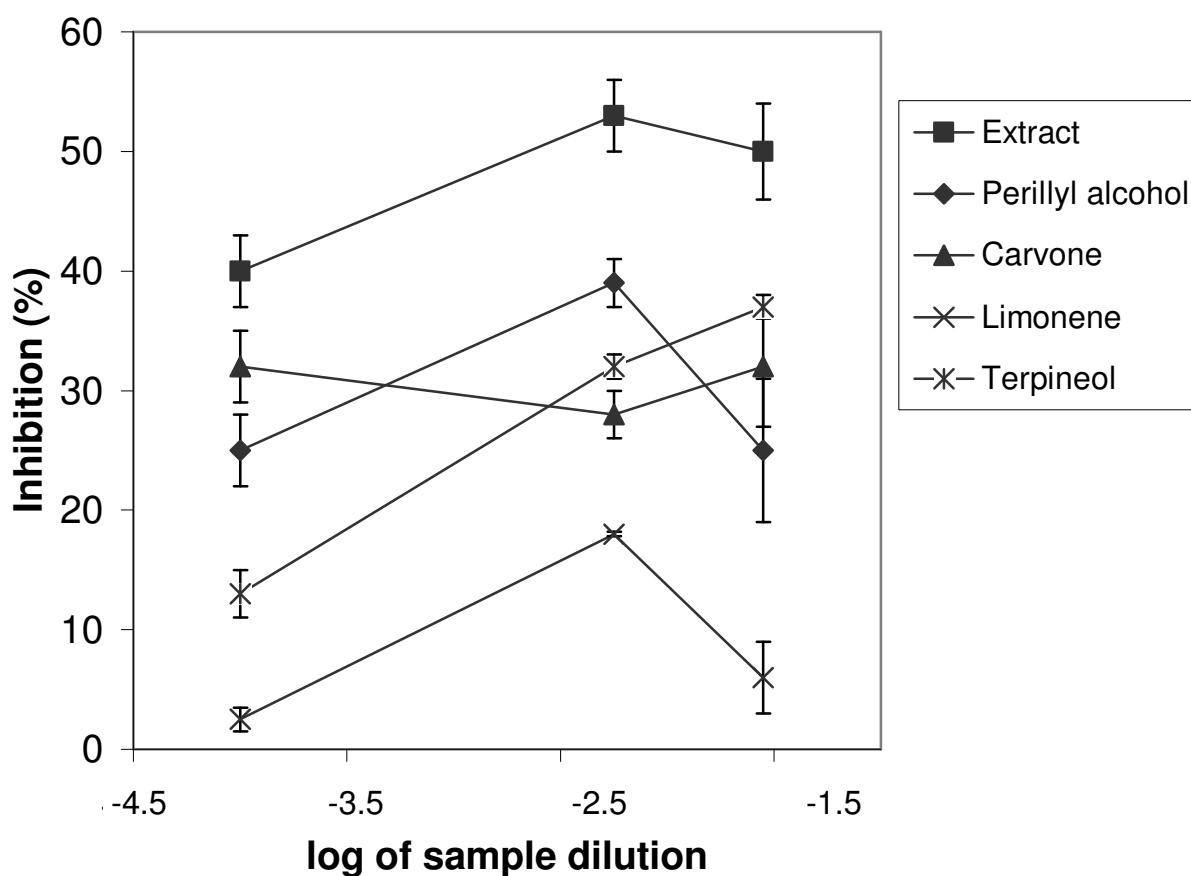


Fig. 5. Inhibition of the conversion of NPA to *p*-nitrophenol by the biotransformation extract and monoterpenes. The points are the mean \pm SEM of three determinations.

4. Conclusions

The antioxidant potential of a limonene biotransformation extract and some monoterpenes standards (present in the extract) was examined in five antioxidant assays. The crude extract may be useful as an antioxidant, without being purified, thereby reducing the need for industrial purification techniques, which are expensive.

The results obtained here suggested that some monoterpenes may be useful as 'functional aroma compounds', in health supplements and nutraceuticals.

Acknowledgements

This project was funded by CNPq, Brazil (Process Number 141601/2004-3).

References

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., Ruberto, G. (1998) Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils *Journal of Essential Oil Research*, 10, 618-627.

Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I., Koch, O.R. (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227, 534-41.

Brunerie, P.; Benda, I.; Bock, G.; Schreier, P. (1987) Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 6-10.

Carvalho CCCR & Fonseca MMR (2006) Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, 24, 134-142.

Crowell, P.L. (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition*, 129, 775–778.

Helander, I. M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandhom, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., von Wright, A. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

Kaik, G.H., Priyadarsini, K.I., Naik, D.B., Gangabhairathi, R., Mohan, H., (2004) Studies on the aqueous extract of *Terminalia Chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector, *Phytomedicine*, 11, 530-538.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002) Bioactive compounds in foods: their

role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113, 71-88

Lehrer, R. I., Cohen, L. (1981) Receptor-mediated regulation of superoxide production in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *Journal of Clinical Investigation*. 68, 1314–1320.

Marostica Junior, M.R., Pastore, G.M. (2006) Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*. In press.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess, *Biochemical Engineering Journal* 6, 153-162.

Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N. & Jayaprakasha, G.K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 81-86.

Strayer, L. (1996) Bioquímica, Guanabara Hoogan 4^{ed} Hong Hong.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., Raneva, V.G. (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.

Conclusão Geral

A capacidade de uma linhagem de *Fusarium oxysporum* em converter o limoneno em compostos de aroma foi evidenciada, sendo alcançada produção de α -terpineol da ordem de 0,4 g/L. Dois resíduos industriais (óleo essencial de laranja e manipueira) foram utilizados como alternativa para o barateamento do processo produtivo de compostos de aroma por biotransformação, representando um passo adiante no sentido de tornar esse processo numa alternativa exequível.

Utilizando o mesmo meio de cultura para crescimento, uma linhagem de *Penicillium* sp. transformou citronelol em *cis/trans*-óxido de rosa, composto de altíssimo valor agregado e muito utilizado na indústria de fragrâncias.

Nos experimentos de biotransformação de citronelol e limoneno destaca-se o rápido desenvolvimento das linhagens em manipueira. Ressalta-se ainda que os maiores rendimentos da biotransformação foram obtidos nos experimentos em que as linhagens foram crescidas em manipueira e transferidas para meio mineral isento de fontes de carbono e nitrogênio, sendo os monoterpenos as únicas fontes de carbono presentes.

A técnica de micro extração em fase sólida mostrou-se adequada para a seleção de linhagens com potencial biotransformador dos monoterpenos analisados (limoneno, α - e β -pinenos) em compostos de aroma. A rapidez e simplicidade da técnica e a extração dos voláteis sem utilização de solventes são vantagens que permitem a otimização e redução de custos num processo de seleção de microrganismos para produção de compostos de aroma. Isso pôde ser confirmado pelas análises dos compostos produzidos em cultura líquida, as quais

produziram os mesmos compostos obtidos em culturas de superfície cujo 'headspace' foi analisado por MEFS. Entretanto, a quantificação dos compostos não é precisa como numa extração por meio de solvente orgânico.

A biotransformação de α - e β -pinenos por linhagens de *Mucor* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. gerou compostos de alto valor agregado como verbenona e verbenol em concentrações da ordem de 50 e 70 mg/L.

Neste trabalho relata-se a inédita biotransformação de α -farneseno com a obtenção de quatro compostos oxifuncionalizados. Linhagens de *Aspergillus niger* produziram compostos com aromas impactantes descritos como cítrico, herbáceos. Destaca-se a produção de 6-OH-farneseno, composto não descrito anteriormente na literatura, como o produto principal e com aroma cítrico impactante. Um dos compostos oxifuncionalizados não apresentou aroma algum nas análises por cromatografia gasosa-olfatometria, o que sugere que a posição da molécula ocupada pelo oxigênio pode ter um papel fundamental na característica sensorial do composto, determinando o aroma da substância.

Alguns efeitos antioxidantes de monoterpenos puderam ser evidenciados. Demonstrou-se que o extrato obtido da biotransformação de limoneno por *Fusarium oxysporum* pode desempenhar um papel na captura de radicais livres. A capacidade antioxidante 'in vitro' foi ratificada: o mesmo extrato, além de monoterpenos como álcool perílico e terpineol demonstraram grande habilidade de inibir a peroxidação lipídica. Ensaio 'in vivo' demonstraram a atuação de álcool perílico e α -terpineol na inibição da formação do radical superóxido por dois métodos (oxidação da epinefrina e indução da liberação de superóxido em células

leucêmicas). Relatos sobre o potencial antioxidante e anticarcinogênico do álcool perílico são abundantes, entretanto, não há muitos dados relativos ao α -terpineol. A comprovação do α -terpineol como possível composto biologicamente ativo gera novas possibilidades para sua utilização, uma vez estar presente em alguns óleos essenciais e poder ser biotransformado a partir do limoneno por diversas linhagens. Esses resultados geram novas possibilidades para a utilização desses compostos em alimentos e bebidas, uma vez que a comprovação da atividade funcional dessas substâncias adere à demanda do mercado consumidor por produtos que possuam papel na prevenção de doenças.