

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos

Rogério Zen Petersen

Porto Alegre, 2006

FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos

Tese apresentada por
Rogério Zen Petersen para
a obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Amélia T. Henriques

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.08.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.Dr. Paulo Roberto Moreno
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini
Universidade de Santa Cruz do Sul

R484b	Petersen, Rogério Zen
	Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos / Rogério Zen Petersen – Porto Alegre: UFRGS, 2006 – 206 p.: il.
	Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
	1. Biotecnologia. 2. Biotransformação. 3. Terpenos. 4. Células vegetais. 5 .Fungos Filamentosos. I. Henriques, Amélia Teresinha. II. Título.
	CDU: 547.9

Bibliotecária Responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Matéria-prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento do CNPQ. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPQ.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.” (Amyr Klink)

Agradecimentos

Aos meus pais, meus irmãos e avós por tudo que sempre fizeram por mim.

À Tati pelo companheirismo, amizade e que espero esteja por muito tempo ao meu lado, tendo a certeza que verdadeiramente te amo.

Ao amigo Cabral pelas nossas conversas e amizade.

Aos amigos Paulinho e Nael com quem aprendi muito e mais do que isso foram parceiros na ceva.

Ao meu amigo Lápis que mais do que amigo considero meu irmão.

Aos "IC's" Vitória, Cassiano, Lisiane por terem participado deste trabalho e quem considero grandes amigos.

Ao Dennis pelas conversas e por sempre acreditar no meu trabalho.

Ao Professor Germani pela ajuda e pelas discussões.

Ao Sidney, Fabrício, Antônio, Fernanda, Ana por tudo.

Aos meus colegas do laboratório de pesquisa em Farmacognosia.

Ao Professor Pedro Ros Petrovick por todo o esforço, por acreditar no meu trabalho e não me fazer desistir.

Aos professores da Faculdade de Farmácia que de alguma forma colaboraram neste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia.

Sumário

Resumo	xv
Abstract	xvii
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3.REVISÃO	11
3.1.Metabólitos secundários	13
3.2.Terpenos	14
3.3.Biossíntese	18
3.4.Biotransformação	17
3.5.Utilização de enzimas nas reações de biotransformação	32
3.5.1. Biotransformação utilizando reações de hidrólise	34
3.5.2. Biotransformação utilizando reações de redução	36
3.5.3. Biotransformação utilizando reações de oxidação	38
3.5.3.1.Monoxigenases	40
3.5.3.2.Dioxigenases	43
3.5.3.3.Peroxidases	44
3.5.3.4.Oxidases	45
3.6.Reações enzimáticas em meio aquoso	46
3.7.Culturas de células vegetais	48
3.7.1. Aplicações de células vegetais em biotransformação	50
3.7.2. Fatores Interferentes em Culturas de Células Vegetais	46
3.8. Culturas de microrganismos	60
3.8.1. Aplicações de Microrganismos em Biotransformação	63
3.8.2. Condições reacionais em reações de bioconversão utilizando fungos	75
4. MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1.Substratos	79
4.2.Solventes	79
4.3.Preparação da suspensão de células de <i>Catharanthus roseus</i>	80
4.3.1.Caracterização do ciclo de crescimento da suspensão celular	82
4.3.2.Adição do substrato ao meio de cultura	83
4.3.3.Acompanhamento da reação de biotransformação	83
4.4.Isolamento dos produtos	84
4.5.Análise por cromatografia gasosa	85
4.6.Análise química	86
4.7. Polarimetria	87
4.8. Culturas de <i>Cunninghamella echinullata</i> ATCC 9245, <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757 e <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	88

4.8.1. Manutenção das culturas	88
4.8.2. Meios de cultura	88
4.8.3. Ensaio em agitador orbital de plataforma	89
4.8.3.1. Inoculo	89
4.8.3.2. Avaliação do crescimento dos microrganismos	89
4.8.4. Determinações dos parâmetros físico-químicos	90
4.8.4.1. Determinação de massa seca	90
4.8.4.2. Determinação de açúcares redutores	90
4.8.4.3. Determinação de pH	91
4.8.5. Preparação dos meios nutritivos	92
4.8.5.1. Meio Sabouraud (SB)	92
4.8.5.2. Meio caldo Batata-dextrose (PDB)	92
4.8.5.3. Tampão Fosfato de Potássio	92
4.8.6. Preparação dos “pellets” de <i>Cunninghamella echinulata</i> <i>Mortierella isabellina</i> e <i>Cunninghamella elegans</i>	93
4.9. Adição do substrato ao meio de cultura	93
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1. Transformação de Monoterpenos por Culturas de Células de <i>Catharanthus roseus</i>	97
5.1.1. Produtos de Transformação de (R)-(+)- α -pineno	97
5.1.2. Produtos de Transformação de (S)-(-)- α -pineno	102
5.1.3. Produtos de Transformação de (S)-(-)- β -pineno	106
5.1.4. Produtos de Transformação do Óleo de Terebentina	113
5.2. Biotransformação de monoterpenos por microrganismos	118
5.2.1. Produtos de transformação de (R)-(+)- α -pineno com fungos filamentosos	125
5.2.2. Produtos de transformação de (S)-(-)- α -pineno com fungos filamentosos	130
5.2.3. Produtos de transformação de (S)-(-)- β -pineno com fungos filamentosos	136
5.2.4. Produtos de Transformação de do Óleo de Terebentina com fungos filamentosos	142
5.3.5. Produtos de Transformação de monoterpenos utilizando PDB	147
6. CONCLUSÕES	157
7. REFERÊNCIAS	161
ANEXOS	
8. Anexos	185
BIOGRAFIA	
9. Biografia	201

Lista de Figuras

Figura 1.: Estruturas de alguns terpenóides	15
Figura 2.: Unidade básica de formação de terpenos	18
Figura 3.: Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP e IPP pela via do Ácido mevalônico	19
Figura 4.: Primeiro passo da biossíntese de terpenos com formação de IPP via: a. mevalonato. b. via independente Rohmer	20
Figura 5.: Formação do GPP: precursor dos monoterpenos	21
Figura 6.: Monoterpenos derivados de GPP, LPP e NPP e seus aromas	22
Figura 7.: Principais estruturas dos monoterpenos	23
Figura 8.: Formação do cátion mentil/terpenil a partir de GPP	24
Figura 9.: Formação de α -terpineol e limoneno	24
Figura 10.: Estruturas de monoterpenos derivados de cátions pinil, bornil e mentil	25
Figura 11.: Formação da unidade básica de sesquiterpenos	26
Figura 12.: Cátions Intermediários para a formação de sesquiterpenóides	27
Figura 13.: Estruturas derivadas do cátion bisabolil	28
Figura 14.: Estrutura do ácido betulínico presente em <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	31
Figura 15.: Reação de epóxidos racêmicos utilizando epóxido hidrolases	34
Figura 16.: Resolução enantiomérica para formar cianoidrinas	35
Figura 17.: Resolução quiral de aminoácidos piperidínicos com proteases	35
Figura 18.: Redução de beta-ceto-ésteres com redutase	37
Figura 19.: Redução de cetonas alfa-beta insaturadas com redutases isoladas de fermento	38
Figura 20.: Esquema enzimas oxidantes	40
Figura 21.: Formação de dienos por peroxidase	42
Figura 22.: Oxidação do tipo Bayer-Villinger utilizando monoxigenases	42
Figura 23.: Hidroxilação utilizando enzimas de <i>Caldariomyces fumago</i>	43
Figura 24.: Reação com composto aromático catalisada por peroxidases	44
Figura 25.: Produtos de biotransformação de limoneno com diversas culturas celulares	52
Figura 26.: Produtos reação de biotransformação de β pineno com <i>Picea abies</i>	53
Figura 27.: Estrutura de varfarina e seus metabólitos	55
Figura 28.: Reações de glicosilação utilizando células de <i>Catharanthus roseus</i>	56
Figura 29.: Redução de carvona com formação de produtos β substituídos	57
Figura 30.: Estruturas de um fungo vistas através de microscópio ótico	61
Figura 31.: Redução de α -dicetonas por <i>S. cerevisiae</i>	64
Figura 32.: Estéreo-inversão de diois cíclicos por <i>C. cassicola</i>	65
Figura 33.: Redução de geraniol a citroanelol por <i>S. cerevisiae</i>	65
Figura 34.: Resolução enzimática de β lactamas bicíclicas via lactamase	66
Figura 35.: Resolução enzimática de lactamas bicíclicas via lactamase	66
Figura 36.: Resolução microbiana por <i>Bacillus</i> sp	67
Figura 37.: Diracemização do óxido de estireno por microrganismos	68

Figura 38.: Hidrólise enantioselectiva de α hidroxinitrilas por microrganismos	68
Figura 39.: Régio hidroxilação por <i>Beauveria bassiana</i>	69
Figura 40.: Hidroxilação microbiana de aromáticos	70
Figura 41.: Hidroxilação microbiana regioselectiva efetuada em escala industrial	71
Figura 42.: Derivados de furanodienos obtidos de oxidações em reatores	73
Figura 43.: Produtos utilizados nas reações de biotransformação	79
Figura 44: Flores de <i>Catharanthus roseus</i>	80
Figura 45: Cultura de suspensão celular de <i>Catharanthus roseus</i>	82
Figura 46.: Aspecto da cultura de fungos filamentosos	93
Figura 47.: Curva de crescimento das células de <i>Catharanthus roseus</i>	98
Figura 48.: Cromatograma transformação (R)-(+)- α -pineno	99
Figura 49.: Produtos de biotransformação de (R)-(+)- α -pineno por suspensões celulares de <i>C. roseus</i>	101
Figura 50.: Cromatograma do produto 4 em coluna quiral	102
Figura 51.: Cromatograma transformação (S)-(-)- α -pineno	103
Figura 52.: Cromatograma da α -terpineol em coluna quiral	105
Figura 53.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- α -pineno em suspensões de células de <i>C. roseus</i>	105
Figura 54.: Cromatograma transformação (S)-(-)- β -pineno	106
Figura 55.: Cromatograma de α -terpineol em coluna quiral	109
Figura 56.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno em suspensões de células de <i>C.roseus</i>	109
Figura 57.: Cromatograma produto 4 em coluna quiral	112
Figura 58.: Produtos de biotransformação de (R)-(+)- α -pineno com <i>C. elegans</i>	127
Figura 59.: Produtos de biotransformação de (R)-(+)- α -pineno com <i>C. echinulata</i>	129
Figura 60.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com <i>C. elegans</i>	133
Figura 61.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com <i>C. elegans</i>	134
Figura 62.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com <i>Mortierella isabellina</i>	136
Figura 63.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com <i>Cunninghamella elegans</i>	139
Figura 64.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com <i>C. echinulata</i>	141
Figura 65.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com <i>Mortierella isabellina</i>	142
Figura 66.: Produtos de biotransformação de terebentina com <i>Cunninghamella elegans</i>	145
Figura 67.: Produtos de biotransformação de terebentina com <i>Cunninghamella echinulata</i>	146

Lista de tabelas

Tabela 1.: Classe de enzimas utilizadas em reações de biocatálise	32
Tabela 2.: Componentes do meio MS utilizado para <i>Catharanthus roseus</i>	69
Tabela 3.: Valores da curva de crescimento para culturas de células de <i>Catharanthus roseus</i>	98
Tabela 4.: Cinética da reação de (<i>R</i>)-(+)- α -pineno em cultura de <i>Catharanthus roseus</i>	100
Tabela 5.: Cinética da reação de (<i>S</i>)-(-)- α -pineno em cultura de <i>Catharanthus roseus</i>	103
Tabela 6.: Cinética da reação do de (<i>S</i>)-(-)- β - pineno em cultura de <i>C.roseus</i> 15 dias	107
Tabela 7.: Cinética da reação de (<i>S</i>)-(-)- β -pineno em cultura de <i>Catharanthus roseus</i>	110
Tabela 8.: Cinética da reação de terebentina em cultura de <i>Catharanthus roseus</i>	113
Tabela 9.: Produtos biotransformação monoterpênicos	115
Tabela 10.: Valores de glicose e massa seca para o fungo <i>C.elegans</i>	118
Tabela 11.: Valores de pH para o fungo <i>C.elegans</i>	120
Tabela 12.: Valores de glicose e massa seca para o fungo <i>C.echinulata</i>	121
Tabela 13.: Valores de pH para o fungo <i>C.echinulata</i>	122
Tabela 14.: Valores de glicose e massa seca para o fungo <i>M.isabelina</i>	123
Tabela 15.: Valores de pH para o fungo <i>M.isabelina</i>	124
Tabela 16.: Cinética da reação do de (<i>R</i>)-(+)- α -pineno com fungos filamentosos	125
Tabela 17.: Cinética da reação do de (<i>S</i>)-(-)- α -pineno com fungos filamentosos	131
Tabela 18.: Cinética da reação do de (<i>S</i>)-(-)- β -pineno em cultura de fungos filamentosos	137
Tabela 19.: Cinética da reação do óleo de terebentina em cultura de fungos filamentosos	143
Tabela 20.: Produtos biotransformação de fungos para (<i>R</i>)-(+)- α -pineno em meio PDB	148
Tabela 21.: Produtos de biotransformação de fungos para (<i>S</i>)-(-)- α -pineno em meio PDB	149
Ta	50
Ta	51
Ta	51
EM MEIO SABOURAUD	152
Tabela 25.: Produtos majoritários de biotransformação de monoterpênicos com fungos filamentosos em meio Sabouraud e PDB	153
Tabela 26.: Rendimentos para as reações de biotransformação com fungos e células	155
Tabela 27.: Preços dos produtos de partida e obtidos com as reações de Biotransformação	155

Gráfico 1.: Biotransformação de (R)-(+)- α pineno por <i>Catharanthus roseus</i>	100
Gráfico 2.: Biotransformação de (S)-(-)- α pineno por <i>Catharanthus roseus</i>	104
Gráfico 3.: Biotransformação de (S)-(-)- β -pineno por <i>Catharanthus roseus</i>	108
Gráfico 4.: Biotransformação de (S)-(-)- β -pineno por <i>Catharanthus roseus</i>	111
Gráfico 5.: Biotransformação de terebentina por <i>Catharanthus roseus</i>	114
Gráfico 6.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo <i>C. elegans</i>	119
Gráfico 7.: Variação de pH para o fungo <i>Cunninghamella elegans</i> cultivado em meio SB	120
Gráfico 8.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo <i>C.echinulata</i>	121
Gráfico 9.: Variação de pH para o fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> cultivado em meio SB	122
Gráfico 10.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo <i>M.isabellina</i>	123
Gráfico 11.: Variação de pH para o fungo <i>M.isabellina</i> cultivado em meio SB	124
Gráfico 12.: Biotransformação de (R)-(+)- α -pineno com cultura de <i>Cunninghamella elegans</i>	126
Gráfico 13.: Biotransformação de (R)-(+)- α -pineno com <i>Cunninghamella echinulata</i>	128
Gráfico 14.: Biotransformação de (R)-(+)- α -pineno com cultura de <i>Mortierella isabellina</i>	130
Gráfico 15.: Biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com cultura de <i>Cunninghamella elegans</i>	132
Gráfico 16.: Biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com <i>Cunninghamella echinulata</i>	133
Gráfico 17.: Biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com cultura de <i>Mortierella isabelina</i>	135
Gráfico 18.: Biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com cultura de <i>Cunninghamella elegans</i>	138
Gráfico 19.: Biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com <i>Cunninghamella echinulata</i>	140
Gráfico 20.: Biotransformação de (S)-(-)- β -pineno com cultura de <i>Mortierella isabellina</i>	141
Gráfico 21.: Biotransformação de terebentina com cultura de <i>Cunninghamella elegans</i>	144
Gráfico 22.: Biotransformação de terebentina com cultura de <i>Cunninghamella echinulata</i>	145
Gráfico 23.: Biotransformação de terebentina com cultura de <i>Mortierella isabellina</i>	147

Resumo

Os estudos da biotransformação têm-se mostrado um método eficiente para reações que envolvam a obtenção de compostos com interesse comercial. Dentre estes produtos utilizados podemos destacar monoterpenos por constituírem uma variedade de compostos com grande aplicação tanto no âmbito farmacêutico, como em perfumes, cosméticos e alimentos. As suspensões de células vegetais e os fungos filamentosos têm sido largamente usados em reações de biotransformação destes metabólitos secundários como substratos exógenos. A habilidade das culturas celulares e fungos em transformar tais compostos vêm sendo dirigidos principalmente para a obtenção de derivados oxigenados de maior valor agregado, principalmente visando à produção de flavorizantes, aromatizantes e fragrâncias.

As suspensões de células vegetais apresentam sistemas enzimáticos mais complexos, podendo levar a produtos específicos, enquanto os microrganismos, por serem mais simples e de crescimento mais rápido, geralmente promovem mais rapidamente a metabolização dos substratos.

Neste contexto, o presente trabalho descreve a investigação do potencial de bioconversão dos monoterpenos (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -pineno, bem como do óleo de terebentina, para avaliação de suas potencialidades frente a reações de biotransformação mediadas pelos microrganismos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 e por suspensões de células vegetais de *Catharanthus roseus*.

Todos os sistemas estudados mostraram habilidade na bioconversão dos substratos testados. O principal produto obtido a partir dos pinenos e do óleo de terebentina foi o terpineol.

Palavras-chave: *Biotransformação, Terpenos, Culturas de células vegetais, suspensões de fungos filamentosos.*

Abstract

Biotransformation has been an efficient method to obtain important commercial compounds such as monoterpenes, that have a range of applications in the pharmaceutical, perfumery, cosmetics and food industries.

Plant cell cultures and filamentous fungi suspensions have been widely used in biotransformation reactions of monoterpenes as exogenous substrates. The ability of the cells and fungi cultures to transform these compounds has being mainly used for the synthesis of oxygenated derivatives aiming at the production of flavours and fragrances.

The plant cell cultures suspensions have complex enzymatic systems with the production of specific compounds, where as filamentous fungi, which are structurally simpler and fast growing, can promote quicker transformations reactions.

In this context, the present work describes the evaluation of bioconversion of the monoterpenes (*R*)-(+)- α -pinene, (*S*)-(-)- α -pinene, (*S*)-(-)- β -pinene, as well as turpentine oil using the filamentous fungi suspensions of *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 and *Mortierella isabellina* NRRL 1757, aswer as *Catharanthus roseus* plant cell cultures.

All evaluated systems were capable of bioconverting the studied substrates. The main product obtained from pinenes and turpentine oil was α -terpineol.

Keywords: *Biotransformation, Terpenes, Plant cell cultures, filamentous fungi suspensions.*

1. INTRODUÇÃO

As plantas constituem uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais podem servir de modelos para a síntese de um grande número de fármacos, devido a sua diversidade estrutural e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL e WANI, 1996). A natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. O reino vegetal tem fornecido grande parte dos metabólitos secundários com grande valor agregado, com grande aplicação em medicamentos, cosméticos, alimentos, dentre outros (PINTO *et al*, 2002).

No Brasil, estima-se que 25% do faturamento da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas. Destes, apenas uma pequena parte das espécies vegetais da flora foi estudada na busca de compostos bioativos e uma pequena parte das espécies vegetais foi avaliada quanto a suas propriedades medicinais (GARCIA *et al.*, 1996), constituindo modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos (PINTO *et al*, 2002). As perspectivas dentro deste campo químico-farmacêutico são, portanto, imensas frente à vasta fonte de produtos naturais potencialmente úteis, ainda não investigados. Em países como o Brasil, onde se concentra a maior e mais variada flora do planeta, a investigação do potencial farmacêutico de suas espécies é uma questão estratégica.

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatada ao longo do tempo. Pode-se exemplificar este uso através de estudos desenvolvidos sobre a síntese de hormônios esteróides, progesterona, a partir de saponinas como a diosgenina isolada de cactos mexicanos (*Dioscorea macrostachya* Benth.) (MARKER *et al.*, 1947). Este trabalho foi de suma importância para o desenvolvimento de esteróides e também para a descoberta da pílula contraceptiva feminina (CRABBÉ, 1979).

Assim, o emprego de produtos naturais na síntese de substâncias de interesse farmacêutico compreende uma estratégia útil para a obtenção de novos compostos bioativos, desde que o planejamento molecular seja adequadamente realizado, respeitando as características das classes terapêuticas alvo.

Dentre as muitas classes de metabólitos secundários utilizados destacam-se os terpenóides por sua vasta aplicação farmacêutica (CRAKER, 1990; FIGUEIREDO, 1992), complexidade estrutural e difícil emulação laboratorial. Segundo Harbone, (1989) os terpenos constituem-se na classe de produtos naturais com maior número de substâncias descritas.

Como alternativa na busca de modificações estruturais para a obtenção de moléculas com maior potencial terapêutico estão as reações de biotransformação. O desenvolvimento recente e quase exponencial de trabalhos com culturas *in vitro* de células vegetais e fungos filamentosos deve-se ao grande potencial biotecnológico que já está se concretizando, inclusive industrialmente, bem como suas aplicações latentes que estão por emergir. São inegáveis as potencialidades existentes na moderna biotecnologia da cultura de células e seu uso na biotransformação.

A transformação de substratos adicionados aos meios de cultura destas células desperta o interesse de diversas áreas, como farmacêutica e alimentos. Os monoterpenóides têm sido largamente explorados como substratos para reações biocatalíticas, onde a versatilidade dos sistemas enzimáticos possibilita a obtenção de grande variabilidade estrutural dos compostos obtidos, além de agregar maior valor comercial às moléculas originalmente encontradas na natureza.

Estas reações de biotransformação, efetuadas pelo sistema enzimático das células em cultura, são altamente específicas ao substrato, permitindo reconhecê-lo de forma régio e estereoseletiva, sendo, portanto, capazes de realizarem reações não acessíveis por processos químicos clássicos.

Os estímulos a estes tipos de trabalhos podem render aplicações no setor industrial, gerando também parcerias nestas pesquisas. Além disso, vários produtos naturais, como monoterpenos, têm mostrado interesse tanto do ponto de vista farmacêutico quanto industrial justificando, assim, a busca de novos processos que possam otimizar os produtos formados.

Neste contexto, este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias utilizando culturas de células vegetais e fungos filamentosos em reações de biotransformação, utilizando como substratos exógenos os terpenóides. Encontra-se dividido em 3 capítulos. O primeiro compreende revisão do tema. O segundo aborda estudos de biotransformação de (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α pineno, (*S*)-(-)- β -pineno com culturas de células vegetais de *Catharanthus roseus*, e o terceiro, biotransformações dos mesmos substratos utilizando culturas de fungos filamentosos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista a importância da classe dos terpenóides, produtos do metabolismo secundário, o presente projeto visa a investigação do potencial de bioconversão de alguns dos monoterpenos obtidos de óleos voláteis por cultura de suspensão de células e culturas de microrganismos.

2.2. Objetivos Específicos

O presente trabalho visa a utilização dos terpenos, *R*-(+)- α -pineno, *S*-(-)- α -pineno, β -pineno, além de óleo de terebentina para avaliar suas potencialidades frente a reações de biotransformação utilizando os microrganismos *Cunninghamella echinullata* ATCC 9245, *Morthierella isabellina* NRRL 1757 e *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 e por suspensões celulares de *Catharanthus roseus*, enfocando:

- O acompanhamento do crescimento das culturas bem como a detecção dos produtos obtidos.
- A análise quanto a sua estabilidade frente aos sistemas biocatalíticos e aos meios reacionais.
- O acompanhamento da cinética das reações por cromatografia a gás utilizando detector de ionização de chama.
- A caracterização dos produtos obtidos por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

3. REVISÃO

3.1. Metabólitos secundários

Comparados com outras moléculas encontradas em plantas, os metabólitos secundários caracterizam-se por apresentarem baixa abundância, chegando a aproximadamente 1% do total de todas as moléculas contendo carbono que ocorrem na natureza. O desenvolvimento de técnicas bioquímicas e o trabalho desenvolvido pela biologia molecular têm sido importante para demonstrar a função destes metabólitos, produtos que possuem papel importante principalmente na adaptação do vegetal ao meio ambiente (BOURGAUD *et al.*, 2001).

Estas moléculas contribuem para a interatividade da planta com o ecossistema através de sistemas de defesa do vegetal, sendo considerados como antifúngicos, antibióticos e antivirais, atuando no processo de proteção da planta contra estes patógenos (fitoalexinas) e, também, na inibição de outras espécies vegetais (alelopatia) (BOURGAUD *et al.*, 2001; MORANT *et al.*, 2003; PERVAIZ, 2004).

Os compostos secundários são classificados de acordo com sua via biossintética, sendo consideradas grandes famílias: os compostos fenólicos, os terpenos, esteróides e alcalóides (HARBORNE, 1989). Compostos fenólicos são metabólitos comuns às plantas e estão envolvidos na síntese de lignanas (BUNSIRI *et al.*, 2003), sendo encontrados em todas as plantas superiores. Já metabólitos como alcalóides são esparsamente distribuídos entre os vários vegetais sendo específicos a determinados gêneros e espécies e o estudo de sua distribuição constitui uma preocupação básica do estudo da taxonomia e química ecológica. (GRIFFIN e LIN, 2000; TRIGO *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004).

Devido à larga atividade biológica dos metabólitos secundários de plantas, estes produtos têm sido usados durante séculos na medicina tradicional. Os compostos de maior valor são os utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e na química fina onde aproximadamente 25% das moléculas usadas são de origem natural (PAYNE *et al.*, 1991a; RATES, 2001).

3.2. Terpenos

Os terpenóides constituem uma classe de produtos naturais com grande diversidade estrutural e para a qual, até o momento, verifica-se o maior número de substâncias descritas. Dentre as estruturas de maior importância incluídas neste grupo, estão aquelas classificadas como monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides e carotenóides, derivadas sem exceção, de um mesmo precursor biossintético, o pirofosfato de isopentila (BRUNETON, 2001).

Para os produtos de origem terpênica observa-se vasta aplicação farmacêutica, onde mono e sesquiterpenóides, devido à sua alta qualidade sensorial, figuram como os principais compostos utilizados como flavorizantes na indústria de alimentos e medicamentos (BAUER *et al.*, 1990). Fragrâncias florais, frutadas, amadeiradas e cítricas destacam-se dentre os aromas apresentados por terpenos isolados. Esta variedade de fragrâncias e aromas, ponto de grande relevância no interesse comercial por estes produtos, pode ser atribuída à ocorrência de um grande número de isômeros para esta classe de metabólitos.

As estruturas dos terpenóides comercialmente relevantes em virtude de seus aromas encontram-se ilustradas na **figura 1**.

Além da utilização como matéria-prima para composição de formulações farmacêuticas, o uso de produtos de origem terpênica ocorre também *in natura*, como acontece para os chamados feromônios, os quais estão envolvidos em

processos de reprodução e de defesa química contra microrganismos e insetos (TORSELL, 1999).

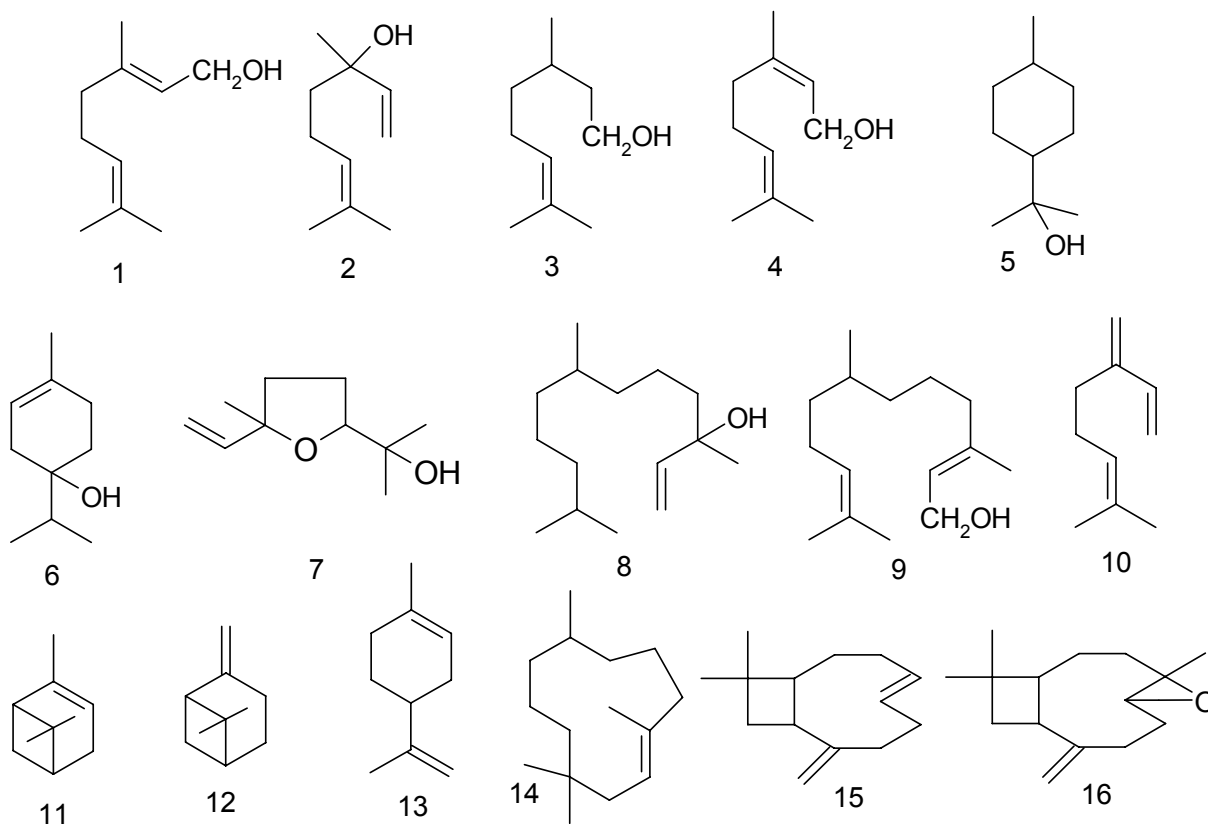


Figura 1.: Estruturas de alguns terpenóides. 1: Geraniol (floral, cítrico); 2. Linalol (floral); 3. Citronelol (doce, cítrico); 4. Nerol (floral); 5. α -Terpineol; 6. Terpinen-4-ol (medicinal); 7. Óxido linalol (herbáceo); 8. Nerolidol (floral); 9. Farnesol (floral); 10. β -mirceno (medicinal); 11. α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

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Outros

terpenóides, como os diterpenos, são geralmente encontrados em óleos vegetais extraídos com solventes orgânicos além de serem unidades terpênicas pouco voláteis e, portanto, excluídas do grupo dos óleos essenciais (SCHANTZ, 1967; CROTEAU, 1987; BRUNETON, 1992; TYLER *et al.*, 1996).

Muitos destes terpenos, ainda são responsáveis por um grande número de substâncias sintéticas e artificiais produzidas por processos puramente químicos (JANSSENS *et al.*, 1992). Grande parte destes compostos apresenta atividade antiinflamatória, expectorante (DUKE, 1985) e antimicrobiana (RAMAN *et al.*, 1995), entre outras.

Alguns terpenos voláteis ocupam posição de destaque por apresentarem comprovada atividade biológica e, portanto, grande interesse comercial, como o β -mirceno, que apresenta atividade analgésica destacada, além de ser um importante intermediário para a produção de uma diversidade de aromas, tais como geraniol, nerol e linalol (DERFER e DERFER, 1981). Além deste, alguns outros terpenos como limoneno e terpinoleno, apresentam atividade antimicrobiana, sendo largamente utilizados como material de partida para a síntese de produtos também comercialmente importantes, como mentol e carvona (CARVALHO E FONSECA, 2006).

Os compostos sesquiterpênicos também destacam-se por sua utilização em várias propostas sintéticas e atividades biológicas descritas (ERMAN, 1985). Assim como observado para os monoterpênóides, muitas destas substâncias são isoladas diretamente de amostras de óleos essenciais e apresentam como principais características estruturais a presença de grupos funcionais que incluem hidroxilas e carbonilas nas mais variadas posições, em presença ou não de insaturações, e com efeitos significativos na atividade destes compostos (ALEIXO, 1999). Um exemplo é o (-)- α -bisabolol, para o qual é relatada significativa atividade antiinflamatória, sendo este utilizado em diversos produtos comerciais e obtido diretamente de sua fonte natural - geralmente da *Vanillosmopsis*

erythropappa - através de destilação do extrato da planta sob pressão reduzida (O`DONNELL *et al.*, 1989).

O interesse comercial por produtos naturais tem aumentado significativamente ao longo dos anos e, no caso dos terpenóides, este fato deve-se principalmente, ao grande consumo de fragrâncias e substâncias odoríferas. Além disso, a classificação "natural" tem se mostrado de grande impacto comercial, sendo consideradas "substâncias naturais" também as estruturas derivadas de reações puramente enzimáticas ou provenientes de processos envolvendo microrganismos. Esses mantêm sua classificação como natural, mas, no entanto, existem ainda os produtos classificados como "idênticos aos naturais", os quais ocorrem na natureza, mas são obtidos a partir de reações com processos não-naturais (CHEETHAM, 1997).

O consumidor tende a preferir produtos naturais que produzem uma conotação positiva enquanto que o termo artificial é geralmente associado à conotação negativa, o que justifica, em parte, o estudo nas reações utilizando biocatalisadores naturais para a produção de fragrâncias industriais (SHARPELL, 1985, WELSH *et al.*, 1989, TYRREL, 1990).

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

Do ponto de vista comercial, os produtos ditos naturais são interessantes por apresentarem valor econômico pronunciado, embora nem todos os terpenóides justifiquem sua exploração, como é o caso dos terpenos

hidrocarbonetos, que embora sejam considerados naturais, não apresentam características odoríferas. No entanto, tais compostos são de baixo custo e podem servir como material de partida para a síntese de produtos naturais ou idênticos aos naturais (LIMBERGER, 2001).

3.3. Biossíntese

Os terpenóides formam uma larga e extensa família de metabólitos, sendo o isopreno a estrutura básica para a formação destes compostos através de uma unidade básica de cinco carbonos, a unidade isoprênica (C_5) (**Figura 2.**).

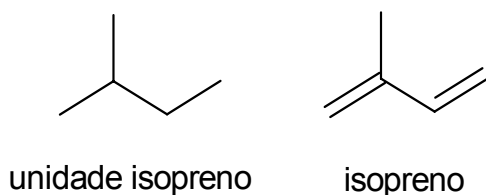


Figura 2.: Unidade básica de formação de terpenos

As estruturas típicas que contêm a estrutura isoprênica (C_5), unem-se principalmente através de ligações cabeça-cauda, possibilitando a formação dos diversos grupos de terpenos, tais como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenes (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). No entanto, o isopreno não participa diretamente da formação destes compostos. Neste caso, os precursores dos terpenos são identificados como ésteres difosfatos denominados pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e pirofosfato de isopentilalila (IPP) mostrados na **figura 3.** (DEWICK, 1997).

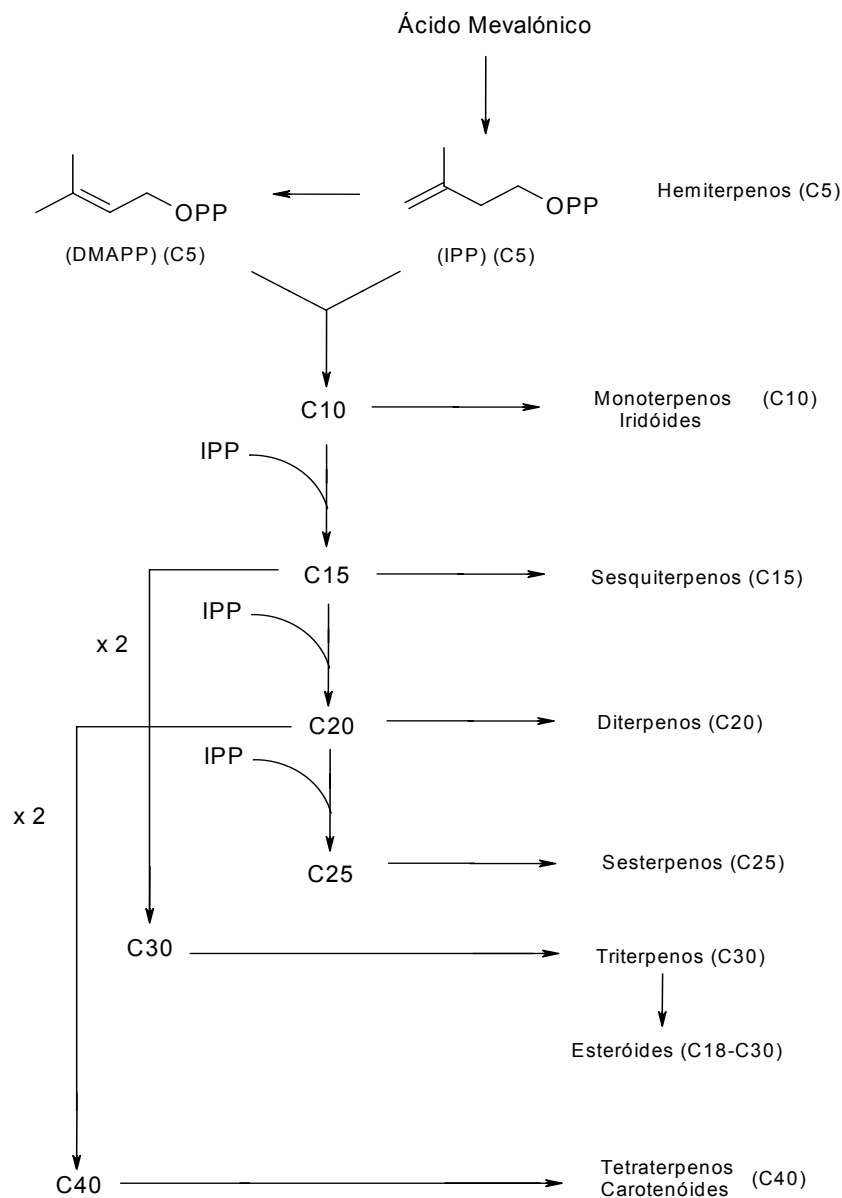


Figura 3.: Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP e IPP pela via do ácido mevalônico (DEWICK, 1997).

Estes compostos são formados através de duas vias principais destacando-se como principal a via acetato/mevalonato. A bioquímica das unidades isoprênicas, com formação de IPP são derivadas da rota metabólica principal denominada via do ácido mevalônico (McCASKILL e CROTEAU, 1997; DEWICK, 1999), sendo que em bactérias, algas e plantas superiores ocorre também por

outras vias (ROHMER, 1999, ROHMER *et al.*, 2001), localizada principalmente no cloroplasto, das quais muitas enzimas já foram isoladas e caracterizadas. Finalmente, a isomerização de IPP por IPP isomerase leva a formação de DMAPP, conforme **figura 4**.

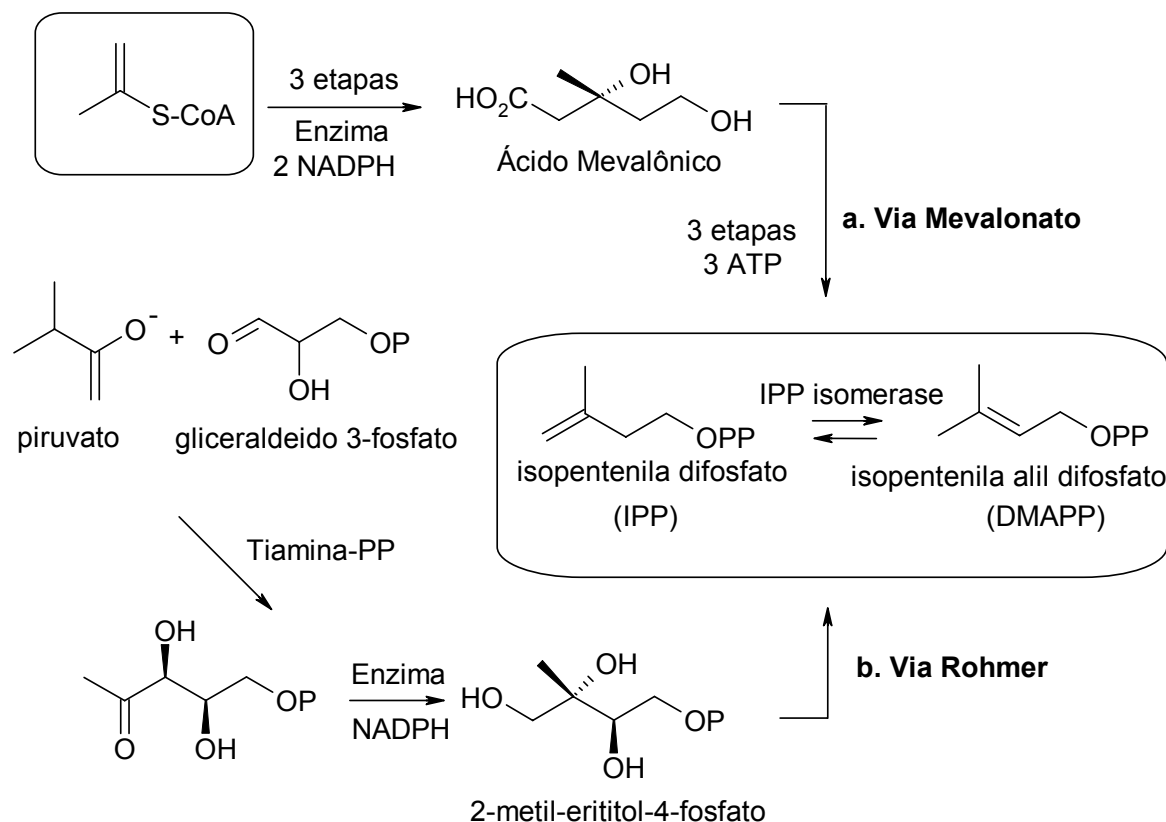


Figura 4: Primeiro passo da biossíntese de terpenos com formação de IPP via: a. mevalonato. b. via mevalonato independente Rohmer (DEWICK, 1997).

Os terpenóides naturais são formados por ligações de unidades isoprênicas predominantemente via cabeça-cauda lineares, ocorrendo a formação de produtos como geraniol (C10) e farnesol (C15), embora muitos compostos possam ser formados através de ligações cauda-cauda formando compostos, como por exemplo, o esqualeno (C30). O rearranjo de unidades isoprênicas lineares pode originar ainda núcleos esteróides ou compostos alcaloídicos, onde ocorre a

conjugação entre elementos terpenóides e estruturas nitrogenadas (DEWICK, 1997).

A biossíntese de monoterpenos ocorre pela combinação de DMAPP e IPP via enzima prenil transferase, formando a unidade básica pirofosfato de geranila (GPP) em um mecanismo que envolve a ionização de DMAPP, com formação de um cátion alílico e com a adição à dupla ligação da molécula de IPP (**Figura 5**).

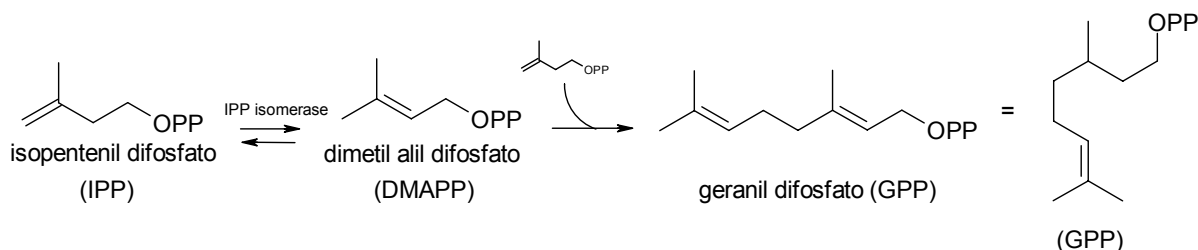


Figura 5.: Formação do GPP: precursor dos monoterpenos

A ligação dupla formada apresenta geralmente configuração *trans*, mas a unidade GPP pode sofrer modificações através de sua ligação dupla formando isômeros LPP (pirofosfato de linalila) e NPP (pirofosfato de nerila), o que possibilita a obtenção de novos monoterpenos. Com a mudança da estereoquímica são obtidos compostos com diferentes características principalmente quanto à sua utilização como flavorizantes e perfumes, propriedades relacionadas com a presença de grupos funcionais diversos tais como alcoóis, aldeídos e ésteres (**Figura 6**) (HARBORNE, 1989; MANN, 1994; DEWICK, 1997).

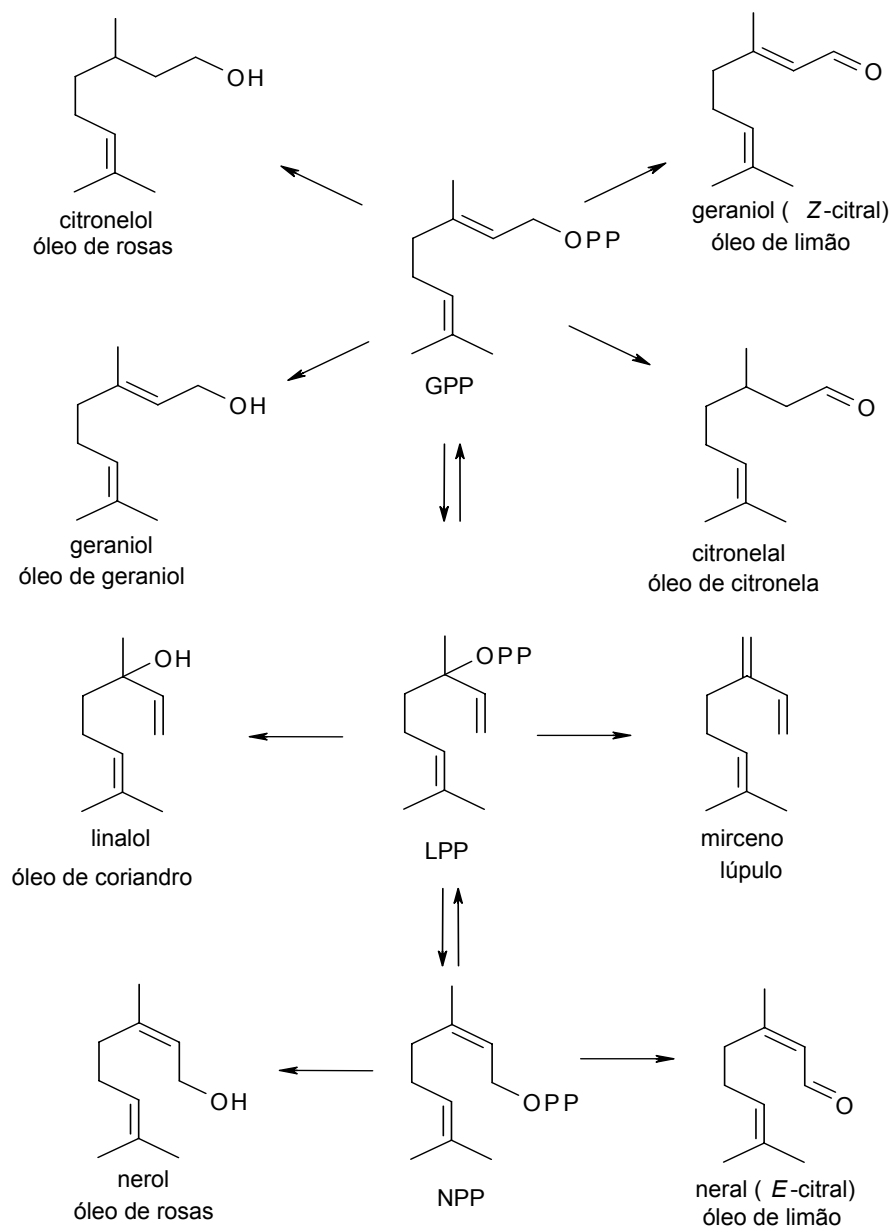


Figura 6: Monoterpenos derivados de GPP, LPP e NPP e seus aromas

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

monoterpenos cíclicos mais comumente encontrados em essências estão apresentadas na **figura 7**.

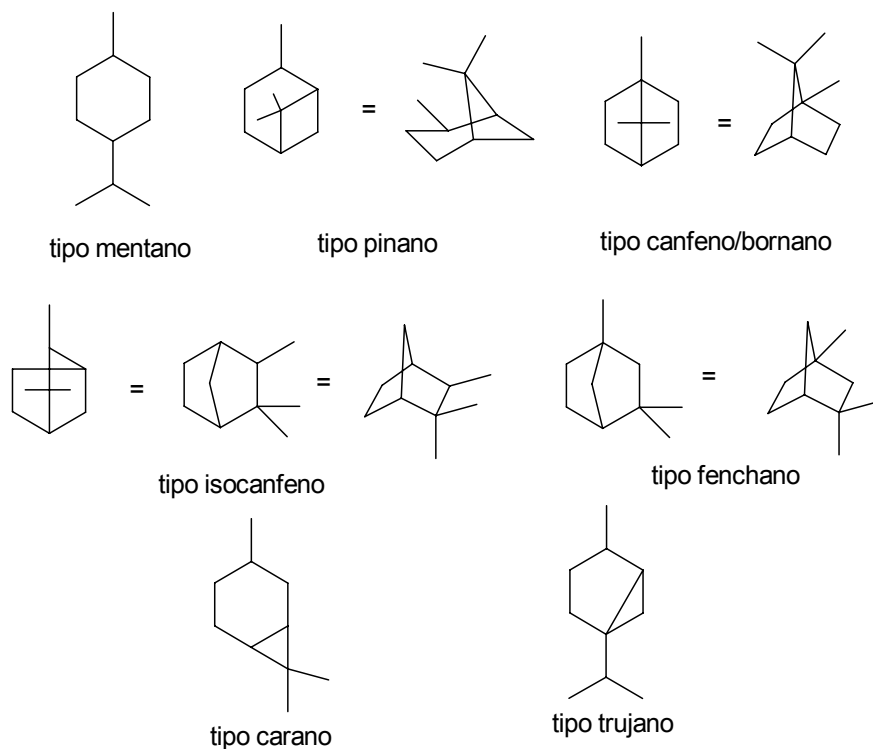


Figura 7.: Principais estruturas dos monoterpenos cíclicos

Entretanto, muitas vezes os precursores para a formação de terpenos, GPP, NPP e LPP, propiciam uma estereoquímica favorável para a formação de precursores de estruturas monocíclicas provenientes da geração de carbocátions. Estes intermediários são sintetizados a partir da atividade de enzimas específicas com habilidade para isomerizar os compostos através de um mecanismo que envolve a deslocalização de cátions alílicos oriundos do cátion OPP e posterior aproximação de elétrons π para a formação da dupla ligação (DEWICK, 1997, SCHWAB *et al.*, 2000) (**Figura 8**).

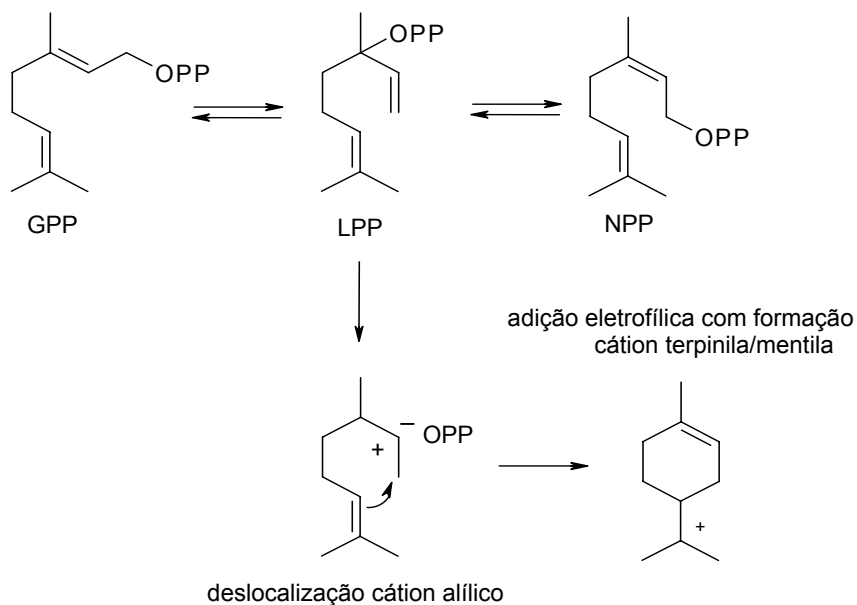


Figura 8.: Formação do cátion mentila/terpenila a partir de GPP

A ocorrência da formação de carbocátions possibilita que vários compostos sejam formados por reações que envolvem nucleófilos, ciclizações e rearranjos do tipo Wagner-Meerwein. Como por exemplo, podemos citar a adição de água ao cátion terpenila que leva à formação de α -terpineol, e posteriormente a ciclização levando a cineol, ou ainda, a perda de um próton formando o limoneno (**Figura 9.**).

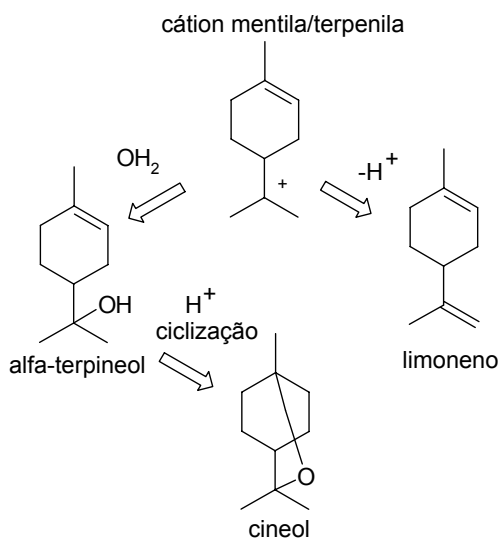


Figura 9.: Formação de α -terpineol e limoneno

Alternativamente, podem ocorrer ciclizações que produzem compostos bicíclicos através da obtenção de novos cátions, como por exemplo, pinil e bornil, levando a formação de estruturas que originam carbocátions secundários e terciários, formando compostos como borneol, canferol, pinenos, dentre outros. Podem-se ainda destacar, casos em que ocorre a migração de um próton do cátion mentil, formando carbocátions terciários levando à síntese de estruturas como sabineno e tujona (DEWICK, 1997, CANE, 1999) (**Figura 10.**).

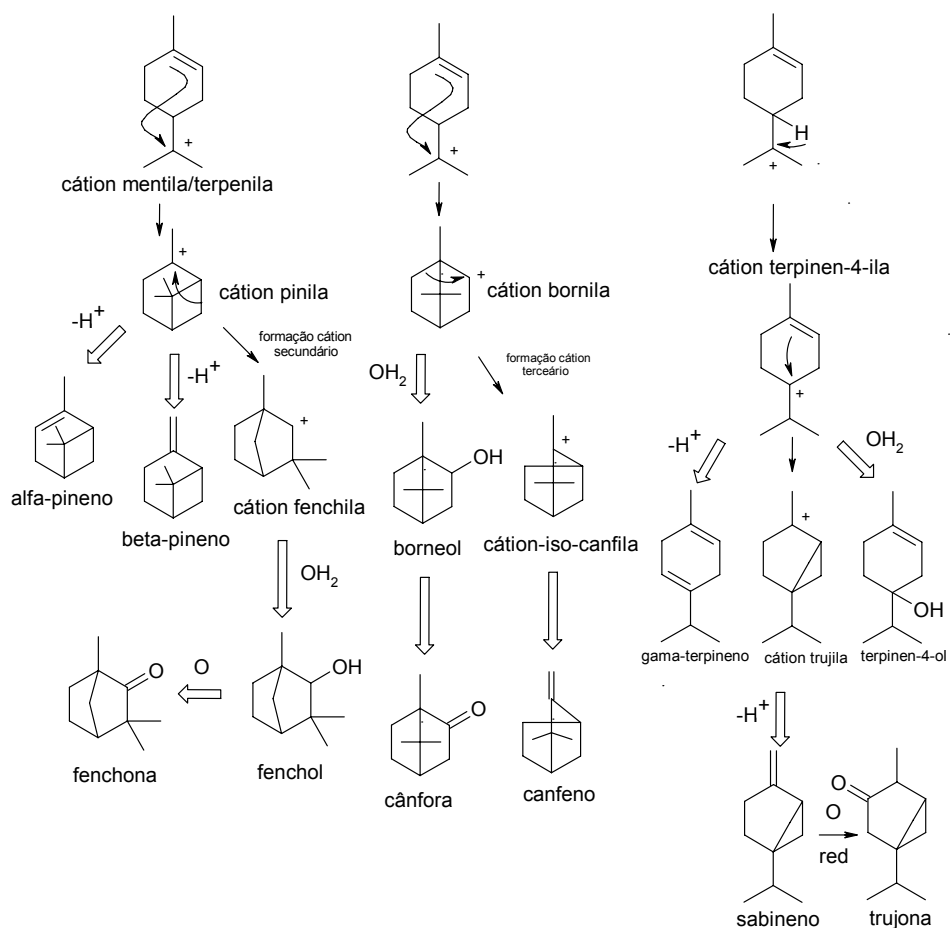


Figura 10.: Estruturas de monoterpenos derivados de cátions pinila, bornila e mentila (DEWICK, 1997)

A formação da estrutura básica dos sesquiterpenos é idêntica à observada para os monoterpenos, sendo realizada pela adição de uma unidade C5-IPP a

uma molécula de pirofosfato de geranila (GPP). Assim, ocorre inicialmente a ionização da molécula de GPP, com formação posterior de uma ligação dupla envolvendo o próton do carbono 2, formando a molécula de FPP (pirofosfato de farnesila) (**Figura 11**).

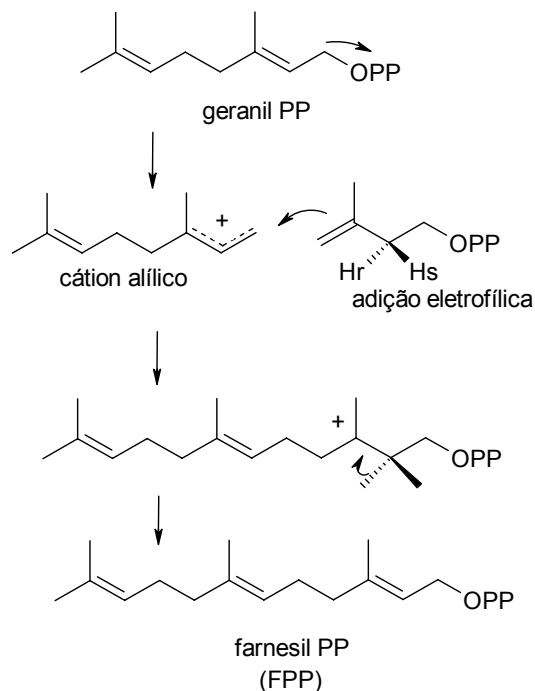


Figura 11.: Formação da unidade básica de sesquiterpenos

A partir da formação do intermediário FPP, vários sesquiterpenóides lineares e cíclicos podem ser formados. Nestas estruturas, o aumento do número de carbonos é determinante para o aumento do número de isômeros possibilitando uma grande diversidade estrutural para esta classe. No entanto, vários estudos têm evidenciado que o mecanismo de formação destas estruturas não está completamente elucidado (BULOW e KONIG, 2000), apesar do número de sesquiterpenos conhecidos ser estimado em centenas, apresentando estas estruturas variadas resultantes da diversidade de mecanismos envolvidos em sua biossíntese (LIMBERGER, 2001).

Dentre os sesquiterpenos lineares, pode-se destacar o nerolidol composto que apresenta diversas atividades, tais como repelente (WARZECHA *et al.*, 1999), antimalárico (LOPES *et al.*, 1999) e precursor de compostos com atividade antiúlcera (DEFER e DEFER, 1981). Em muitos sistemas, o cátion farnesila *E,E* e *E,Z* serve como precursor para a formação do esqueletos carbônicos que, em processos enzimático-dependentes, podem sofrer ataques eletrofílicos que possibilitam a ciclização destas estruturas através do deslocamento das duplas ligações, formando os diversos sistemas anelares observados no grupo (HARBORNE, 1989; BRUNETON, 1992; DEWICK, 1997) (**Figura 12.**).

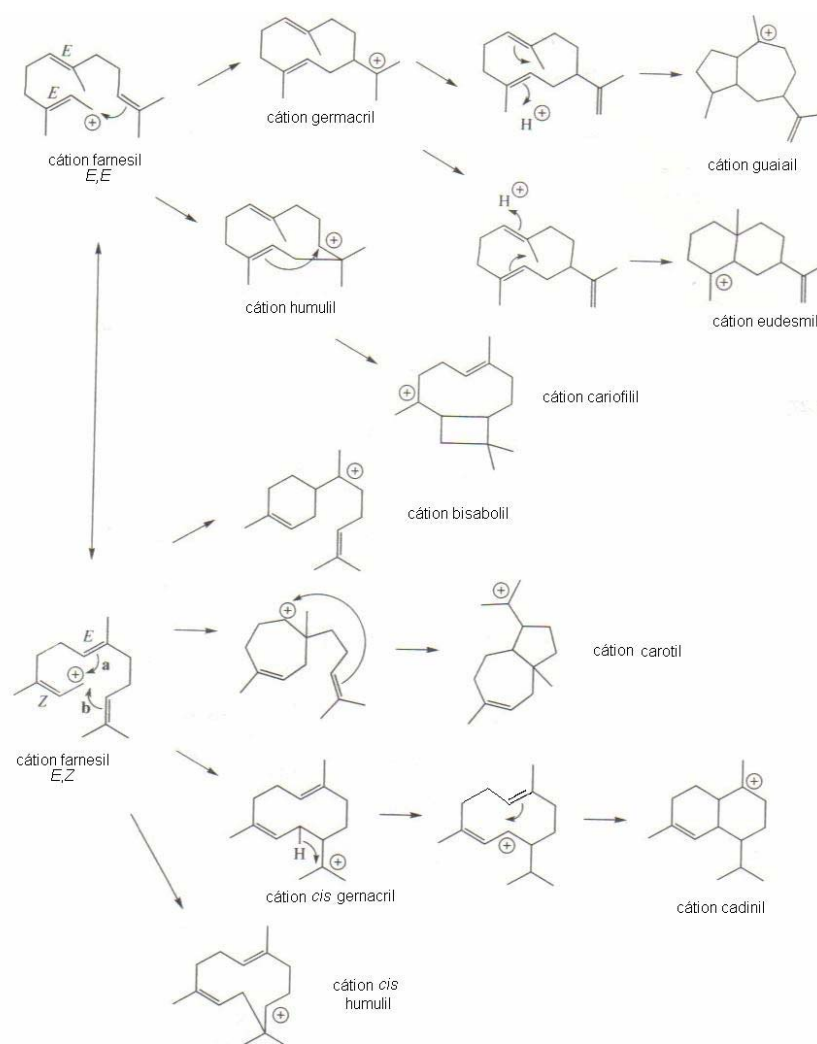


Figura 12.: Cátions Intermediários para a formação de sesquiterpenoides (DEWICK, 1997)

Alguns sesquiterpenóides, como o cátion bisabolila, merece destaque pela capacidade de formar uma vasta gama de compostos. São obtidos a partir do referido cátion, o bisaboleno e outros intermediários formados principalmente pela ciclização do esqueleto linear inicial. Estruturas com estereoquímicas diferenciadas, como por exemplo, óxido de bisabolol A e B, influenciam diretamente nas características odoríficas dos isômeros. Outro isômero de natureza sesquiterpenóide que deve ser destacado é o (-)- α -bisabolol, para o qual observa-se potente propriedade antiinflamatória, sendo este largamente utilizado em perfumaria e na composição de produtos antiacne (FROSCH, 1987; McANDREW, 1992) e antiacne (SAEKI e HARA, 1986) (**Figura 1.13.**).

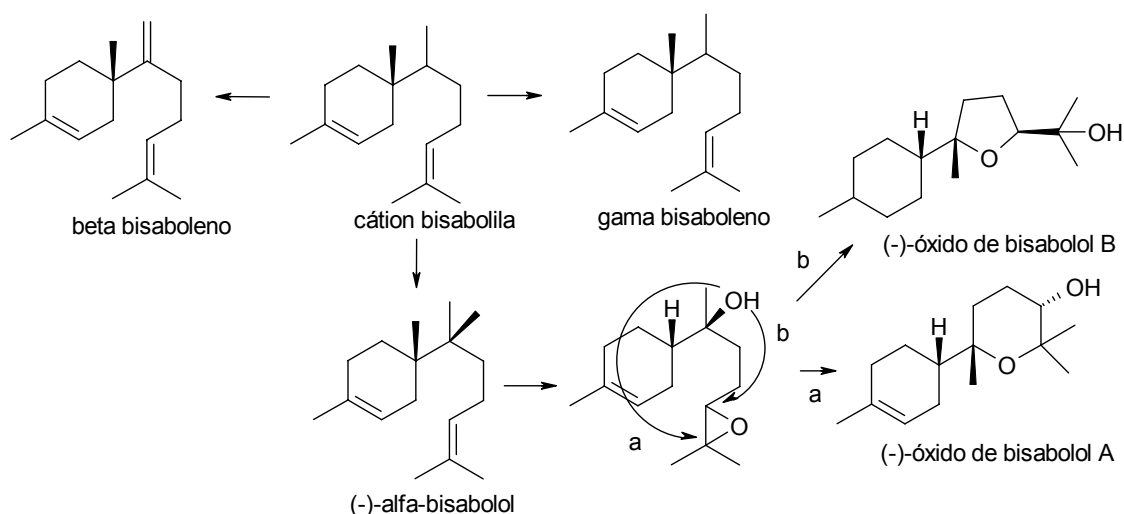


Figura 13.: Estruturas derivadas do cátion bisabolila (DEWICK, 1997).

3.4. Biotransformação

O desenvolvimento recente e quase exponencial de trabalhos com culturas *in vitro* de células vegetais pode ser atribuído às inegáveis potencialidades existentes na biotecnologia, fato já concretizado, inclusive industrialmente. São

inúmeros os processos químicos e aplicações latentes que estão por emergir, envolvendo a cultura de células e seu uso na biotransformação. (SCHULZE e WUBBOLTS, 1999; THOMAS *et al.*, 2002).

A possibilidade de transformação dos substratos adicionados aos meios de cultura destas células desperta o interesse de diversas áreas, como farmacêutica, química e de alimentos (ZAKS, 2001, RAO e RAVISHANKAR, 2002). Estas reações de biotransformação, efetuadas pelo sistema enzimático das células em cultura, são altamente específicas ao substrato, permitindo reconhecê-lo de forma régio e estereoseletiva, sendo possível a realização de reações não acessíveis por processos químicos clássicos (GIRI *et al.*, 2001).

As reações de biotransformação destacam-se pelo uso de diferentes sistemas. São comumente utilizadas suspensões de células vegetais e de microrganismos, células imobilizadas e enzimas isoladas, sendo estas técnicas fortemente empregadas para conversões específicas e complexas de substratos, representando metodologia com grande potencial para a formação de novos produtos (GIRI *et al.*, 2001). Estas reações possibilitam uma nova perspectiva para a produção de substâncias naturais em substituição aos equivalentes sintéticos, uma vez que os produtos resultantes de processos biocatalíticos podem ser adicionados aos alimentos e perfumes sem serem considerados aditivos (DEMYTTENAERE e DePOOTER, 1996; TECELÃO *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, a inclusão de etapas de biotransformação usando microrganismos ou enzimas isoladas em seqüências sintéticas propiciou um aumento significativo das sínteses realizadas em escala laboratorial. A utilização da biotransformação permitiu a introdução de reações catalisadas por enzimas com controle régio e estéreoquímico, gerando compostos opticamente puros além do desenvolvimento de rotas mais eficientes (LOUGHLIN, 2000).

Apesar de sistemas celulares oportunizarem reações de biotransformação multi-enzimáticas e o uso de cofatores e co-enzimas, estes sistemas podem ser sensíveis à desnaturação em reações que incluem fatores abióticos como pH extremo, aquecimento e solventes orgânicos. Neste caso, o uso de enzimas isoladas ou de imobilização de células vegetais é indicado por estes constituírem sistemas mais resistentes, podendo ser utilizados por longos períodos (PANDA *et al.*, 1989).

Dentre as principais técnicas podemos citar a imobilização de células vegetais ou enzimas isoladas que inclui a utilização de um sistema de aprisionamento realizado por diversas substâncias, tais como géis, através de precipitação, polimerização ou troca iônica. Além disso, o sistema enzimático pode ser imobilizado por outros suportes como polipropileno e celite, usando para isso interações dipolo-dipolo podendo, ainda, ocorrer ligações covalentes, destacando-se poliácridamida como uma matriz bastante utilizada para a imobilização (HULST e TRAMPER, 1989).

O processo de imobilização baseia-se no uso de culturas como biorreatores (SUGA e HIRATA, 1990; ZAFFAR *et al.*, 1992), onde as reações químicas são mediadas por organismos vivos (microrganismos, células animais ou vegetais) ou enzimas isoladas, em processos brandos quando comparados aos métodos sintéticos tradicionais. Este sistema apresenta grande vantagem na possibilidade de realização de reações enantio e estereosseletivas, que, em processos sintéticos, apresentam maior dificuldade (SUGA e HIRATA, 1990; IZUMISAWA, 1998). Isto ocorre porque nestes sistemas as características que regem a regioespecificidade diferem daquelas que controlam a especificidade química, permitindo a biotransformação de centros que são quimicamente pouco reativos (HANSON, 1995).

Dentre alguns exemplos da utilização de sistemas de imobilização na produção de produtos naturais de interesse farmacológico está a obtenção, com

excelente produtividade, de capsaicina e diidro-capsaicina, a partir de células imobilizadas de *Capsicum frutescens*, uma espécie de pimenta (JONHSON e RAVISHANKAR, 1996). Para os estudos envolvendo terpenóides, observa-se que o emprego de células vegetais imobilizadas representa metodologia de grande relevância para a obtenção de substâncias naturalmente pouco abundantes ou que possuam um maior valor comercial (VANEK *et al.*, 1999a). Exemplo desta utilização para a biotransformação de terpenos foi descrito em estudo desenvolvido por VANEK e colaboradores (1999a), onde células imobilizadas de *Solanum aviculaie* e *Discorea deltoideai* foram utilizadas para a produção de *cis* e *trans* carveol e carvona a partir de (-)-limoneno, utilizado como substrato.

Existem diversos metabólitos, cujo potencial uso farmacológico justifica um empenho no desenvolvimento da busca de técnicas biotecnológicas de produção, que permitem manipulações bioquímicas e genéticas de culturas para aumento de rendimento de compostos. Um exemplo é o do ácido betulínico (**Figura 14**), um triterpeno pentacíclico, cujos derivados, apresentaram potente atividade como inibidores seletivos da replicação do vírus HIV tipo 1 (MAYAUX *et al.*, 1994; EVERS *et al.* 1996; KASHIWADA *et al.*, 1996; SOLER *et al.*, 1996), como inibidores de tumores (YASUKAWA *et al.*, 1991; PISHA *et al.*, 1995), como antimaláricos (BRINGMANN *et al.*, 1997) e como agentes antiinflamatórios (RECIO *et al.*, 1995; MUKHERJEE *et al.*, 1997).

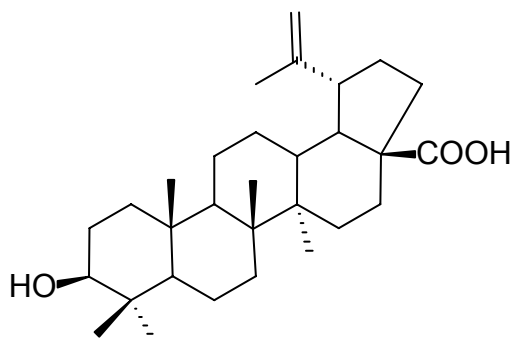


Figura 14.: Estrutura do ácido betulínico presente em *Tabernaemontana catharinensis*

3.5. Utilização de enzimas nas reações de biotransformação

As células íntegras de culturas vegetais ou microrganismos contêm enzimas com diferentes estruturas, responsáveis por catalisar diversas reações. As enzimas podem ser classificadas dentro de seis categorias principais de acordo com o tipo de reação que catalisam, conforme pode ser observado na **tabela 1**.

Tabela 1: Classificação das enzimas utilizadas em reações de biocatálise

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

Fonte: Faber:2000

A maioria dos processos de biotransformação utilizados em síntese orgânica é realizada através do uso de enzimas da classe das hidrolases, embora também devam ser destacadas enzimas do tipo oxidoredutases, transferases, isomerases e ligases. A ampla variedade da catálise enzimática proporciona reações equivalentes aos processos de síntese orgânica, incluindo reações de hidrólises de ésteres (BOLAND *et al.*, 1991), lactonas (GUTMAN *et al.*, 1990), lactamas (TAYLOR *et al.*, 1990), epóxidos (LEAK *et al.*, 1992); oxidação-redução de alquenos (MAY, 1979), alcoóis (LEMIERE *et al.*, 1985), sulfóxidos e sulfitos (PHILLIPS e MAY, 1981); adição e eliminação de água (FINDEIS e WHITESIDES, 1987), amônia (AKHTAR *et al.*, 1989); hidrogenação-desalogenação (NEIDLEMAN e GEIGERT, 1983) e reações de Diels-Alder (OIKAWA *et al.*, 1998).

As vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica incluem diversos fatores tais como: (i) a eficiência catalítica das enzimas que aceleram as rotas enzimáticas quando comparada com a catálise química (MENGER, 1979); (ii) a ação enzimática sob condições brandas de operação tais como temperatura; (iii) o processo é adequado à reação de interesse, pois determinadas enzimas podem não ativar sítios dos substratos; (iv) a seletividade envolvendo a regioespecificidade e a enantioseletividade quando enzimas realizam catálises quirais (SWEERS e WONG, 1986; SIH e WU 1989); (v) a não restrição do substrato pelo sistema enzimático (pois a enzima deve ser específica para o tipo de reação) e; (vi) se o trabalho pode ser realizado em meio aquoso (embora muitas reações possam operar em solventes orgânicos) (KLIBANOV, 1990).

Desvantagens do uso de enzimas em síntese também são observadas, principalmente no caso de aminoácidos que demonstram a impossibilidade de resolução quiral para estas reações. No entanto, com o isolamento de novas enzimas e o progresso de modernas técnicas de biologia molecular, poderão ser

desenvolvidos métodos para a modificação de enzimas de uso específico neste tipo de substrato (LOUGHLIN, 2000).

3.5.1. Biotransformação utilizando reações de hidrólise

As principais reações de biotransformações relatadas para enzimas hidrolíticas envolvem compostos como ésteres e amidas que usam basicamente proteases, esterases ou lipases. Outras aplicações importantes demonstram a formação e/ou clivagem de epóxidos, nitrilas e ésteres e, ainda, recentes estudos relatam a importância de reações de biotransformação envolvendo condensação e hidrólise (LOUGHLIN, 2000).

A quimioseletividade na hidrólise de ésteres é a chave para a seqüência sintética de muitos processos, tendo sido demonstrado que a hidrólise de trietil citrato por proteases (CHÊNEVERT *et al.*, 1998) e a hidrólise de malonatos por esterases (SANO *et al.*, 1998) levam a excelentes excessos enantioméricos, bem como em reações enzimáticas hidrolíticas em amidas com formação de compostos quirais considerados de grande importância.

Algumas aplicações de hidrolases em reações com epóxidos têm sido relatadas. As chamadas epóxido hidrolases aparecem em uma grande variedade de microrganismos preferencialmente realizando hidrólises, como em epoxioctanos, com formação do respectivo diol em excelente excesso enantiomérico (BOTES *et al.*, 1998). Entretanto, novas metodologias possibilitam a reação de epóxidos utilizando epóxido hidrolases de *Aspergillus niger* e *Syncephalastrum racemosum*, verificando-se alta pureza enantiomérica para o produto resultante (**Figura 15**) (MOUSSOU *et al.*, 1998).

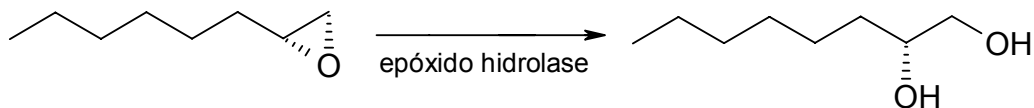


Figura 15.: Reação de epóxidos utilizando epóxido hidrolases

A resolução de enantiômeros através de biotransformações hidrolíticas é de grande significância, principalmente em estratégias de inversão realizadas “*in situ*” e utilizando um substrato racêmico, as quais possibilitam resoluções de até 50% para cada enantiômero. Exemplos são descritos através do potencial enzimático de *Pseudomonas aeruginosa* usadas para a resolução enantiomérica para formar cianoidrinas (**Figura 16**) (SAKAI *et al.*, 1998b).

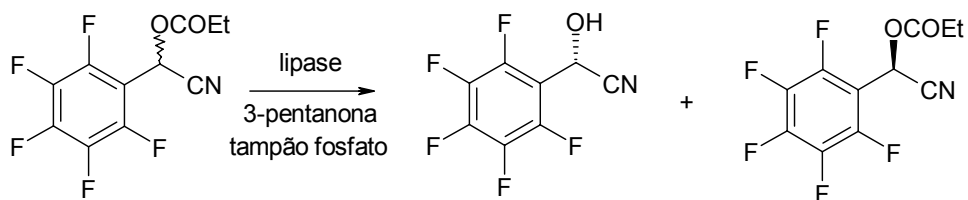


Figura 16: Resolução enantiomérica para formar cianoidrinas

Exemplos de resoluções quirais mediadas por enzimas e amplamente utilizadas para aumentar o excesso enantiomérico de determinados produtos são estudos envolvendo o emprego de proteases alcalinas para obtenção de aminoácidos piperidínicos em rendimento aumentado em cerca de 30% (**Figura 17**) (KISE e BOWLER, 1998).

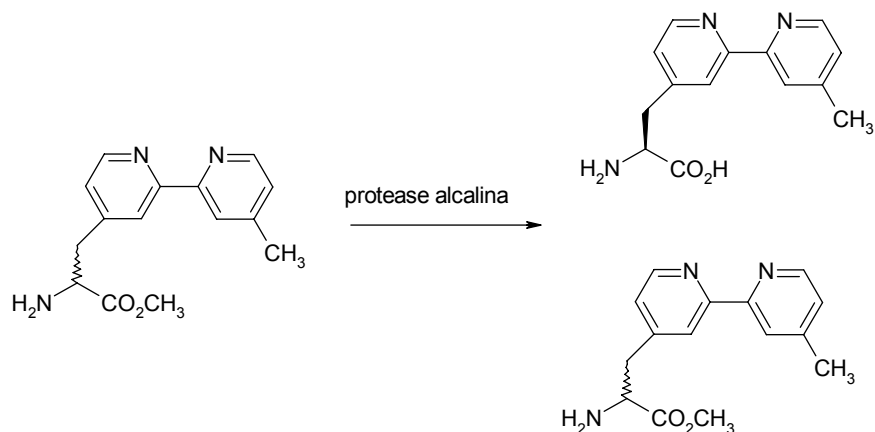


Figura 17.: Resolução quiral de aminoácidos piperidínicos com proteases

As transformações hidrolíticas também envolvem sínteses com condensações de ésteres e amidas. A síntese de ésteres usando enzimas em sistemas de solventes tem sido bastante explorada, podendo ser citada como exemplo desta metodologia, a utilização de lipases alcalinas presentes em *Bacillus* sp., para a conversão de ácido oléico em oleato de metila (NAWANI *et al.*, 1998). Outros métodos utilizam a enantiosseletividade de lipases de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas cepacia* para a obtenção de alcoóis primários e secundários, em reações de esterificação realizadas a baixas temperaturas (SAKAI *et al.*, 1998a).

Outras aplicações de enzimas hidrolíticas incluem a formação de fosfatos. Observa-se para muitas enzimas, potencialidade para a introdução de fosfatos em reações de bifosforilação que representam eficientes alternativas para as diversas etapas e seqüências que envolvem a síntese química destes produtos. Como exemplo, pode-se citar a fosforilação regioseletiva de fosfofrutose com formação de análogos de frutose bi-fosfatadas (FUKUSIMA *et al.*, 1998).

A síntese de polímeros utilizando hidrolases também vem sendo estudada. Nestas reações, que utilizam lípases presentes em cepas de *Pseudomonas* sp.,

estruturas de alto peso molecular são obtidas a partir da ação enzimática na condensação de unidades do tipo hidroxíésteres (DONG *et al.*, 1998).

3.5.2. Biotransformação utilizando reações de redução

Desidrogenases têm sido extensivamente utilizadas na redução de grupos carbonila de aldeídos e cetonas, assim como na redução de ligações duplas carbono-carbono. A importância do uso destas enzimas, atuando em mecanismos variados, está na possibilidade de formação de produtos quirais e redução assimétrica de compostos carbonilados, como acontece para a ação das redutases NADPH-dependentes, encontradas em fermento de pão, para as quais verifica-se habilidade para produção de alcoóis com alto excesso enantiomérico (>98%), a partir da redução de determinados compostos carbonilados (EMA *et al.*, 1998).

Outro exemplo do uso de redutases é a utilização destas enzimas na redução de estruturas do tipo β -ceto-ésteres levando à formação, com excelente estereosseletividade, dos correspondentes hidróxi-ésteres, conforme a **figura 18** (KAWAI *et al.*, 1998b). A utilização destas enzimas, também representa alternativa para a redução de cetonas aromáticas e cetonas alifáticas simples, com formação dos respectivos alcoóis, obtidos em rendimentos satisfatórios, em processo altamente seletivo. Essa metodologia, a qual envolve células de *Geotrichum candidum*, proporciona uma reatividade e seletividade superior quando se utilizam células isoladas, sendo conveniente para a obtenção de alcoóis com pureza enantiomérica em grande escala (NAKAMURA e MATZUDA, 1998).

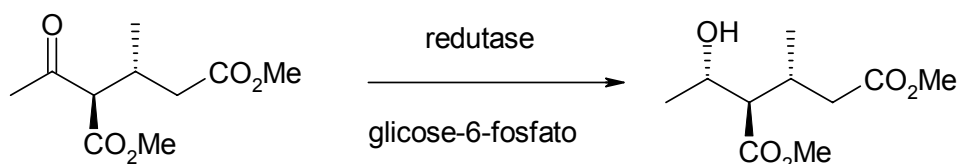
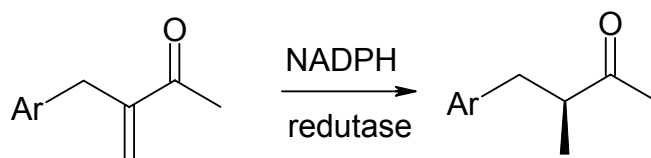


Figura 18.: Redução de β -ceto-ésteres com redutase

A reação com outros grupos funcionais inclui a redução de ligações duplas carbono-carbono através de redutases isoladas de *Saccharomyces cerevisiae*, fermento de pão, possibilitando reações seletivas com cetonas α,β insaturadas, conforme **figura 19** (KAWAI *et al.*, 1998a).

**Figura 19.:** Redução de cetonas α,β insaturadas com redutases isoladas de fermento**3.5.3. Biotransformação utilizando reações de oxidação**

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

Dentre as muitas vantagens do uso destas enzimas, podem ser incluídas a estereoseletividade, regioseletividade, aumento da funcionalização e a introdução de quiralidade. A efetividade destas reações pode ser atribuída, particularmente,

ao alto poder oxidante, através de reações químicas com formação de produtos muito estáveis. Hidroxi e oxi compostos são importantes exemplos utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola, além de potencializar reações biológicas que podem promover alternativas químicas para muitas rotas biossintéticas (SCHUTZE *et al.*, 1999; DUETZ, 2001; BOYD 2001, CIRINO e ARNOLD, 2002).

Em sistemas vivos, enzimas oxidativas podem atuar tanto em rotas que envolvem metabolismo primário quanto secundário. Muitas bactérias utilizam hidrocarbonetos aromáticos como única fonte de carbono (metabolismo primário) através de atividade de mono e dioxigenases, enquanto que outras enzimas estão envolvidas na produção de metabólitos secundários com maior complexidade estrutural, o que em muitos casos torna necessária a utilização de cofatores em bioprocessos envolvendo enzimas oxidativas (HOLLAND, 1992).

Várias enzimas oxidantes são conhecidas e suas diferentes atividades fazem com que sejam classificadas de acordo com as reações químicas que são capazes de realizar em um sistema específico. As enzimas oxidativas podem ser subdivididas em oxigenases, oxidases e peroxidases, onde o átomo de oxigênio atua como doador de elétrons, característica que as distingue das diidroxigenases, as quais não envolvem o oxigênio como intermediário (SILVERMAN, 2000) (**Figura 20**).

As oxidases e peroxidases reagem com o oxigênio tendo como resultado reações que podem não ser específicas, podendo, no entanto, propiciarem a produção de diferentes compostos. As oxigenases introduzem um ou dois átomos de oxigênio em seus substratos e muitas vezes são mais seletivas que oxidases e peroxidases, particularmente em termos de regioespecificidade (BURTON, 2003).

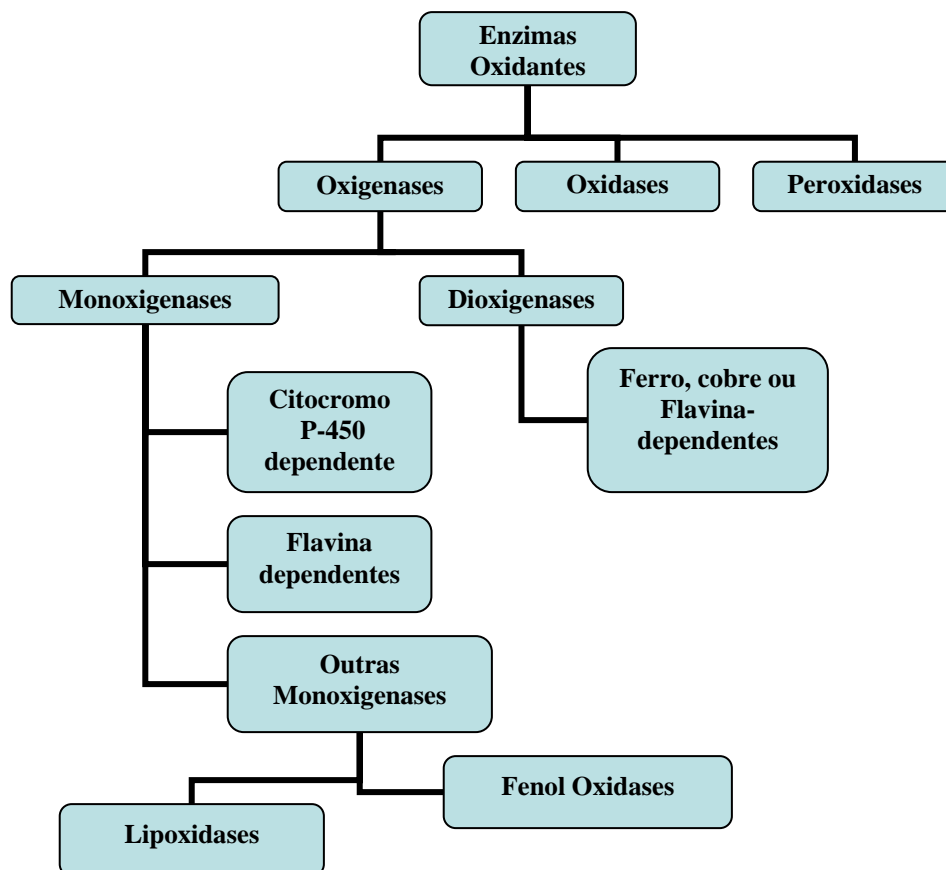


Figura 20.: Tipos de enzimas com características oxidantes

3.5.3.1. Monoxigenases

As monoxigenases realizam a catálise através da introdução de um átomo de oxigênio geralmente utilizando NADH e NADPH que, através de seu potencial redutor, promovem a supressão dos elétrons do substrato realizando sua oxidação. Muitos sistemas usados em biotransformação são citocromo P-450 dependentes, envolvendo primeiramente a ativação do complexo oxigenado por metais, geralmente ferro (III), levando à redução de um elétron. A adição de um segundo elétron resulta na formação de H₂O e na adição da molécula de oxigênio

ao substrato. No caso de sistemas flavina-dependentes, estes reagem com o substrato formando intermediários, produzindo água e, após, em um segundo passo, é requerido um cofator para regenerar o complexo enzimático (BURTON, 2003).

Outros complexos necessitam de ativantes diversos, sendo estes separados em outros grupos e envolvendo novos sistemas que incluem a utilização de oxidases, flavina-molibdênio, cobalto-dependentes e aldeído oxidases (FETZNER, 2000).

Importantes reações biocatalíticas são realizadas em engenharia genética através do uso de monoxigenases de *Pseudomonas putida* (BUHLER, 2002). Sistemas similares, utilizados em reações regioseletivas, utilizam monoxigenases flavina-dependentes isoladas de *Pseudomonas azelaica* (SUSKE, 1997).

Muitas bactérias apresentam-se como sistemas enzimáticos citocromo P-450 dependentes, onde as reações podem ser catalisadas por NADH, possibilitando a oxidação de diversos substratos tais como arenos, núcleos poliaromáticos e terpenos (FRUETEL, 1994). Neste sentido, são relatadas epoxidações de alquenos terminais e de estireno por monoxigenases de *Pseudomonas putida* (PANKE, 1999), além de oxidações enantioseletivas de sulfóxidos, levando a reações com rendimentos satisfatórios (HOLLAND, 1999).

De particular importância destacam-se esteróides hidroxilases, largamente utilizadas em reações de biocatálise realizadas por bactérias e fungos, em etapas de rotas sintéticas, como por exemplo, em hidroxilações específicas de esteróides, terpenos e compostos benzílicos (HOLLAND, 1992; HOLLAND e WEBER, 2000).

Reações similares têm sido relatadas, como as hidroxilações de derivados do tipo dieno por cepas de *Cunninghamella elegans* (SUN, 2001) e reações

envolvendo adição em dienos conjugados, com a obtenção de compostos mais complexos (BOUGIONKON e SMOUNOU, 2002) (**Figura 21**).

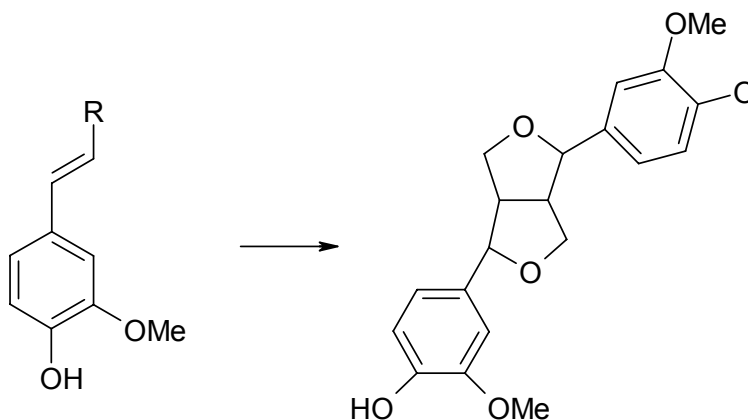


Figura 21.: Reação de hidroxilação utilizando peroxidase

As monoxigenases NADPH dependentes foram as primeiras enzimas relatadas na catálise de reações do tipo Bayer-Villinger, sendo esta oxidação de significativo interesse na síntese química (FANG, 1995) (**Figura 22**). Este grupo enzimático destaca-se também na formação de hidroxibenzaldeídos, a partir de reações de substituição em compostos fenólicos (VAN DEN HEUVEL, 2001).

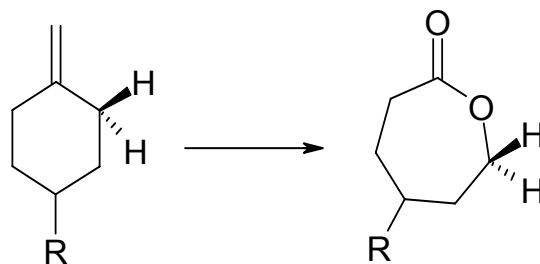


Figura 22.: Oxidação do tipo Bayer-Villinger utilizando monoxigenases.

3.5.3.2. Dioxigenases

As dioxigenases incorporam dois átomos de oxigênio aos substratos e compreendem dois grandes sistemas: ferro-sulfúrico dioxigenases, chamados heme-dependentes e ferro-sulfúricos, chamados Rieske. Estas reações incluem dihidroxilações com clivagem de anéis aromáticos de substratos com arenos e carboxilatos (WACKETT, 2002), além de incorporar grupos hidroxila a anéis aromáticos gerando dióis que podem ser posteriormente oxidados para a formação de novos produtos (HOLLAND, 1992).

As reações de dihidroxilação de arenos possibilitam uma grande variedade de reações, uma vez que é possível obter produtos com substituintes em posições diferentes gerando vários substratos, sendo este tipo de reação importante para a formação de prostaglandinas e agentes hipotensivos (BOYD, 2001).

Como exemplos podemos citar os estudos desenvolvidos por DELUCA e HUDLICKY (1990) e FANG (1995), os quais relatam o uso de reações com arenos e dienos conjugados formando estruturas do tipo dióis em rendimentos satisfatórios. Além destes, destaca-se a produção de compostos dihidroxilados, a partir da utilização de dienos conjugados (**Figura 23**) como substratos para culturas de *Caldariomyces fumago*, em trabalho desenvolvido por SANFILIPINO e NICOLOSI (2002).

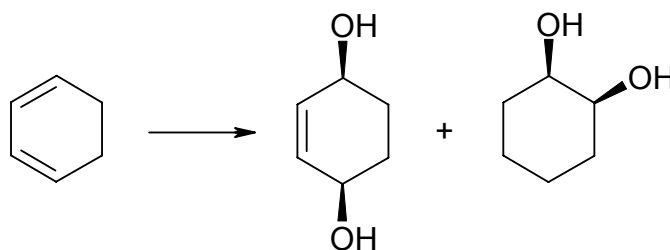


Figura 23: Hidroxilação utilizando enzimas de *Caldariomyces fumago*

3.5.3.3. Peroxidases

As peroxidases são encontradas em plantas, animais e células microbianas. Estas enzimas, não seletivas quando ocorrem via mecanismo de radicais livres, utilizam peróxido de hidrogênio como elétron acceptor sendo que estas reações ocorrem na maioria das vezes catalisadas por metais como magnésio, vanádio, sendo estes regenerados (BURTON, 2003).

As halo-peroxidases são consideradas como as primeiras enzimas isoladas de organismos marinhos, além de demonstrarem melhor capacidade para halogenação de substratos em presença de haletos e peróxido de hidrogênio (COLONNA, 1999). Estas enzimas atuam através de diferentes mecanismos, com sistemas que normalmente utilizam vanádio e outros metais livres (LITTCHILD, 1999), catalisando reações que incluem sulfoxidação, epoxidação e hidroxilações aromáticas (**Figura 1.24.**).

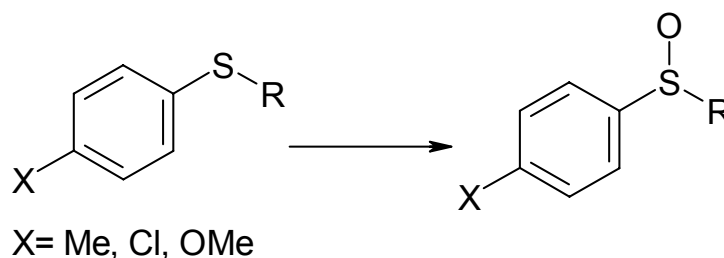


Figura 24.: Reação com composto aromático catalisado por peroxidases

Peroxidases podem catalisar um grande número de reações que incluem oxidação de hetero-átomos, epoxidações de peróxidos (ADAM, 1999; VAN DER VELDE, 2001), sendo que a maioria dos compostos aromáticos formados, mostram-se estáveis, como por exemplo, os produtos provenientes de reações de oxidação utilizando enzimas peroxidases de *Caprinus* spp. (RUSS, 2002).

As peroxidases microbianas e as obtidas de fungos (particularmente lignanas peroxidases e peroxidases manganês dependentes) são também destacadas pelo seu alto poder redox, sendo aquelas obtidas de fungos, mais vantajosas por serem produzidas de forma extracelular até o esgotamento das lignanas (usadas como fonte para a produção). No entanto, a instabilidade de muitas peroxidases constitui uma desvantagem quanto à sua aplicação industrial (BURTON, 2003).

Muitas das aplicações das peroxidases em biocatálise resultam na formação de ligações carbono-carbono - como na produção de estruturas poliméricas e polifenóis - (UYAMA, 2002), muito embora muitas destas reações tenham um difícil controle regioseletivo, como acontece nas reações de peroxidases utilizadas para sintetizar *orto*-poli-anilinas (LIM e YOO, 2000). Muitas cloroperoxidases isoladas de fungos marinhos como *Caldariomyces fumago* mostraram grande versatilidade catalítica com excelentes excessos enantioméricos para vários tipos de compostos (COLONNA, 1999).

Além disso, a promissora utilização de peroxidases é comprovada por estudos recentes envolvendo novas enzimas extraídas de algas e fungos, as quais têm apresentado considerável estabilidade quando na presença de diferentes solventes (ALMEIDA, 2001; VAN DER VELDE, 2001).

3.5.3.4. Oxidases

O potencial biocatalítico de oxidases é relatado em um grande número estudos, sendo estas enzimas destacadas por suas vantagens quanto à utilização em uma vasta gama de substratos, mesmo quando em meio orgânico, não requerendo o uso de cofatores. Entretanto, a formação de alguns subprodutos, pode levar à inativação do complexo enzimático, sendo esta a principal desvantagem da utilização de enzimas deste grupo. Este efeito, no entanto, pode ser reduzido através do controle das condições reacionais. Em reações que

utilizam catecol como substrato são utilizadas polifenol oxidases que podem catalisar reações de polimerização em rotas para a produção de polímeros polifenólicos evitando a formação de subprodutos indesejáveis (BOSHOFF, 2003).

Os produtos gerados por fenol oxidases produzem moléculas antioxidantes que apresentam potencial para aplicação como aditivos em alimentos e na indústria de fármacos. Exemplos disso são flavonóides, metabólitos secundários encontrados em várias qualidades de frutas, para os quais observa-se um maior potencial antioxidante para os derivados hidroxilados (RIDGEWAY, 1997).

Reações de oxidações em carboidratos também são de grande interesse para a indústria farmacêutica. Enzimas do tipo piranose oxidases, isoladas de bactérias e fungos, são utilizadas principalmente sobre derivados cetônicos de carboidratos, em reações de síntese de glicosídeos, sendo observado nestes processos um alto índice de conversão de produtos, o que demonstra a seletividade e especificidade enzimática (GIFFHORN, 2000).

Outras enzimas, como lacases, são altamente estáveis e facilmente obtidas de sistemas fúngicos. As reações destas enzimas incluem modificações em alquenos, compostos fenólicos, aminofenóis, aril aminas, polifenóis e ligninas (BURTON, 2003), sendo necessária utilização de mediadores em algumas destas reações, geralmente naquelas onde polifenóis e ligninas servem de substrato (RODAKIEWICZ-NOWAK, 2000).

3.6. Reações enzimáticas em meio aquoso

Nas últimas décadas, a extraordinária seletividade de substratos (incluindo quimio, régio e enantio-especificidade), passou a ser intensamente explorada. A capacidade de determinadas enzimas em catalisar reações em meio aquoso, em condições moderadas de temperatura e de pressão, reduz a possibilidade de danos a analítos termossensíveis e minimizam os efeitos de corrosão em alguns

processos químicos. Em contrapartida, a aplicação eficaz de enzimas tem sido restrita a uma série de limitações, particularmente aquelas referentes à sua estabilidade operacional (essencial para o uso por longos períodos ou para procedimentos automatizados).

Para eliminar esses efeitos desfavoráveis, algumas estratégias têm sido investigadas. A mais antiga é a via sintética, a qual utiliza técnicas de química orgânica, buscando a síntese de catalisadores com atividades similares às aquelas observadas para as enzimas. Técnicas de engenharia de proteínas podem promover a formação de ligações intramoleculares estrategicamente posicionadas, a modificação de polaridade ou, ainda, a alteração de densidade de carga na superfície da proteína, produzindo biocatalisadores robustos capazes de manter a atividade catalítica mesmo em condições pouco favoráveis (LIMA e AGNES, 1999).

Outra abordagem tem sido a utilização de procedimentos para a imobilização das enzimas, preferencialmente através de ligações covalentes com um ou mais pontos de ligação. Neste caso, ligações múltiplas originam preparações mais estáveis, porém com menor flexibilidade espacial das enzimas, o que acarreta em um decréscimo de atividade (LIMA e AGNES, 1999).

Estes métodos de imobilização estão disseminados tanto em aplicações industriais como em sistemas de análise. Contudo, os procedimentos utilizados para imobilização são bastante demorados, com limitações difusionais e ainda custos adicionais. Como principais vantagens destacam-se a reutilização de enzimas, a facilidade de separação e a reprodutibilidade do procedimento.

Finalmente, uma outra possibilidade para reduzir as limitações da estabilidade, é o emprego direto das enzimas naturais, seja através de enzimas isoladas ou sistemas enzimáticos de organismos que são bastante estáveis sendo este, até o momento, um dos principais métodos para a obtenção de substâncias

novas em reações realizadas em meios aquosos. Com respeito às restrições de solubilidade do analito, os recursos mais utilizados são a adição de um solvente miscível ou de um surfactante no meio onde ocorre a reação, podendo isto, no entanto, acarretar diminuição da atividade enzimática (LIMA e AGNES, 1999).

3.7. Culturas de Células Vegetais

Culturas de células vegetais são capazes de produzir metabólitos secundários através de diversas técnicas. A utilização de células não diferenciadas obtidas de calos ou suspensões celulares encontra-se relatada em diversos estudos, como o desenvolvido por ZENK e colaboradores (1975), onde culturas de células de *Morinda citrifolia* foram empregadas para a produção de antraquinonas. Trabalhos como estes abriram uma perspectiva para extensos trabalhos com o uso de culturas vegetais *in vitro* na busca da produção de metabólitos secundários de interesse industrial.

Muitos programas de pesquisa que visam uma maior produção de metabólitos têm seu ponto de origem na farmacognosia e na busca de novas fontes naturais, principalmente vegetais, de princípios ativos farmacologicamente promissores. Assim, a partir dos extratos vegetais, os compostos de interesse são identificados, executando-se logo a seguir, a seleção dos indivíduos com melhor genótipo (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Após a localização dos indivíduos promissores, são estabelecidas culturas *in vitro* de calos, buscando a melhor adaptação ao meio. Estes calos, mantidos através de subculturas cíclicas, podem necessitar de semanas ou até mesmo de anos para atingir a estabilidade genética (BOURGAUD *et al.*, 2001). Assim que a cultura atinge esta estabilidade, tornam-se necessárias novas investigações para determinar a eficiência de produção de metabólitos. Culturas de suspensões celulares são obtidas a partir de calos, tornando-se possível uma melhor avaliação das rotas biossintéticas, além de possibilitar a adição de elicitores e o controle de

fatores abióticos como pH, temperatura e luz ultravioleta, itens que podem influenciar positivamente a produção dos metabólitos de interesse (YEOMAN, 1985).

Os estudos com biorreatores representam o final do processo e a avaliação da possibilidade da produção comercial de metabólitos secundários. Este é um importante passo para a solução dos problemas observados quando se utilizam sistemas em pequena escala, como por exemplo, o uso de um grande número de frascos de Erlenmeyer. Neste caso, o crescimento é modificado, as células são cultivadas em reatores para a produção de biomassa, o que diminui as limitações principalmente quanto ao teor de oxigênio (HULST *et al.*, 1985) e de nutrientes (JONES *et al.*, 1981).

Após a otimização da produção de biomassa em biorreatores, a cultura é adaptada para que se obtenha produção em bons rendimentos, sendo possível para tanto, o uso de processos semicontínuos ou de fermentadores contínuos. Basicamente, a escolha do processo é determinada pela quantidade de biomassa utilizada para a obtenção dos produtos, bem como pela possibilidade do produto ser excretado ou não para o meio de cultura. Muitas vezes o processo desenvolve-se em duas etapas, sendo a primeira referente à produção de biomassa utilizando um biorreator e a segunda relacionada à produção dos metabólitos, utilizando um segundo reator (PAYNE *et al.*, 1991a).

Em muitos casos, a produção de metabólitos ocorre de forma intracelular, sendo necessário o rompimento e extravasamento da biomassa para a retirada dos produtos com a utilização de solvente adequado. Diferentemente disso, quando a produção é extracelular os produtos de interesse são retirados diretamente do meio aquoso por processo de partição (PAYNE *et al.*, 1991b).

A produção de uma grande quantidade de produtos obtidos de plantas, através de culturas celulares utilizando biorreatores, tem sido investigada em

diversos trabalhos. Dentre estes, pode ser destacado como um dos primeiros estudos desenvolvidos em escala industrial com biorreatores, a pesquisa desenvolvida por TABATA e FUGITS (1985), além de trabalhos envolvendo culturas de *Panax ginseng* em larga escala (HIBINO e USHIYAMA, 1999). O desenvolvimento destes processos também possibilitou a produção de compostos como alcalóides indólicos (MORENO, 1994) e tropânicos (OSKMAN-CALDENTY e ARROO, 2000), dentre outros.

3.7.1. Aplicações de células vegetais em biotransformação

Em reações de biocatálise com terpenos, as culturas de células têm demonstrado sua importância na produção de substâncias de interesse comercial e farmacológico. A habilidade das culturas celulares em transformar monoterpenos pode ser demonstrada pela utilização de *Catharanthus roseus* em reações de hidroxilação regioseletiva na posição alílica de geraniol, nerol e carvona com formação de vasta gama de produtos hidroxilados (HAMADA *et al.*, 1997; LINDMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2004).

Uma alternativa altamente viável como fonte potencial de moléculas orgânicas é constituída por culturas de células vegetais, não só como material de partida para a síntese orgânica, como também para a produção de moléculas complexas. Essencialmente, reações com células vegetais envolvem a síntese multienzimática de metabólitos secundários, os quais são comercialmente valiosos. Tal alternativa para a produção destes compostos tem sido explorada (TABATA e FUGITS, 1985), demonstrando a capacidade em produzir inúmeras micromoléculas (ZENK, 1978; STABA, 1981; BROWEN, 1985; ELLIS, 1988; FURUYA, 1988), além de se constituir em uma ferramenta importante na regulação de metabólitos de interesse.

Diversas espécies vegetais têm sido cultivadas *in vitro* no mundo inteiro, e o número de substâncias passíveis de serem bioconvertidas por culturas de células

é praticamente ilimitado (STAFFORD e GRAHAM, 1991), devido a sua complexidade enzimática.

Muitos estudos relacionados com terpenos são realizados utilizando células vegetais para avaliação e comparação de sistemas vegetais distintos. Desta forma, o monoterpeneo limoneno foi utilizado como substrato em reações com culturas de *Solanum aviculare* e *Dioscorea deltoidea*, com formação de *cis* e *trans* carveol e carvona como principais produtos, sendo observadas, no entanto, diferenças quanto à conversão dos produtos formados (VANEK *et al.*, 1999a, VANEK *et al.*, 1999b).

Atualmente, reações com terpenos têm sido apresentadas em inúmeros estudos, sendo estes metabólitos, alvo de interesse crescente. Como exemplo de destacado componente deste grupo pode-se citar o limoneno, utilizado como produto de partida em diversas reações de biotransformação, utilizando-se os mais variados sistemas enzimáticos, sendo possível a formação de diferentes compostos (LINDMARK-HENRIKSSON, 2004), como representado na **Figura 25**.

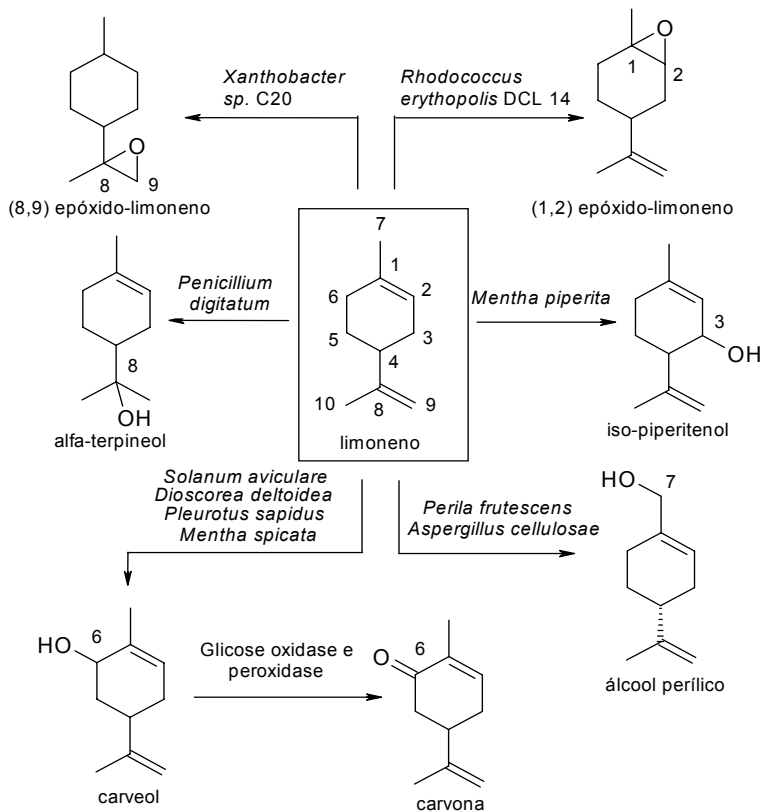


Figura 25.: Produtos de biotransformação de limoneno com organismos e enzimas.

O limoneno também foi estudado quanto à sua utilização como substrato em reações de biotransformação, tendo em vista o interesse em hidroxilações que resultem em compostos terpênicos. Muitos microrganismos são descritos como viáveis para a transformação de limoneno em carveol e carvona (DHAVALIKAR e BHATTACHARYA, 1966; TAKAGI *et al.*, 1972; BOWEN, 1975; RHODES e WINSKILL, 1985), mas a quantidade obtida nestes processos é insuficiente para aplicações industriais buscando-se, desta forma, estudos para otimizar reações utilizando (*R*)-(+)-limoneno na produção de (+)-carveol e (+)-carvona, através de sistemas enzimáticos de *Pleurotus sapidus* (ONKEN e BERGER, 1999).

Além disso, reações com culturas celulares de *Picea abies*, utilizando β -pineno como substrato, levaram à formação de uma vasta gama de compostos

tendo como produto principal o *trans*-pinocarveol, com alta taxa de conversão (Figura 26) (LINDMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2004).

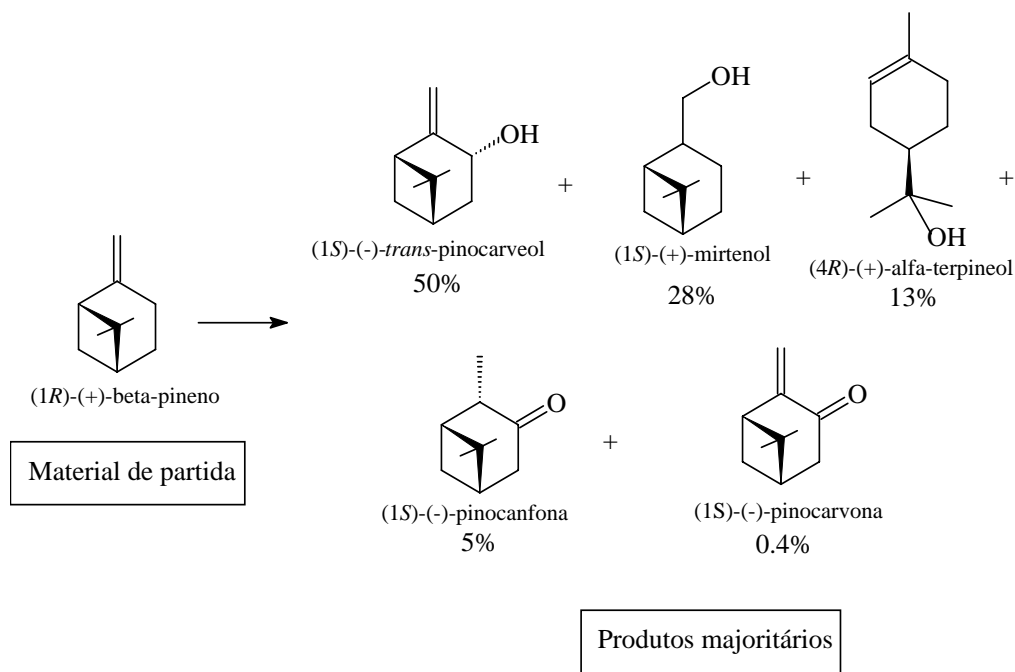


Figura 26.: Produtos de biotransformação de β -pineno com *Picea abies*

Muitos compostos, como a vanilina, são obtidos de *Vanilla planifolia*, sendo utilizados, principalmente, na indústria como flavorizantes (RONADIVE, 1994). Muitos outros compostos como eugenol e isoeugenol são utilizados como material de partida para a produção de vanilina (HOPP, 1993) e estudos de biotransformação de isoeugenol e eugenol têm sido realizados para a obtenção de vanilina utilizando culturas de células imobilizadas de *Capsicum frutescens* (RAO, 1999).

Estudos realizados com microrganismos e fungos mostraram a potencialidade destes sistemas na redução de canfoquinonas (PFRUNDER e TAMN, 1969; CHENEVERT e THIBOUTOT, 1988; REBOLLEDO *et al.*, 1999) e, em alguns casos, possibilitaram reações estereosseletivas com estes compostos (MIYAZAWA *et al.*, 1995a). As culturas de células de *Catharanthus roseus*

também demonstraram bons resultados quando utilizadas em reações de canfoquinonas através de reduções estereoseletivas formando alcoóis quirais, importantes intermediários na síntese de produtos naturais opticamente ativos (CHAI *et al.*, 2001).

Reações envolvendo monoterpenos, como o acetato de linalila, são estudadas através de oxidações seletivas realizadas por sistemas de culturas celulares. Este composto foi investigado quanto a sua capacidade de biotransformação por *Papaver bracteatum*, levando à formação de linalol, geraniol e terpineol com cerca de 40% do produto de partida transformado (HOOK *et al.*, 1990). Outros monoterpenos, tais como geraniol, nerol e carvona foram avaliados quanto à possibilidade de hidroxilações alílicas e reduções das ligações duplas e dos compostos cetônicos após incubação com células de *Catharanthus roseus* (HAMADA *et al.*, 1997).

A utilização de culturas vegetais de *Picea abies* foi examinada em reações de biotransformação com diversos monoterpenos, como α -pinenos racêmicos transformados por esta cultura produzindo como produtos majoritários verbenol e verbenona com altas taxas de conversão (LINDERMARK-HENRIKSON *et al.*, 2003).

Culturas de células mostram grande capacidade para transformar substratos do tipo cetona em várias substâncias de interesse (SUGA e HIRATA, 1990). Diversos estudos foram realizados com o intuito de conhecer o mecanismo bioquímico de redução de grupos carbonila pelas culturas (HIRATA *et al.*, 1982). Desta forma, reações de biotransformação utilizando quinonas quirais com culturas de células de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana tabacum* resultaram na formação dos respectivos alcoóis (CHAI *et al.*, 2001).

A habilidade de culturas de células em converter substâncias de interesse motivou estudos com *Catharanthus roseus* em reações de hidroxilação de (-)-(R)-

piperitona em estudos de biotransformação fornecendo os produtos hidroxilados regioespecíficos sem a redução de duplas ligações carbono-carbono e grupos carbonila (HAMADA *et al.*, 1994). Além disso, estudos utilizando varfarina, composto largamente utilizado como anticoagulante, mostraram que células de *Catharanthus roseus* possibilitaram a redução do grupo carbonila e formação do respectivo álcool (HAMADA *et al.*, 1993). As reações de glicosilação utilizando *Catharanthus roseus* também foram realizadas em compostos fenólicos que foram convertidos nos correspondentes glicosídeos, com rendimento de 47%, confirmando a potencialidade de bioconversão destes sistemas enzimáticos (SHIMODA *et al.*, 2002).

Estas culturas foram utilizadas em transformações de outros compostos tais como a piperidona, através de reações de hidroxilação regioesletiva em posições adjacentes à dupla ligação (HAMADA *et al.*, 1994) (**Figura 27.**).

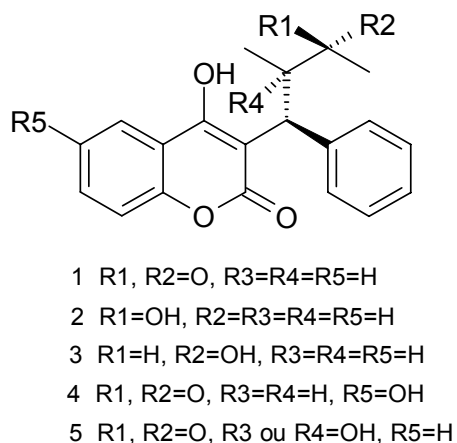


Figura 27.: Estrutura de varfarina e seus metabólitos

Os compostos bufanodienolídeos exibem diversas atividades biológicas como propriedades cardiotônicas, estimulação da pressão sanguínea, estimulação da respiração, além de possuir atividades anti-neoplásicas. Dentre os compostos com estas atividades destaca-se a cinobufagina de grande importância na

indústria farmacêutica. A biotransformação foi uma ferramenta importante para modificar estruturalmente este tipo de composto, aumentando consideravelmente seu potencial. Desta forma, foram realizadas reações utilizando culturas celulares de *Catharanthus roseus* em reações de glicosilação produzindo diversos derivados glicosilados (YE *et al*, 2002) (**Figura 28**).

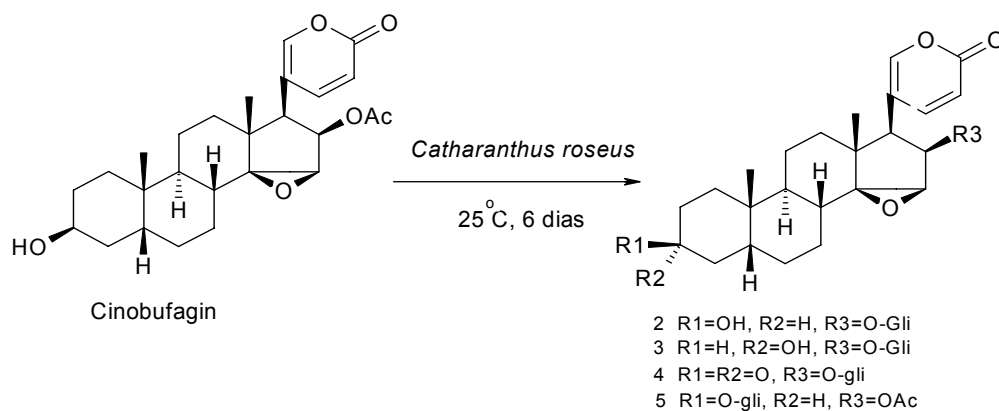


Figura 28.: Reações de glicosilação utilizando células de células de *Catharanthus roseus*.

Diversas culturas celulares têm sido utilizadas em reações de redução régio e estereosseletivas, como relatado por HAMADA e colaboradores (1988), os quais utilizaram α -dicarvelona como substrato para culturas de *Nicotiana tabacum*, o que resultou na obtenção do respectivo álcool. Além disso, estas culturas foram utilizadas no desenvolvimento de reações de redução de moléculas esteróides com bons rendimentos (KERGOMARD *et al.*, 1988).

Cetonas α e β insaturadas também foram estudadas quanto à possibilidade de realizarem reações de redução por diversos sistemas, tais como bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas, protozoários (DESRUT *et al.*, 1983) e fungos. Neste contexto, muitas reduções destes grupos químicos foram realizadas utilizando culturas de células envolvendo reduções de esteróides (PIETRUSZKO, 1966), e de carvona com culturas de *Nicotiana tabacum* (HIRATA *et al.*, 1982), e

com *Medicago sativa* que possibilitaram a redução com obtenção de produtos β substituídos (**Figura 29**).

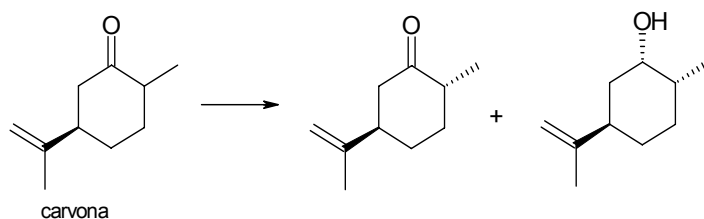


Figura 29.: Redução de carvona com formação de produtos β substituídos

Além da utilização do sistema enzimático de *C. roseus* na transformação de monoterpenóides, estudos mostram a eficiência de reações de glicosilação desta cultura em reações com compostos fenólicos (SHIMODA *et al.*, 2002), sendo este sistema também capaz de realizar reações de hidroxilações (HAMADA *et al.*, 1993) utilizando diversos sesquiterpenos.

3.7.2. Fatores interferentes em culturas de células vegetais

Diversas condições podem modificar a produção e a indução na produção de metabólitos secundários por culturas celulares e também possibilitar maior eficiência em reações de bioconversão.

A atividade bioquímica desenvolvida por culturas de células vegetais pode ser obtida através de seleção de linhagens de células que possuem alta produtividade. Esta escolha pode ser feita para a produção de substâncias de interesse tais como antocianinas através de triagem realizada com culturas de *Euphorbia milli* e *Daucus carota* (DOUGALL, 1980; YAMAMOTO *et al.* 1982,).

Outras técnicas podem ser utilizadas como estratégias através de agentes seletivos que podem ser explorados atuando como inibidores nas células de forma a modificar a produção de determinados compostos tais como a utilização de análogos de fenilalanina no aumento de capsaicina e ácido rosmarínico em

culturas celulares de *Capsicum annuum* (QUESNELL e ELLIS, 1989; SALGADO-GARCICLIA e OCHOA-ALEJO, 1990)

A manipulação de nutrientes também é determinante em culturas vegetais. Os meios nutritivos baseiam-se nas necessidades das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades *in vitro* específicas como metabólicas, energéticas e estruturais das células. A mudança de meio surgiu na tentativa de otimizar o crescimento, modificações que envolveram, principalmente, o aumento da concentração de sais, diminuição de sódio e acréscimo de nitrogênio para complementar o nitrato. Este meio conhecido como Murashige e Skoog (MS), (MURASHIGE e SKOOG, 1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White com extrato de folhas de fumo sendo o meio MS juntamente com o meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), o mais usado para a maioria das espécies.

Dentre os principais constituintes destacam-se fontes de carbono, açúcares componentes inorgânicos bem como outros nutrientes. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos. Este açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies, sendo sua concentração um fator importante, dependendo da cultura utilizada.

A quantidade de sacarose é determinante em muitas culturas como, por exemplo, a acumulação de alcalóides indólicos em culturas de *Catharanthus roseus* atinge condições ótimas com 8%(m/v) de sacarose (KNOBLOCH e BERLIN, 1980). Muitas vezes, no entanto, o aumento da concentração de sacarose pode reduzir a produção de compostos como, por exemplo, o aumento da produção de antocianinas através de diminuição de 5% (m/v) para 3%(m/v) na quantidade de sacarose (SAKAMOTO *et al.*, 1993).

Outro componente importante é o nitrogênio que aparece normalmente na forma de cátion (amônio) ou ânion (nitrato e nitrito). Entretanto a modificação da

razão amônia/nitrato pode alterar a produção de metabólitos. Como exemplo a redução do nível de amônio e o aumento do nível de nitrato promove a produção de betacianidinas enquanto que o aumento da razão entre estes promove a produção de berberina em diversas culturas celulares (IKETA *et al.*, 1977; FUJITA *et al.*, 1981; NAKAGAWA *et al.*, 1984; BOHM e RINK, 1988).

O fosfato também pode influenciar a produção de metabólitos em culturas de células vegetais. Quando o meio de crescimento mostra níveis altos de fosfato é observado que ocorre um efeito negativo no acúmulo de metabólitos secundários. Em meios com limitação de fosfato ocorre a indução e o estímulo na produção de enzimas consideradas importantes para a produção dos metabólitos (SASSE *et al.*, 1982).

Os reguladores de crescimento também representam fator crucial onde a composição e a concentração de hormônios no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e citocininas são reguladores mais utilizados em culturas, sendo usadas na formação de raízes, partes aéreas e calos.

O tipo e a concentração de auxina e citocinina, bem como a relação auxina/citocinina altera drasticamente o crescimento e a formação de culturas (MANTELL a SMITH, 1984). Outros reguladores como 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) inibem a produção de metabólitos em uma grande quantidade de casos onde a eliminação deste ou a mudança por outros como ácido naftaleno acético (NAA) ou ácido indol acético (IAA) mostram a possibilidade do aumento de compostos como antocianidinas em suspensões de células.

A otimização das culturas celulares também depende de fatores como temperatura, pH, luz e oxigenação. A temperatura de trabalho geralmente fica entre 17 e 25°C. No entanto, no caso de reações de biotransformação a temperatura pode favorecer a formação de determinados produtos. Quando são

utilizadas culturas de *Digitalis lanata* a temperatura de 17°C mostra a bioconversão de digitoxina para digoxina, enquanto na temperatura de 32°C favorece a maior formação de um glicosídeo (KREIS e REINHARD, 1992).

A utilização de células vegetais em diversos tipos de reações com terpenos, bem como o estudo de diversos fatores que influenciam estas reações, possibilita a realização de novos experimentos, tendo como substratos monoterpenos a fim de aperfeiçoar condições reacionais e obter novos produtos de interesse. Desta forma inicialmente foram definidos os produtos de partida e as condições iniciais para a realização deste trabalho buscando definir o tempo e os compostos formados através da utilização do sistema de cultura de células de *C. roseus*.

3.8. Culturas de Microrganismos

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social. Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico e os mais utilizados em reações de biotransformação devido ao rápido crescimento e metabolismo.

Na verdade, o reino dos fungos é um dos mais numerosos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Neste contexto, apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes. Entre esses cinco por cento de espécies, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos. Com a descoberta de novas espécies espera-se o surgimento de propriedades com potencial e valor biotecnológico.

Os fungos (do latim *fungus* = cogumelo) têm sido tradicionalmente considerados como organismos muito semelhantes às plantas. Os fungos crescem

como células únicas, as leveduras, ou como colônias filamentosas multicelulares, os bolores e cogumelos. As formas multicelulares não possuem folhas, caules ou raízes e são muito menos diferenciadas do que as plantas superiores, porém são muito mais diferenciadas do que as bactérias. Contudo, os fungos não possuem pigmentos fotossintéticos e, assim, estão restritos a uma existência saprofítica ou parasita (TRABULSI *et al.*, 1996, CORNELISSEN e MELCHERS, 1993).

Os esporos assexuados são às vezes chamados conídios; mais freqüentemente, contudo, esse termo é reservado para os esporos assexuados que se formam nos terminais ou nos lados das hifas (**Figura 30**).



Figura 30.: Estruturas de um fungo vistas através de microscópio ótico.

Os esporos, que contém um ou vários núcleos, variam bastante em cor, tamanho e forma. Sua morfologia e modo de origem constituem a principal base para a classificação dos fungos que não possuem sexualidade. Algumas espécies produzem somente uma espécie de esporos e outras produzem até quatro tipos diferentes.

Os fungos têm sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, tanto plásticos como energéticos, pois são de fácil manejo, crescimento rápido e utiliza meios bem caracterizados quimicamente. A via glicolítica ou da fermentação alcoólica, ou via de Embden-Meyerhof, é um dos exemplos de via metabólica conhecida em profundidade e que serve de padrão para as pesquisas em outros mecanismos metabólicos. Ela apresenta interesse, ainda, porque o organismo animal pode utilizar uma via semelhante para a degradação do açúcar. Os fungos são microrganismos heterotróficos e, em sua maioria, aeróbios obrigatórios. No entanto, certas leveduras fermentadoras, aeróbias facultativas, se desenvolvem em ambientes com pouco oxigênio ou mesmo na ausência deste composto.

Os fungos podem produzir enzimas como lipases, invertases, lacases, proteinases, amilases etc., que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Outros elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial, vitaminas, como tiamina, etc. Os fungos necessitam de água para o seu desenvolvimento, sendo alguns halofílicos, crescendo em ambiente com elevada concentração de sal.

Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH. Os fungos filamentosos podem crescer na faixa entre 1,5 e 11. Os meios com pH entre 5 e 6, com elevadas concentrações de açúcar, alta pressão osmótica, favorecem o desenvolvimento dos fungos nas porções em contato com o ar. Muitas espécies fúngicas exigem luz para seu desenvolvimento; outras são por ela inibidos e

outras ainda mostram-se indiferentes a este agente. Em geral, a luz solar direta, devido à radiação ultravioleta, é elemento fungicida (TRABULSI, 1996).

3.8.1. Aplicações de Microrganismos em Biotransformação

No campo de transformações enzimáticas, o maior número de investigações baseia-se na utilização de microrganismos. Estes organismos destacam-se por serem primitivos, frequentemente unicelulares, estruturalmente simples, pequenos e de crescimento rápido, o que facilita a assimilação de nutrientes acelerando o crescimento e, conseqüentemente, as reações de biotransformação (LIMBERGER, 2001). Em contrapartida, apesar dos microrganismos aceitarem transformar uma maior gama de substrato e em menor tempo, algumas reações são mais prováveis em organismos superiores, como as células vegetais, que por serem maiores, mais complexas e de crescimento mais lento, metabolizam mais lentamente os substratos, podendo levar a bioconversões mais complexas do que a maioria dos organismos inferiores. Como exemplo são as glicosilações que, quando catalisadas por microrganismos, geralmente fornecem produtos secundários e com baixa conversão, já que glicosídeos não são reconhecidos como metabólitos secundários de microrganismos (DICOSMO e MISAWA, 1996).

Nas últimas décadas, a extraordinária seletividade de substratos (incluindo, quimio-, régio- e enantio-especificidade), passou a ser explorada de forma cada vez mais intensa. Assim, tem-se feito o estudo da capacidade das enzimas isoladas de catalisar reações em meio aquoso, em condições moderadas de temperatura e pressão, reduzindo assim a possibilidade de danos a analitos termosensíveis. Em contrapartida, a aplicação eficaz de enzimas têm sido restrita devido a uma série de limitações, particularmente aquelas referentes à sua estabilidade operacional.

Para eliminar esses efeitos desfavoráveis, algumas estratégias têm sido investigadas. A mais antiga é a via sintética que utiliza técnicas da química orgânica buscando a síntese de catalisadores com atividades semelhantes à de enzimas. Recentemente, foi demonstrado que técnicas de engenharia de proteínas podem promover a formação de ligações intramoleculares, produzindo biocatalisadores robustos capazes de manterem a atividade catalítica mesmo em condições menos favoráveis. Outra abordagem tem sido a utilização de procedimentos para a imobilização das enzimas, através de ligações covalentes, formando sistemas muito estáveis, entretanto com menos flexibilidade espacial para as enzimas, resultando em decréscimo na atividade.

Como alternativa pode-se incluir o uso de reações de biotransformação, mostrando-se eficaz, como por exemplo, em reações estereosseletivas de aldeídos e cetonas, sendo esta técnica praticamente aplicada a um grande número de compostos. Um grande número de estudos pode ser encontrado em transformações de substratos nitrogenados (NAKAMURA *et al.*, 1988), fluorados sulfúricos (ITOH *et al.*, 1985; KITAZUME e NAKAYAMA, 1986; TAKANO, 1987; KITAZUME e KOBAYASHI, 1987; BERNARDI *et al.*, 1988; BUCCIARELLI *et al.*, 1989) e grupos funcionais de anéis heterocíclicos (TICOZZI, 1988; DONDONI *et al.*, 1988). As α -dicetonas têm sido estudadas não só formando cetos-alcoóis como também podendo formar dióis a partir da redução de dois grupos carbonílicos (**figura 31**). Em geral, ocorre a formação de um dos diastereoisômeros por uma etapa rápida e, em seguida, ocorre a formação da mistura dos dois produtos predominando a configuração *anti* (IVANCIUC *et al.*, 1998).

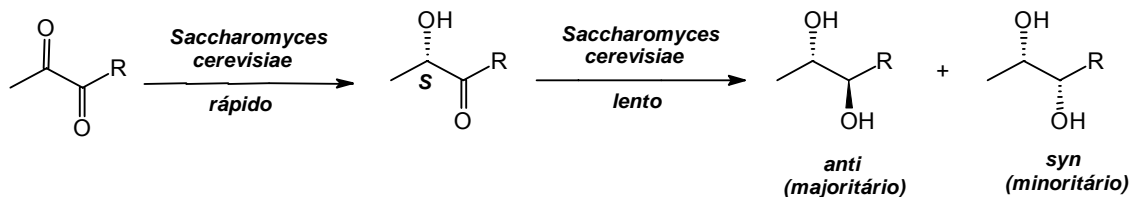


Figura 31.: Redução de α -dicetonas por *S. cerevisiae*

Além das reações estereosseletivas, reações de estereo-inversão de dióis mostraram-se de grande importância e muitos dos produtos formados são utilizados como intermediários para a síntese de agentes anti-HIV (KIM *et al.*, 1994). A estereo-inversão utilizando microrganismos mostra-se extremamente flexível podendo, em alguns casos, realizar a inversão de dois centros como mostrado na **figura 32**. (CARNELL *et al.*, 1994; MATSUMUDA *et al.*, 1994; PAGE *et al.*, 1998). Neste caso, a mistura *trans*, racemizada por *Corynesporium cassicola*, forma o produto com rendimento de 82% e excesso enantiomérico de 99%.

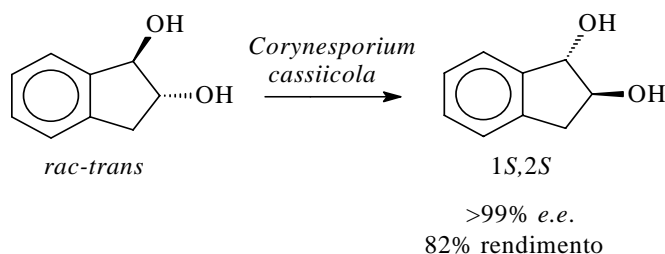


Figura 32.: Estereo-inversão de dióis cíclicos por *C. cassicola*

Além da redução de compostos carbonilados, torna-se importante as reduções de duplas ligações utilizando reações de biotransformação tendo em vista a dificuldade da realização por métodos convencionais. Reações utilizando *Saccharomyces cerevisiae* reduziram geraniol com 97% de e.e (excesso enantiomérico), conservando a dupla não ativada como mostrado na **figura 33**. (GRAMATICA *et al.*, 1982).

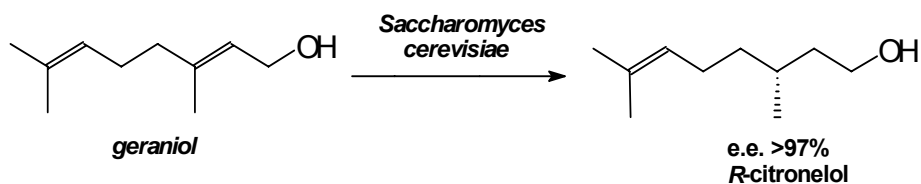


Figura 33.: Redução de geraniol a citroanelol por *S.cerevisiae*

As reações hidrolíticas constituem um importante tipo de biocatálise que envolve principalmente amidas e ésteres usando proteases, esterases ou lipases. Estas reações enzimáticas constituem-se como o principal tipo de biotransformação realizada ao longo das últimas décadas (BORSCHUEUR e KAZLAUSKAS, 1999), além de outros tipos de reações hidrolíticas que podem envolver a formação e/ou a clivagem de ésteres fosfatados, epóxidos e nitrilas. Beta-lactamas foram utilizadas como material de partida em sínteses de antibióticos e antifúngicos utilizando enzimas hidrolíticas isoladas de *Rhodococcus* sp. (figura 34) (EVANS *et al.*, 1991).

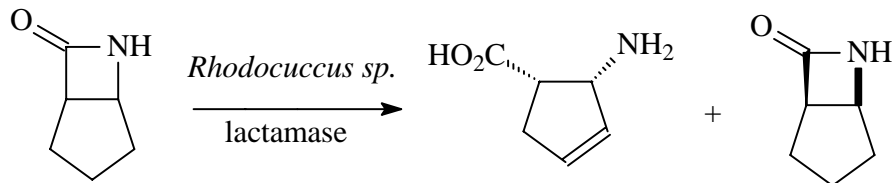


Figura 34.: Resolução enzimática de β lactamas bicíclicas via lactamase

Lactamases isoladas de *Pseudomonas solanacearum* também foram empregadas na hidrólise de β -lactamas bicíclicas para resolução enantiomérica e obtenção de um intermediário para a síntese de outros tipos de agentes antivirais (figura 35) (EVANS *et al.*, 1991).

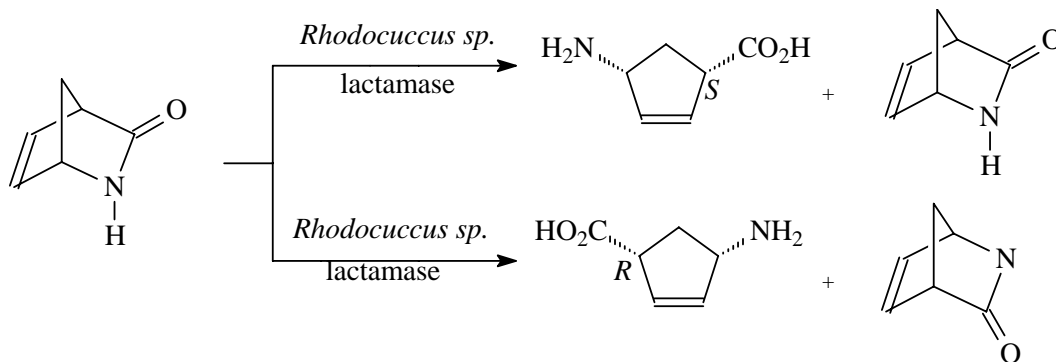


Figura 35.: Resolução enzimática de lactamas bicíclicas via lactamase

A utilização de esterases também apresenta interesse, principalmente, quanto ao uso de fungos e bactérias, que comparados com enzimas isoladas, possibilitam uma boa seletividade. Esta seletividade pôde ser demonstrada via hidrólise de produtos acetilados racêmicos por *Bacillus* sp. com formação do respectivo álcool secundário e quiral conforme a **figura 36**. (TAKAISHI, 1982).

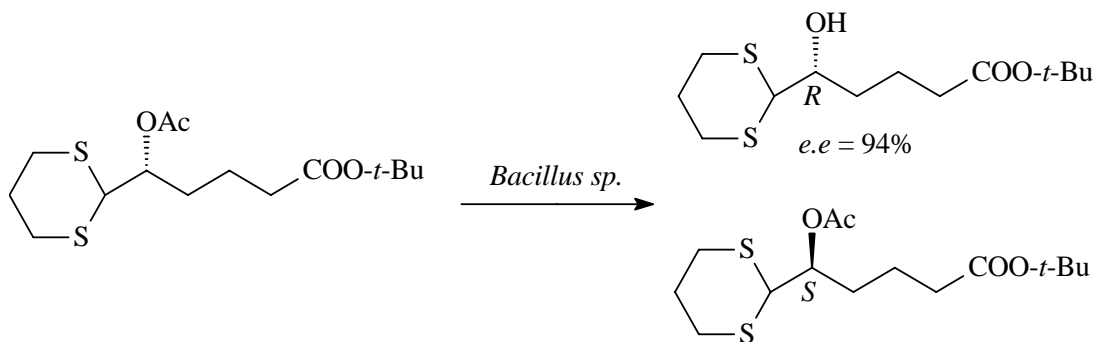


Figura 36.: Resolução microbiana por *Bacillus* sp.

Estudos mostraram a possibilidade da hidrólise de epóxidos desenvolvidos utilizando óxido de estireno como precursor nas reações régio e enantiosseletivas (PEDRAGOSA-MOREAU *et al.*, 1993), como mostrado na **figura 37**. Culturas de *Aspergillus niger* foram capazes de hidroxilar o epóxido com ataque ao átomo de carbono do anel possibilitando assim a resolução do epóxido com formação do diol com moderada pureza óptica. O (*S*)-epóxido foi recuperado com 96% de e.e. Em contraste, a utilização de *Beauveria bassiana* exibiu uma oposição quanto a enantio e régio-seletividade com inversão da configuração resultando o (*R*)-epóxido.

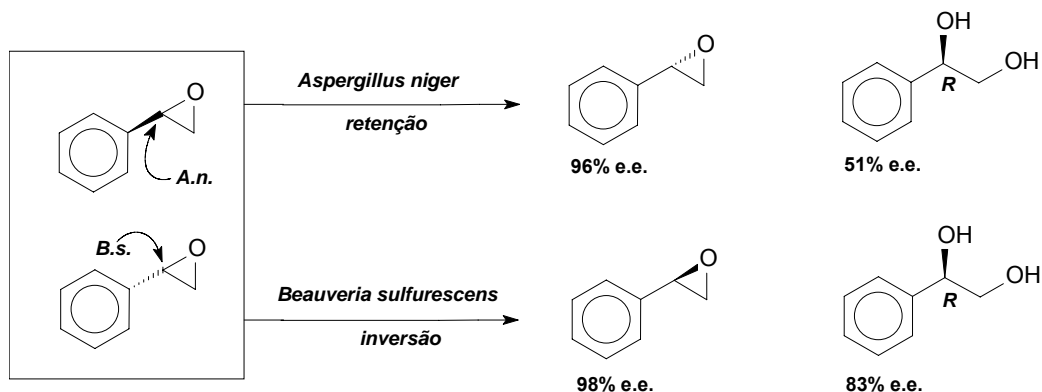


Figura 37.: Diracemização do óxido de estireno por microrganismos

Compostos como α -hidroxi e α -aminoácidos foram obtidos através das correspondentes α -hidroxinitrilas e α -aminonitrilas, utilizando a forma racêmica e a hidrólise enzimática dos respectivos produtos hidroxilados com *Torulopsis candida* para a formação do (*S*)-hidroxiácido (FUKUDA *et al.*, 1973), enquanto o uso de *Alcaligenes faecalis* levou a formação do (*R*)-ácido mandélico (YAMAMOTO *et al.*, 1991) (**Figura 38.**).

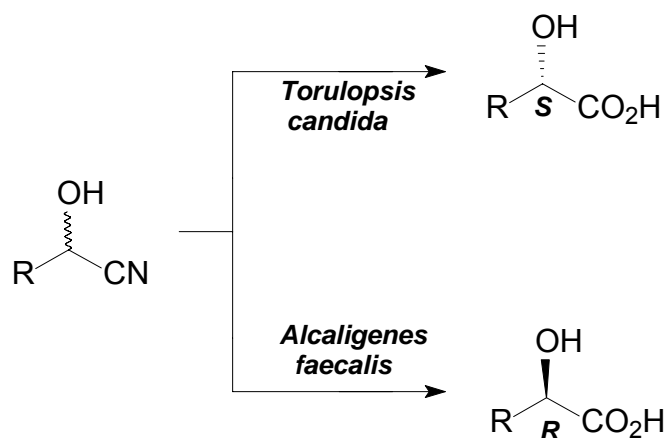


Figura 38.: Hidrólise enantioseletiva de α hidroxinitrilas por microrganismos

Mahato e Majumdar (1993) demonstraram que sistemas microbianos apresentam versatilidade na produção de compostos largamente utilizados na

indústria farmacêutica. Neste sentido, a transformação de esteróides tem proliferado principalmente na incorporação em partes de processos sintéticos, na formação de fármacos e hormônios. Os esteróides são utilizados, principalmente, como antiinflamatórios, diuréticos, contraceptivos, agentes anticâncer entre outros, o que justifica diversos estudos com um grande número de microrganismos que apresentam elevado poder de biotransformação.

As reações oxidativas também se constituem em importante utilização para a obtenção de compostos que possibilitem a introdução de um grupo funcional como alcanos, alquenos e moléculas aromáticas. A metodologia tradicional utiliza normalmente um grande número de oxidantes cuja constituição é baseada em metais tóxicos, além das reações mostrarem-se ineficientes quanto à formação de produtos régia e estereoseletivos. Desta forma, a quantidade de microrganismos testados com a capacidade de hidroxilação tornou-se muito ampla. Como exemplo, fungos como *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram muito estudados para este propósito (ARCHELAS *et al.*, 1988). Na maioria dos casos, a hidroxilação por *Beauveria bassiana* ocorreu de forma regiosseletiva como mostrado na **figura 39**.

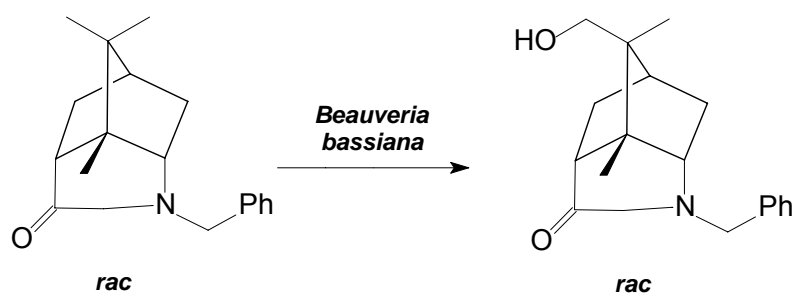


Figura 39.: Régio hidroxilação por *Beauveria bassiana*

A hidroxilação de compostos aromáticos é de grande importância industrial. A produção de ácido 6-hidroxicotínico a partir de ácido nicotínico foi realizada em escala industrial por *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. (HOEKS *et al.*, 1990).

Além disso, o prenalterol racêmico, um importante composto com atividade farmacológica, pode ser obtido por hidroxilação regioseletiva por *Cunninghamella echinulata* (PASUTTO *et al.*, 1987) como demonstrado na **figura 49**.

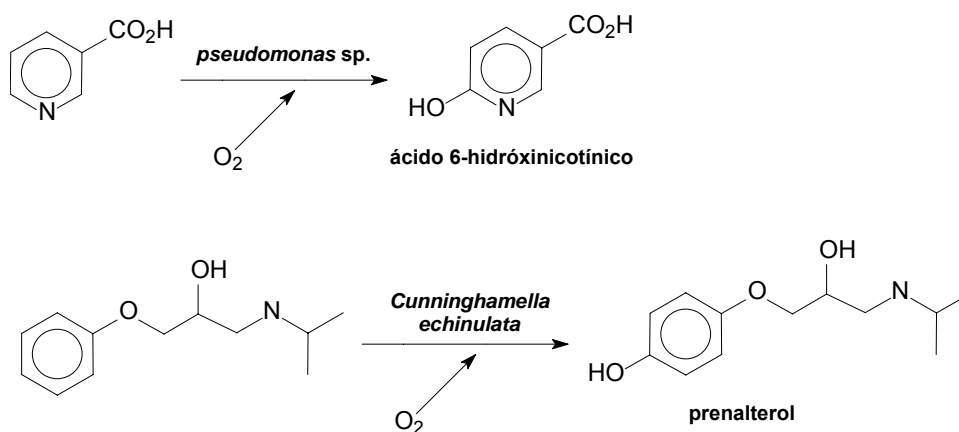


Figura 40.: Hidroxilação microbiana de aromáticos

Os processos químicos de oxidação apresentam como principal limitação a dificuldade em obter-se a seletividade desejada para determinado grupo químico ou posição da molécula. Enzimas capazes de introduzirem um átomo de oxigênio em um substrato – as monoxigenases – podem catalisar várias reações sinteticamente úteis como (1) hidroxilação de alifáticos, (2) epoxidação de alquenos, (3) sulfoxidação de tioésteres e (4) oxidação de cetonas do tipo Bayer-Villiger. Todas estas reações podem, potencialmente, ser conduzidas de forma assimétrica. Uma limitação comum a quase todas as reações com monoxigenases é que elas requerem um cofator como NADH ou, mais comumente, NADPH. A reciclagem do NADPH é fundamental nas reações de oxidação; assim, a maioria das reações com monoxigenases é realizada com sistemas de células intactos e não com sistemas enzimáticos isolados.

As reações de oxidação constituem a etapa inicial da degradação metabólica de substratos orgânicos. Assim, é usual que as reações de oxigenação

freqüentemente sejam acompanhadas por transformações subseqüentes dos produtos formados, resultando em rendimentos globais baixos. O bloqueio seletivo das etapas metabólicas subseqüentes, ao se deixar intactas as células que contém as enzimas é a chave para se conseguir rendimentos elevados em reações de oxidação. Como exemplo, pode-se citar a hidroxilação régio-seletiva de esteróides, que é realizada, rotineiramente, em escala industrial. A hidroxilação da progesterona na posição 11 α , efetuada por *Rhizopus arrhizus* (PETERSON *et al.*, 1952) ou *Aspergillus niger* (**Figura 41**), elimina cerca da metade das 37 etapas de síntese do esteróide, resultando em considerável redução dos custos de produção.

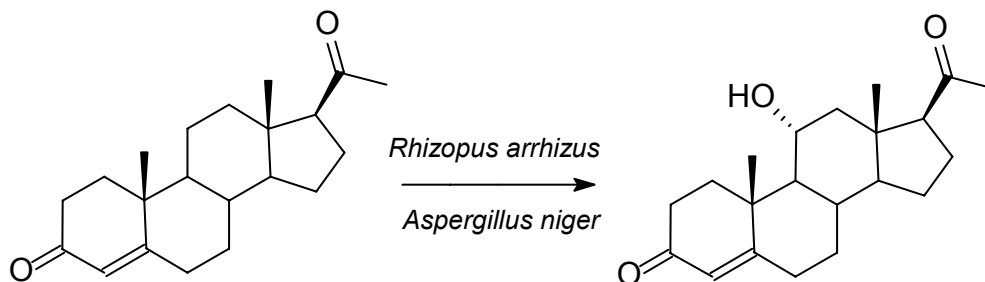


Figura 41.: Hidroxilação microbiana regioseletiva efetuada em escala industrial.

Os monoterpenos são precursores importantes para a produção biotecnológica de produtos naturais. Neste sentido, alcoóis terpênicos como o geraniol e nerol foram biotransformados por *Penicillium digitatum* com formação de 6-metil-5-hepten-2-ona (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001), bem como reações com *R* e *S* limoneno utilizando fase sólida (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001). Além disso, diversos fungos em reações com terpenos vêm sendo estudados como diterpenos extraídos de *Stemodia maritima*, que mostraram atividade antiviral, e foram incubados em culturas de *Aspergillus niger* e então biotransformados, resultando na produção de uma vasta gama de novos análogos de produtos naturais hidroxilados (CHEN e REESE, 2002).

O estudo de monoterpenos bicíclicos também é de grande interesse, o que justificou a realização de importantes trabalhos como o de YOO e colaboradores (2001), que empregaram α e β pinenos utilizando *Pseudomonas* sp com formação de limoneno, cimeno, α -terpinoleno, α -terpineol e borneol, sendo bioconvertidos 33,5% de α -pineno e 58,8% de β -pineno.

Substratos como o esteviosídeo são facilmente hidrolisados em meio ácido com formação de isosteviol e a introdução de grupos hidroxila confere novas propriedades biológicas. Estudos foram realizados com o composto hidrolisado utilizando *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus arrhizus* em reações de biotransformação para funcionalizar a molécula de isosteviol (OLIVEIRA e SANTOS, 1999), bem como a utilização de *Fusarium verticilloides* e sua habilidade de transformar este diterpeno (OLIVEIRA e STRAPASSON, 1996).

Durante os últimos anos o estudo de reações de biotransformação utilizando fungos tendo diterpenos como substratos vem despertando interesse. Vários microrganismos tais como *Cunninghamella elegans* são utilizados em reações utilizando alcalóides com bons rendimentos (SAYED, 2000). Um dos microrganismos utilizados em reações tem sido o sistema *Mucor phumbeus* em processos específicos para a preparação de diterpenos bioativos (FRAGA *et al.*, 1998) bem como a utilização de diferentes esqueletos carbônicos, a fim de desenvolver modelos e expandir as hidroxilações com este fungo (FRAGA *et al.*, 2003)

A utilização de fungos em reações de biotransformação possibilitou que muitos fármacos fossem estudados. A terbinafina foi utilizada em oxidações regioseletivas, em reatores com *Cunninghamella blakesleana* levando a derivados furânicos (SCHMITZ *et al.*, 2000) (**Figura 42**), compostos estes largamente estudados e usados em sínteses (BEVINAKATTI e BANERJII, 1992).

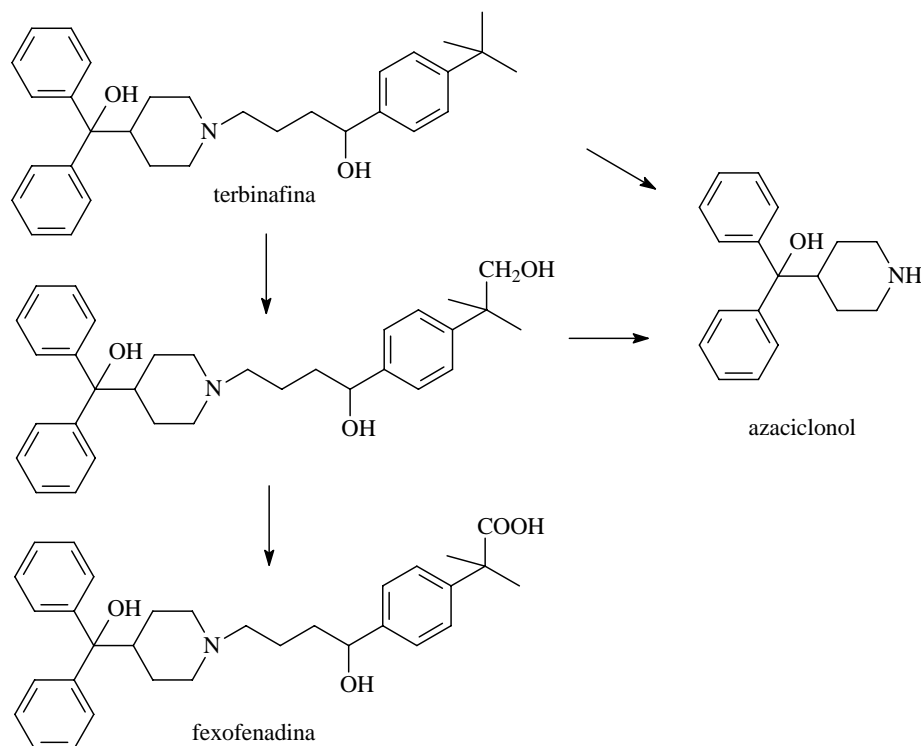


Figura 42.: Derivados de furanodienos obtidos de oxidações em reatores

Um grande número de fungos filamentosos mostrou-se capaz de catalisar reações com estruturas alcaloídicas do tipo tebaína. Dentre estes sistemas podemos citar culturas de *Mucor piriformis* (MADYASTHA e REDOY, 1994), bem como reações que utilizam *Cunninghamella echinulata* e *Streptomyces* sp. (DAVIS *et al.*, 1979) como também a utilização de substratos como a codeína (GIBSON *et al.*, 1984). A utilização de *Cunninghamella* possibilitou também a desmetilação de tebaína em reações regioseletivas que levaram a obtenção de intermediários de morfina (ABEL *et al.*, 2003).

As hidroxilações com fungos filamentosos possibilitam reações com compostos aromáticos com sistemas do tipo *Mortierella isabellina* promovendo a hidroxilação de aromáticos simples como tolueno e etil benzeno, bem como a adição a hidrocarbonetos mais complexos e outros compostos aromáticos. Estes estudos mostraram a vasta gama de compostos que apresentam seletividade

quanto à hidroxilação, além de possibilitar a determinação da estereoquímica e da topologia da enzima que determina a seletividade da hidroxilação (HOLLAND *et al.*, 1993).

A hidroxilação de derivados monoterpênicos drimânicos utilizando fungos amplia o uso destes, sendo descrita em estudos realizados por ARANDA e colaboradores (2001), com a obtenção de derivados hidroxilados com atividade biológica e possibilidade de aplicação industrial. Outros experimentos que utilizaram como sistema catalítico culturas de *Cunninghamella echinulata* possibilitaram a produção de novos derivados hidroxilados (CARRERAS *et al.*, 1996).

A atividade biológica de muitos fármacos está relacionada diretamente com sua estereoquímica absoluta (WITIAK e INBASEKARAM, 1982). Compostos como o atenolol e o propranolol são muito usados como bloqueadores do sistema adrenérgico usados no tratamento de problemas cardiovasculares, sendo caracterizados por estruturas do tipo arilpropanolamina com um centro quiral e sua atividade residindo no isômero *S*, sendo o enantiômero *R* responsável pelos efeitos indesejáveis (NELSON e BURKE, 1978). A síntese destes compostos é largamente estudada utilizando lipases para catalisar as reações hidrolíticas, o que evidencia a busca por sistemas enzimáticos, tais como *Rhizopus arrizus* e *Geotrichum candidum* para otimizar processos para o desenvolvimento de metodologias para a síntese destes compostos em reações de biotransformação (DAMLE *et al.*, 2000).

A utilização de reações de biotransformação tem sido investigada em monoterpênicos como limoneno, onde a bioconversão por culturas de *Penicillium digitatum* levou a formação do álcool terpênico α -terpineol (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001; ADAMS *et al.*, 2003). Diversos monoterpênicos também têm sido utilizados em reações com este sistema, tais como geraniol e nerol, com a

obtenção de produtos de bioconversão com bons rendimentos (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001).

3.8.2. Condições reacionais em reações de bioconversão utilizando fungos

Além da grande possibilidade da utilização de diversas culturas de fungos em reações de biotransformação, vários fatores reacionais podem influenciar a capacidade de bioconversão. Dentre as condições investigadas pode-se citar a composição e o tipo de meio reacional, a adaptação do substrato durante a inoculação e a concentração de co-solventes utilizados.

No caso da utilização de substratos flavorizantes estes são, geralmente, parcialmente solúveis em meio aquoso, mostrando ser a escolha do solvente um fator importante para a solubilização da amostra (LAANE *et al.*, 1987; ANDERSSON e HAHN-HAGERDAL 1990), sendo estes muitas vezes tóxicos para as reações enzimáticas (LAYMAN, 1984). Diversos solventes são altamente tóxicos e/ou inibidores de sistemas enzimáticos. Este problema ocorre pelo fato de que muitas culturas de células possuem diferentes respostas (SALTER e KELL, 1995), mostrando que seleção de solventes se torna fator chave para muitos estudos.

Relatos mostram testes em que 22 solventes foram testados em reações com limoneno utilizando *Penicillium digitatum* como sistema enzimático, demonstrando que o melhor sistema de co-solvente orgânico modifica não só a quantidade de produto formado para o caso da utilização de células livres, como também quando é utilizado sistema de células imobilizadas (TAN e DAY, 1998).

Reações de bioconversão com fungos filamentosos também foram estudadas utilizando solvente aquoso e misturas de água com solventes orgânicos visando avaliar reações de redução enantioselectiva de nitroacetonas aromáticas

mostrando um aumento significativo no excesso enantiomérico quando se utiliza a mistura água/solvente (MOLINARI, *et al.* 1998).

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

Assim como para culturas de células vegetais, os microrganismos se mostraram eficientes para o estudo com monoterpenos, com a definição de novos sistemas de fungos na reação com os terpenos anteriormente utilizados, bem como a avaliação de melhores condições reacionais para a obtenção de novos produtos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Substratos

Para o estudo das reações de biotransformação foram utilizados os substratos (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -pineno, da marca MERCK, sendo os dois últimos purificados por cromatografia em coluna, empregando-se como fase estacionária gel de sílica MERCK (70-230 mesh). O óleo de terebentina foi utilizado diretamente para as reações. Todos os compostos utilizados são abundantes na natureza e, relativamente, de baixo custo para as reações de biotransformação (**Figura 43.**).

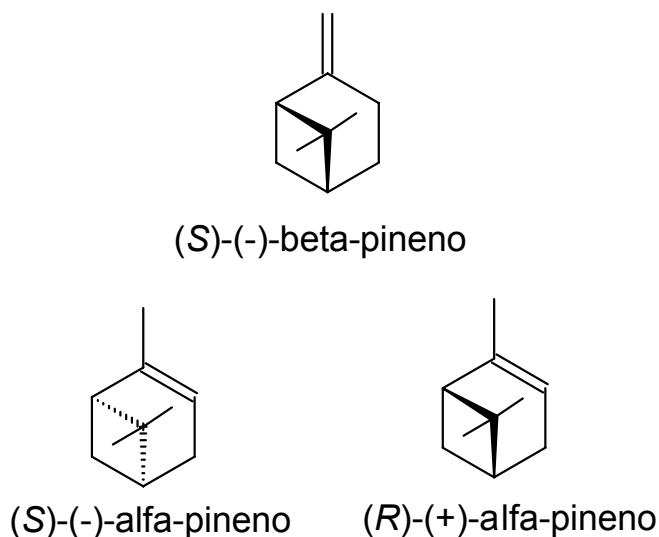


Figura 43.: Produtos utilizados nas reações de biotransformação

4.2. Solventes

Foram utilizados solventes das marcas MERCK, SYNTH e NUCLEAR, os quais não sofreram nenhum tipo de tratamento preliminar.

4.3. Preparação da Suspensão de células de *Catharanthus roseus*

Para o estudo de biotransformação foram utilizadas culturas de células em suspensão de *Catharanthus roseus* obtidas na Universidade de São Paulo (USP), sendo esta linhagem estabelecida em 1998. As condições de preparação e manutenção foram previamente estabelecidas de acordo com metodologia já descrita (MORENO, 1994), sendo realizada a seleção dos explantes de folhas de *Catharanthus roseus* (**Figura 44**) mais adequados para a formação de calos. Os explantes livres de contaminação foram adaptados às condições *in vitro*, ocorrendo indução de calos e posterior transferência para o meio líquido.



Figura 44: Flores de *Catharanthus roseus*

A suspensão foi iniciada a partir da transferência de calos friáveis para um meio líquido, sob agitação contínua, na presença de luz, em temperatura na faixa de 24 a 28°C.

A cultura de células utilizada para os ensaios, cultivada em meio base MURASHIGE e SKOOG (meio MS) (MURASHIGE e SKOOG, 1962), apresentou-se como uma suspensão fina. O meio base MS utilizado foi preparado, conforme tabela 2.1, sendo todos os componentes adicionados através de pipetador

automático em capela de fluxo laminar, sendo a sacarose, devidamente pesada e adicionada posteriormente ao meio. Após este processo, o pH do meio foi ajustado - valores entre 5,7 e 5,9 – e, após, o meio foi esterilizado em autoclave vertical por um período de 20 minutos a 1 bar de pressão.

Tabela 2.: Componentes meio MS utilizado para *Catharanthus roseus*

Componente	Quantidade
Macro MS*	100 mL
Micro MS**	10 mL
C MS***	1 mL
Meso inositol (100 mg/mL)	1 mL
Tiamina HCl (1mg/mL)	0,40 mL
NAA (1mg/mL)	2 mL
Cinetina (0,5 mg/mL)	0,40 mL
Sacarose	30 g
Água Destilada / milli-q qsp	1000 mL

* KNO₃(19g/L), MnSO₄.7H₂O(3,7g/L), CaCl₂.2H₂O(4,4g/L), NH₄NO₃(16,5g/L), KH₂PO₄(1,7g/L), H₂O (q.s.p.).

** MnSO₄.7H₂O(1,69g/L), H₃BO₃(0,62g/L), ZnSO₄.7H₂O(0,86g/L)Na₂H₂ EDTA(3,73g/L), FeSO₄.7H₂O (2,78g/L), H₂O(q.s.p.)

*** KI(0,83g/L), Na₂MoO₄.2H₂O(0,25g/L), CuSO₄.%H₂O(25mg/L), CoCl₂.6H₂O(25mg/L), H₂O (q.s.p)

As suspensões celulares obtidas foram mantidas sob agitação contínua (100 rpm), temperatura de 25+/-2°C, luminosidade de 12 μmóis/s.m² e fotoperíodo de 12 horas, em Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL do meio MS líquido (**Figura 45**). As subculturas foram efetuadas quinzenalmente distribuindo-se entre 2 Erlenmeyers uma quantidade equivalente de massa celular contendo meio novo.



Figura 45.: Cultura de suspensão celular de *Catharanthus roseus*

4.3.1. Caracterização do ciclo de crescimento da suspensão celular

Para que pudessem ser determinados os períodos de adição do substrato exógeno ao meio de cultura, tornou-se necessária a aferição do ciclo de crescimento das células em suspensão. Para tanto, foram investigados pontos da curva de crescimento celular, incluindo o dia de inoculação. Para esta análise, dois frascos de suspensão foram analisados separadamente, como réplica, para cada ponto.

Para a preparação do inóculo da curva de crescimento foram utilizados frascos de 250 mL contendo 100 mL de células em suspensão com 14 dias de cultivo, em seus respectivos meios. Em câmara de fluxo laminar, as suspensões foram reunidas em frasco Erlenmeyer de 1000 mL. Sob vácuo, a suspensão homogeneizada foi filtrada rapidamente sobre funil de vidro sinterizado, em condições assépticas. Cerca de 0,7-1,5 g de células foram inoculadas em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio tampado com rolhas de silicone T32.

As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação contínua (100 rpm), temperatura de 25+/-°C, luminosidade de 12 $\mu\text{móis/s.m}^2$ e fotoperíodo de 12 horas.

Para cada frasco coletado, o seguinte procedimento foi realizado:

- Filtração da suspensão, sob vácuo, sobre funil de vidro sinterizado;
- Lavagem das células com água destilada e posterior filtração e pesagem para a determinação de peso fresco.

4.3.2. Adição do substrato ao meio de cultura

Os substratos foram adicionados ao meio de cultura de *Catharanthus roseus* com auxílio de pipeta volumétrica, na quantidade de 60 μL e após 4 dias de crescimento da cultura, durante a fase de crescimento exponencial. Em alguns casos, houve a necessidade de dissolução do substrato em 1 mL de metanol. Após as adições, as culturas permaneceram sob agitação constante e a temperatura do meio foi mantida em aproximadamente 25°C nas mesmas condições de luminosidade descritas anteriormente.

4.3.3. Acompanhamento da reação de biotransformação

Para o acompanhamento e determinação da cinética da reação, fez-se a retirada periódica de alíquotas do meio reacional. Para tanto, em capela de fluxo laminar, foram retirados 5 mL da solução reacional a cada 2 dias e, após, realizou-se extração com agitação manual por partição com 5 mL de acetato de etila, descartando-se a fase aquosa. A fase orgânica foi levada à secura em evaporador rotatório ou equipamento de secagem a vácuo (*speed vac*) e o resíduo redissolvido em acetato de etila para a análise através de injeção em cromatógrafo gasoso. Para os monoterpenos (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -

pineno, assim como para o óleo de terebentina, as alíquotas foram coletadas até decorridos 15 dias do início do experimento.

Todos os experimentos foram acompanhados de controle, contendo o substrato em meio reacional com a ausência de células, assim como de branco, cultura de células sem a adição de substrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, onde cada ponto, da mesma forma, foi analisado em triplicata.

4.4. Isolamento dos produtos

O acompanhamento das reações foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD), em placas analíticas de gel de sílica GF₂₅₄ MERCK, utilizando-se como fase móvel, acetato de etila, hexano e metanol, em diferentes proporções. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta a 254 e 365 nm e como reagentes reveladores foram empregadas soluções de anisaldeído sulfúrico, e vanilina sulfúrica.

Para o isolamento dos produtos de biotransformação empregou-se cromatografia rápida em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica MERCK. A técnica de escolha, Método de Kirchner (CLARK-STILL *et al.* 1978) consiste na eluição da amostra com quantidades crescentes de acetato de etila em hexano, sendo possível também, a utilização de metanol como eluente. Nesta técnica e no uso destes eluentes, os terpenos não oxigenados apresentam maior afinidade pelo hexano sendo rapidamente eluídos, enquanto os terpenos oxigenados formam pontes de hidrogênio com o gel de sílica, sendo mais adsorvidos, o que resulta no retardo de sua eluição. A ordem de eluição dos constituintes oxigenados com o aumento do gradiente de acetato de etila e hexano segue a seguinte ordem: óxidos, ésteres, cetonas e alcoóis (IKAN, 1991).

Quando necessário, os produtos foram submetidos à nova cromatografia em coluna ou à cromatografia preparativa em camada delgada utilizando placas de vidro 10x10 cm como suporte.

4.5. Análise por cromatografia a gás

Para a análise qualitativa por cromatografia a gás, a amostra foi inicialmente dissolvida em solvente (conforme procedimento abaixo) e, logo após, injetada em quantidade de 3 μ l, em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC/MS – QP5000 (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com quadrupolo cilíndrico, operando com energia de ionização de 70 eV técnica de impacto eletrônico. A coluna utilizada foi Durabond-DB5 (John Wiley & Sons Scientific, U.S.A.), com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchido com polidimetildifenilsiloxano contendo 5% de grupamentos fenila em filme de 0,25 μ m de espessura. Para a determinação do índice de retenção foi utilizado seguinte procedimento:

- Programa de temperatura: 60 a 240°C, a 3°C/min
- Tempo de análise: 60 minutos
- Injetor: 220°C
- Detector (DIC) / Interface (EM): 250°C
- Razão de divisão de fluxo: 1:20 (CG/EM).
- Fator de diluição: 2:100 (v/v) em éter etílico
- Quantidade de amostra injetada: 1 μ L da diluição em éter etílico
- Intervalo de massa: 40-600 u.m.a.

Também foram utilizados métodos de análise diferenciados para o acompanhamento das reações. O procedimento utilizado encontra-se descrito abaixo:

- Programa de temperatura: 60 a 240°C, a 15°C/min
- Tempo de análise: 19 minutos

- Injetor: 220°C
- Detector (DIC) / Interface (EM): 250°C
- Razão de divisão de fluxo: 1:20 (CG/EM)
- Fator de diluição: 2:100 (v/v) em éter etílico
- Quantidade de amostra injetada: 1 µL da diluição em éter etílico
- Intervalo de massa: 40-600 u.m.a

Para análise quiral utilizou-se coluna Cyclodex-B (John Wiley & Sons Scientific, U.S.A.), com especificações de 0,25 µm de diâmetro e 30 metros de comprimento, sendo descrita abaixo a metodologia empregada :

- Programa de temperatura: 60 a 240°C, a 2°C/min
- Tempo de análise: 73 minutos
- Injetor: 200°C
- Detector (DIC) / Interface (EM): 230°C
- Razão de divisão de fluxo: 1:50 (CG/EM)
- Fator de diluição: 2:100 (v/v) de óleo em éter etílico
- Quantidade de amostra injetada: 1 µL da diluição em éter etílico
- Intervalo de massa: 40-600 u.m.a.

4.6. Análise Química

A caracterização dos produtos foi baseada no índice de retenção relativo e nos respectivos espectros de massa, por comparação destes com amostras autênticas, com dados retirados da literatura (ADAMS, 2001; JENNINGS e SHIBAMOTO, 1980) ou por comparação com espectros de massa registrados em bancos de dados de referência (NIST 62 e NIST 12, National Institute of Standards and Technology, Quioto, Japão) e banco de dados de terpenos denominado LIMBERG, 1998 - desenvolvido pelo grupo de pesquisa.

Primeiramente foram calculados os índices de retenção relativa respectivos a cada pico, uma vez que este índice de retenção pode sofrer várias influências (temperatura, fluxo, operador, equipamento, coluna), tornando-se necessário portanto, corrigi-lo para minimizar tais fatores. O método utilizado consiste na comparação dos tempos de retenção da amostra com os tempos de retenção obtidos para uma mistura de alcanos lineares – Índice de Retenção de Kováts, ou seja, índice de retenção relativo ao tempo de retenção de 2 dos componentes de uma série análoga, de menor e maior retenção que a substância analisada. O modelo de equação utilizada foi o modelo de Kováts, aplicado a sistemas com temperatura isotérmica modificada, os quais se basearam na equação de Kováts, expandindo seu uso para sistemas de programação linear de temperatura.

Como colunas menos polares, as mais utilizadas são as revestidas com polidimetilsiloxano e polidimetildifenilsiloxano, respectivamente e, como coluna de média polaridade, as revestidas com polietilenoglicol de alto peso molecular. As informações destes dois tipos de colunas são complementares (SANDRA e BICCHI, 1987), uma vez que fornecem cromatogramas com ordem de eluição diferenciada, facilitando a caracterização dos constituintes. Além disso, quando necessários se fez uso de coluna quiral para o acompanhamento e identificação dos compostos de interesse.

4.7. Polarimetria

As amostras foram submetidas à análise em polarímetro Perkin Elmer com volume percorrido por feixe de luz de 1 decímetro e temperatura de 20°C com célula de 1 cm. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

4.8. Culturas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Cunninghamella elegans* ATCC 36112

Os microrganismos utilizados para os experimentos de bioconversão de terpenos foram culturas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, provenientes do Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal de Goiânia.

4.8.1. Manutenção das culturas

As culturas dos microrganismos foram mantidas em tubos inclinados com meio ágar Sabouraud na forma de esporos colocados na geladeira a 4°C a fim de manter sua viabilidade sendo realizados repiques periódicos a cada dois meses.

4.8.2. Meios de cultura

O meio utilizado para a manutenção e para os experimentos de crescimento de fungos foi preparado adicionando-se 35 g de ágar Sabouraud MERCK para cada 1000 mL de água milli-q, sendo esta mistura homogenizada e fervida. Após, o meio foi colocado em tubos inclinados e levado à autoclave durante 20 minutos e deixado esfriar e acondicionado na geladeira.

Para os repiques o tubo de ensaio contendo esporos foram lavados com solução de glicerina 40% sendo então retirado 1 mL desta solução com pipeta esterilizada e imediatamente colocado em novo tubo e deixados a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Após este período foi observado o crescimento de novas hifas e esporos e o tubo foi então colocado em geladeira.

4.8.3. Ensaio em agitador orbital de plataforma

4.8.3.1. Inóculo

Tubos com ágar Sabouraud foram inoculados a partir das culturas estoque e incubados em estufa a 28°C, por 48 horas. Os tubos contendo esporos foram lavados com 1 mL de solução de glicerina 40%, homogeneizados em vórtice e 1 µl desta suspensão foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 70 mL de meio Sabouraud.

4.8.3.2. Avaliação do crescimento dos microrganismos

Para determinar os períodos de adição do substrato exógeno ao meio de cultura, foi necessária a aferição do ciclo de crescimento dos microrganismos bem como a determinação de glicose do meio reacional. Para tanto, foram investigados pontos da curva de crescimento, incluindo o dia de inoculação, sendo dois frascos de suspensão analisados separadamente, como réplica, para cada ponto.

Para a avaliação do crescimento dos fungos, foram utilizados 20 Erlenmeyers contendo 70 mL de caldo Sabouraud. Após o inóculo, os Erlenmeyers foram colocados em agitador orbital de plataforma. A cada 12 horas, dois Erlenmeyers foram retirados para determinação de pH, massa seca e açúcares redutores.

4.8.4.. Determinações dos parâmetros físico-químicos

4.8.4.1. Determinação de massa seca

As alíquotas referentes aos tempos de crescimento foram agitadas em vórtice por 15 segundos em tubo de ensaio. Uma alíquota de 10 mL do mosto dos crescimentos dos fungos foi filtrada através de sistema de filtração a vácuo, utilizando-se membrana com poro de 0,45 μm , previamente pesada após a mesma ter sido mantida por 3 dias a temperatura de 50 °C. As membranas contendo o mosto foram lavadas com 10 mL de água destilada por três vezes, sendo levadas à estufa a 40°C. As amostras secas foram pesadas diariamente até a massa permanecer constante e destes valores foram descontados os pesos iniciais das membranas e dos papéis filtro.

4.8.4.2. Determinação de açúcares redutores

As determinações de açúcares redutores totais foram realizadas para cada tempo de fermentação e comparadas com a respectiva curva-padrão. O reagente de Somogyi foi preparado em duas soluções separadas, sendo estas misturadas no momento de uso. Em um balão volumétrico de 1.000 mL foram colocados 25 g de Na_2CO_2 , 25 g de bitartarato de potássio, 20 g de bicarbonato de sódio, 200 g de sulfato de sódio e completado o volume com água destilada. A segunda solução foi preparada colocando-se em um balão volumétrico de 100 mL 15 g de sulfato de cobre penta hidratado, uma gota de ácido sulfúrico concentrado e completado o volume com água destilada.

O reativo de Nelson foi preparado em um balão volumétrico de 1.000 mL, colocando-se 50 g de molibdato de amônio penta hidratado, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 6 g de arseniato de sódio. Dissolveu-se o molibdato de

amônio em 900 mL de água. Adicionou-se o volume total de ácido sulfúrico. Colocou-se arseniato de sódio dissolvido em água e misturou-se em banho de água à 37°C até completa dissolução. A solução foi guardada em frasco âmbar até o momento do uso.

A curva foi preparada com glicose anidra. Foram transferidos 160 mg de glicose para um balão volumétrico de 100 mL, produzindo-se a solução-estoque com concentração de 160 mg %. Pipetou-se 5,0 mL desta solução e colocou-se em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Foram colocados nos tubos em duplicata volumes crescentes de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, 1,0 mL e 1,2 mL da solução diluída de glicose a 8 mg%. Os tubos de ensaio continham as concentrações crescentes de 0,08 mg, 0,16 mg, 0,32 mg, 0,64 mg, 0,8 mg e 0,96 mg, respectivamente.

Os volumes foram completados até 2 mL com água destilada, adicionado mais 1 mL do reagente de Somogyi e mantidos em banho de água fervente por dez minutos. Após esfriar o tubo foi adicionado 1,0 mL do reagente de Nelson e mais 6,0 mL de água destilada a cada tubo. Os tubos foram agitados em vórtice por 15 segundos. O branco da reação foi feito em duplicata colocando-se 2 mL de água destilada por tubo, adicionando-se os reagentes e repetindo-se a mesma operação realizada nos tubos com diluições crescentes de glicose. Em seguida foi medida a absorbância de cada amostra.

4.8.4.3. Determinação de pH

A determinação foi realizada com medidor de pH sendo analisado diretamente no meio reacional a cada 12 horas, realizado em triplicata para cada ponto.

4.8.5. Preparação dos meios nutritivos

4.8.5.1. Meio Sabouraud (SB)

O meio líquido utilizado nos experimentos foi preparado adicionando-se 60 g para cada 1000 mL de água Milli-q até a formação de uma mistura homogênea. Após, 70 mL deste meio é colocado em erlenmeyers de 250 mL sendo estes fechados com rolhas de silicone, autoclavados durante 20 minutos. Os frascos foram então, retirados, deixados esfriar e acondicionados na geladeira até sua utilização.

4.8.5.2. Meio caldo Batata-dextrose (PDB)

Para a preparação do caldo PDB foram descascadas e picadas 100 g de batatas brancas e, após, colocadas em um recipiente contendo 1000 mL de água milli-q e 30 g de D(+)-glicose anidra e a mistura levada ao forno de microondas, em potência média por 10 minutos. Após, o caldo filtrado e alíquotas de 70 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, sendo estes cobertos com algodão, cobertos com alumínio e autoclavados por 20 minutos.

4.8.5.3. Tampão Fosfato de Potássio

A solução fosfato de potássio pH 7 foi preparada a partir da mistura de uma solução de KH_2PO_4 0,1 M e uma solução NaOH 0,1 M. Para a solução foram misturados 500 mL de solução de KH_2PO_4 0,1 M e 296 mL de solução NaOH 0,1 M. Após a mistura ser homogenizada foram transferidos 70 mL de mistura para frascos Erlenmeyer de 250 mL, sendo tampados com algodão e cobertos com alumínio e autoclavados por 20 minutos.

4.8.6. Preparação dos “pellets” de *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella elegans*

Os tubos inclinados contendo os esporos repicados foram retirados da geladeira e colocados em capela de fluxo laminar, sendo então abertos e adicionados 1 mL de glicerina 40% sendo a mistura homogeneizada. Após foram adicionados a Erlenmeyer de 250 mL contendo 70 mL de meio Sabouraud, PDB ou tampão. A mistura foi mantida sob agitação de 110 rpm, a 25°C durante 3 dias sendo observada a formação de “pellets”. O aspecto do mosto pode ser observado na **figura 46**.



Figura 46. Aspecto da cultura de fungos filamentosos

4.9. Adição do substrato ao meio de cultura

Após o tempo de incubação foram adicionados diretamente ao meio de cultura os substratos na quantidade de 60µl em relação ao meio sendo que, em certos casos, os substratos foram dissolvidos em 1 mL de metanol ou dimetilformamida (DMF). A temperatura de experimento foi de aproximadamente 25°C, sendo realizado sob agitação constante a 110 rpm.

Após a adição do substrato ao meio reacional foram retiradas alíquotas periódicas para acompanhar a reação. Para tanto, foram retirados 5 mL da solução reacional em capela de fluxo laminar e, após, foram adicionadas 3 gotas de HCl 0,1M e 5 mL de acetato de etila. A mistura foi então extraída utilizando extrator do tipo ultra-turrax durante aproximadamente 1 minuto, retirado o sobrenadante e levado a secar em evaporador rotatório ou equipamento de secagem a vácuo (*speed vac*). O resíduo foi então redissolvido com acetato de etila e realizada a análise através de injeção em cromatógrafo a gás, sendo que, para os monoterpenos, (*R*)- α -pineno, (*S*)- α -pineno, (*S*)- β -pineno e terebentina, foram coletadas alíquotas periódicas a cada dois dias.

Todos os experimentos foram acompanhados de controle contendo o substrato no meio reacional com a ausência de hifas, bem como meio com células sem a presença de substrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata sendo retiradas triplicatas de cada ponto. O isolamento, bem como a análise dos produtos obtidos foi realizada como descrito anteriormente no capítulo II ponto 2.4, 2.5, 2.6, 2.8, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Transformação de Monoterpenos por Culturas de Células de *Catharanthus rose*

5.1.1. Produtos de Transformação de (R)-(+)- α -pineno

De acordo com a literatura, os estudos envolvendo reações de biotransformação utilizando culturas de células de *Catharanthus roseus* têm-se mostrado promissores (HAMADA *et al.*, 1994; HAMADA *et al.*, 1997; SHIMODA *et al.*, 2002, YE *et al.*, 2002). Os monoterpenos destacam-se por apresentarem estruturas simples que possibilitam reações com culturas de células e a formação de produtos com poucos dias de experimento (LINDMARK-HENRIKSON *et al.*, 2004).

Para a realização dos estudos de biotransformação utilizando culturas de células vegetais de *Catharanthus roseus*, o trabalho teve como premissa à realização de uma curva de crescimento dos organismos, cuja importância está relacionada à possibilidade de adição do substrato ao meio reacional durante a fase crescimento exponencial da cultura, permitindo maiores taxas de conversão do produto de partida.

Inicialmente foi realizada uma curva de crescimento envolvendo a cultura de células de *Catharanthus roseus* a fim de avaliar o momento de inoculação do substrato ao sistema enzimático (**Figura 47.**). Observou-se que para esta cultura o crescimento exponencial ocorreu a partir do primeiro dia até o 5º dia, sendo considerado este o melhor intervalo para a adição do substrato ao meio reacional, procedimento este utilizado para os demais substratos.

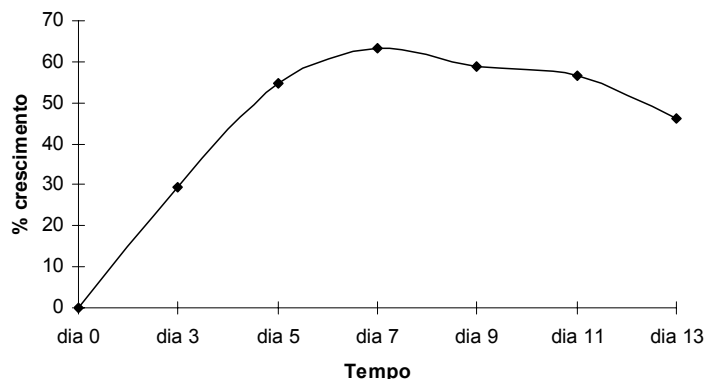


Figura 47.: Curva de crescimento das células de *Catharanthus roseus*

A **tabela 3** mostra os resultados para o experimento realizado em duplicata para cada ponto até o dia 13 da curva de crescimento de *C. roseus*.

Tabela 3.: Valores da curva de crescimento para culturas de células de *Catharanthus roseus**

	Dia 0	dia 3	dia 5	dia 7	dia 9	dia 11	dia 13
Ponto 1	0,0	30,66*	54,32	63,49	61,24	54,92	47,71
Ponto 2	0,0	28,13	55,37	62,9	56,32	57,99	44,98
Média	0,0	29,40	54,85	63,20	58,78	56,46	46,35
desvio	0,0	1,79	0,74	0,42	3,48	2,17	1,93

*Valores em gramas

Desta maneira partiu-se para a investigação das reações de biotransformação utilizando (*R*)-(+)- α -pineno como substrato. Para avaliar a capacidade de biotransformação inicialmente foi realizado um experimento, onde 60 μ L do substrato foi adicionado ao meio reacional após quatro dias de crescimento. Este experimento foi acompanhado pela retirada de alíquotas, durante 15 dias, até a conversão total do substrato. O meio reacional foi extraído sendo obtida a fração orgânica, analisada através de cromatografia a gás. O cromatograma obtido está apresentado na **figura 48**.

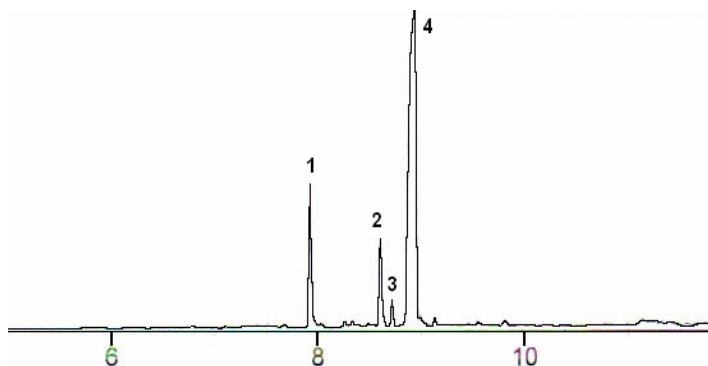


Figura 48.: Cromatograma de transformação do *R*-(+)- α -pineno. O produto de partida (tempo de retenção 4,8 minutos) não foi observado.

O cromatograma revelou a alta capacidade de biotransformação da cultura celular com formação de um produto majoritário com tempo de retenção de 8,92 minutos e bom rendimento de conversão (produto 4), após 15 dias de experimento. Estes resultados comprovam a eficiência da cultura utilizada, verificada pelo alto índice de conversão do substrato, resultado que corrobora dados apresentados em outros estudos (HAMADA *et al.*, 1994).

Um novo experimento foi realizado a fim de avaliar a cinética reacional e os demais produtos formados, bem como o tempo e as condições ótimas para a obtenção de melhores resultados. Foram então realizados três experimentos, adicionando-se 60 μ L do produto de partida em 100 mL de meio MS, sendo retiradas alíquotas periódicas até o 15^o dia de experimento.

Os resultados demonstram que, já a partir do 4^o dia de experimento, verificou-se a formação de compostos derivados cujo produto majoritário (produto 4) apresenta um máximo de obtenção (cerca de 82%) no 7^o dia de experimento, não havendo alteração significativa na cinética de reação até o 15^o dia e sendo por esse motivo, apresentados apenas os resultados obtidos para as alíquotas retiradas até o 7^o dia (**Tabela 4**).

Tabela 4.: Cinética da reação de (*R*)-(+)- α -pineno em cultura de *Catharanthus roseus**

Produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 4	Dia 7
(<i>R</i>)-(+)- α -pineno	100,0	100,0	91,7+/-0,7	73,1+/-0,2	2,4+/-0,8
Fenchol (tr 7,90)**	0,0	0,0	0,0	3,7+/-2,1	4,1+/-1,1
Borneol (tr 8,58)**	0,0	0,0	0,0	2,8+/-0,2	3,7+/-0,3
Terpinen-4-ol(tr 8,70)**	0,0	0,0	0,0	2,5+/-0,6	2,2+/-0,4
α - terpineol (tr 8,92)**	0,0	0,0	4,9+/-0,5	14,1+/-0,3	82,4+/-1,3

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

A formação do produto 4, bem como o consumo quase total do substrato, com alta taxa de conversão deste e formação dos produtos derivados, podem ser melhor avaliados através da representação gráfica (**Gráfico 1**).

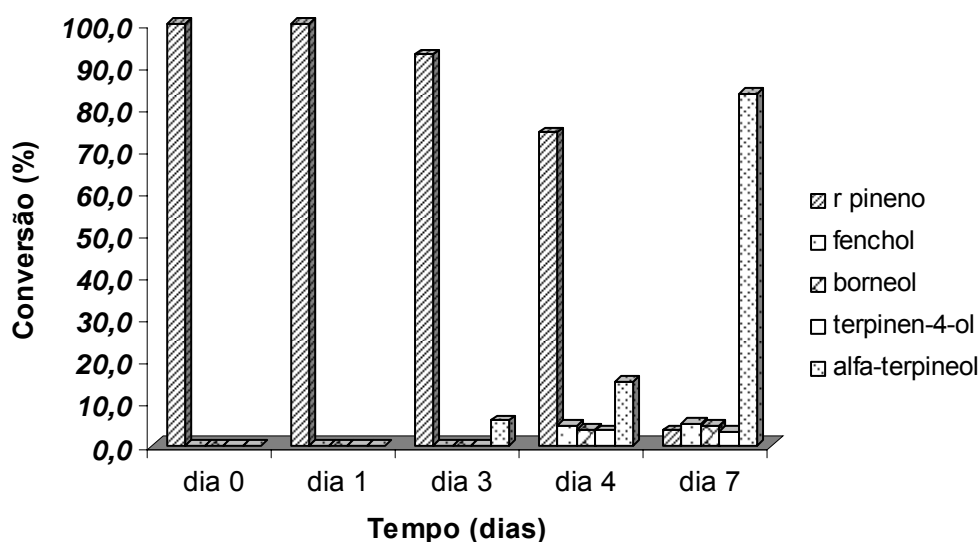


Gráfico 1.: Biotransformação de (*R*)-(+)- α -pineno por cultura de células em suspensão de *Catharanthus roseus*

As alíquotas referentes aos 7 dias iniciais de experimento foram então avaliadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (anexo 2). Os resultados foram comparados com espectroscopias (NIST 62, LIMBERG) e com dados da literatura, sendo realizada coinjeção do produto majoritário com padrão, o que tornou possível a caracterização do produto 4 como α -terpineol apresentando Índice de retenção (IR) de 1186. Os demais produtos foram identificados como fenchol (produto 1) e IR de 1110, borneol (produto 2) e IR de 1160 e terpinen-4-ol (produto 3) com índice retenção de 1172. As estruturas dos produtos formados podem ser melhor observadas na **figura 49**.

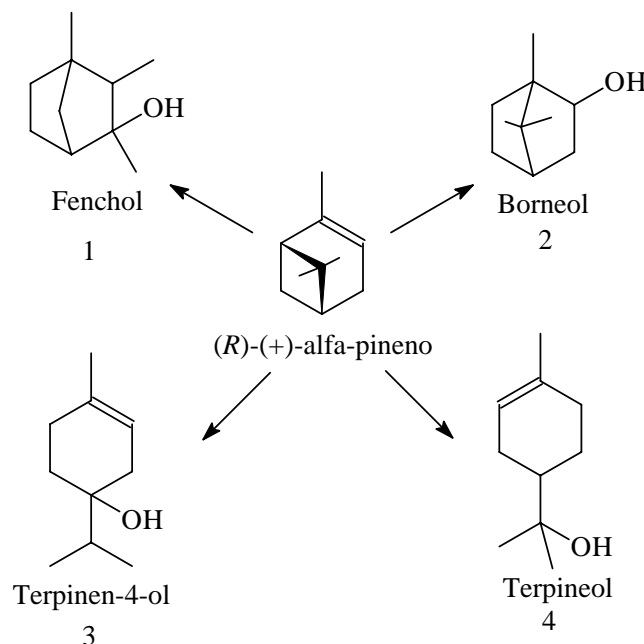


Figura 49: Produtos de biotransformação de (R)-(+)- α -pineno por suspensões celulares de *C. roseus*

O produto 4, caracterizado como α -terpineol, foi purificado através de CCD preparativa, em placa de gel de sílica, empregando-se como fase móvel uma mistura hexano:acetato de etila (1:1, V/V), o qual apresentou-se como um líquido incolor. O rendimento obtido para este composto foi de 29,7% (17 mg). Na tentativa de elucidar a estereoquímica do α -terpineol, utilizou-se coluna quiral. Nessa análise observou-se um tempo de retenção de 11,16 minutos e a presença

de um único pico para o α -terpineol (**Figura 50**). Após purificação por cromatografia em coluna, determinou-se rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} = +10,0$ com leve desvio positivo, para a fração enriquecida em α -terpineol.

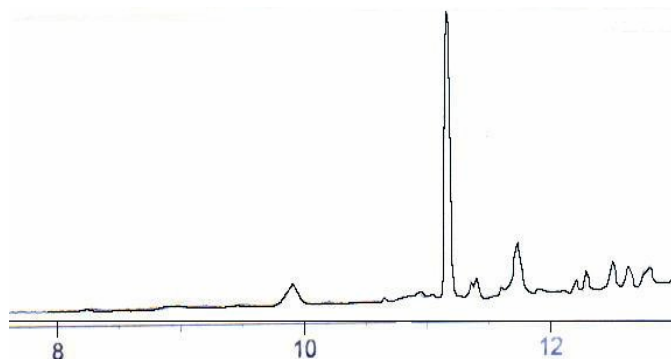


Figura 50.: Cromatograma do produto 4 em coluna quiral

O substrato de partida também foi utilizado como controle em reação apenas com meio de cultura. Foi observado que ocorreu o consumo total de (*R*)-(+)- α -pineno, comprovando estudos já realizados que verificaram a formação de produtos como pinoaldeído e canfolenealdeído (LIMBERGER, 2001). Muitos relatos descrevem que a autooxidação de monoterpenos como α -pineno levam à formação de produtos majoritários como verbenona, verbenol e sobrerol (MOORE *et al.*, 1956, BHATTACHARYYA *et al.*, 1960; ROTHENBERG *et al.*, 1998), os quais não foram identificados. Para o sistema utilizado não foi observada a formação de produtos de degradação e, portanto, todos os produtos de biotransformação obtidos podem ser atribuídos ao sistema enzimático da cultura celular em estudo.

5.1.2. Produtos de Transformação de (*S*)-(-)- α -pineno

Para este substrato também se realizou experimento onde o produto foi colocado em meio reacional durante 15 dias, sendo retiradas alíquotas periódicas, de forma idêntica ao procedimento adotado para o substrato descrito anteriormente. O experimento foi analisado através de cromatografia a gás e o cromatograma obtido encontra-se apresentado na **figura 51**.

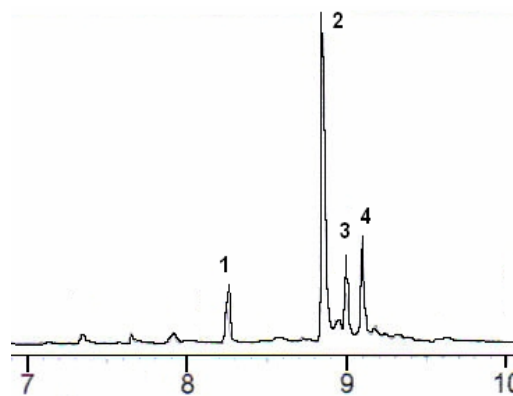


Figura 51.: Cromatograma transformação (S)-(-)- α -pineno. O substrato de partida, tempo de retenção de 4,8 minutos, não aparece no cromatograma.

Desta forma foi realizado novo experimento onde a análise cromatográfica revelou formação majoritária, após o 15^o dia de experimento, de um produto (produto 2) cujo tempo de retenção foi determinado em 8,92 minutos. Estes resultados comprovam a eficiência da cultura utilizada levando à formação de um composto majoritário, com alta taxa de conversão do substrato adicionado. A maior taxa de conversão foi observada para a alíquota retirada no 9^o dia. Porém, já a partir do 3^o dia, foi possível a quantificação dos produtos derivados provenientes da transformação do (S)-(-)- α -pineno. Os resultados encontram-se apresentados na **tabela 5**.

Tabela 5.: Cinética da reação de (S)-(-)- α -pineno em cultura de *Catharanthus*

*roseus**

Produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 4	Dia 7	Dia 9
(S)-(-)- α -pineno	100,0	100,0	81,5 \pm 1,0	81,6 \pm 0,2	9,6 \pm 0,3	9,4 \pm 0,3
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 7,90)**	0,0	0,0	1,9 \pm 0,7	1,9 \pm 0,3	4,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,6
A-terpineol (tr 8,92)**	0,0	0,0	9,6 \pm 0,8	9,2 \pm 1,1	77,1 \pm 1,7	83,9 \pm 0,5
Mirtenol (tr 9,09)	0,0	0,0	1,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	3,5 \pm 0,2	2,4 \pm 0,3
NI (tr 9,17)	0,0	0,0	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	3,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

*** NI: Produto Não Identificado

A formação do produto majoritário bem como o consumo quase total do substrato de partida também pode ser avaliado através da representação gráfica, onde é ilustrada a taxa de conversão do produto de partida a partir do 3º dia de experimento, assim como a formação dos demais produtos (**Gráfico 2**).

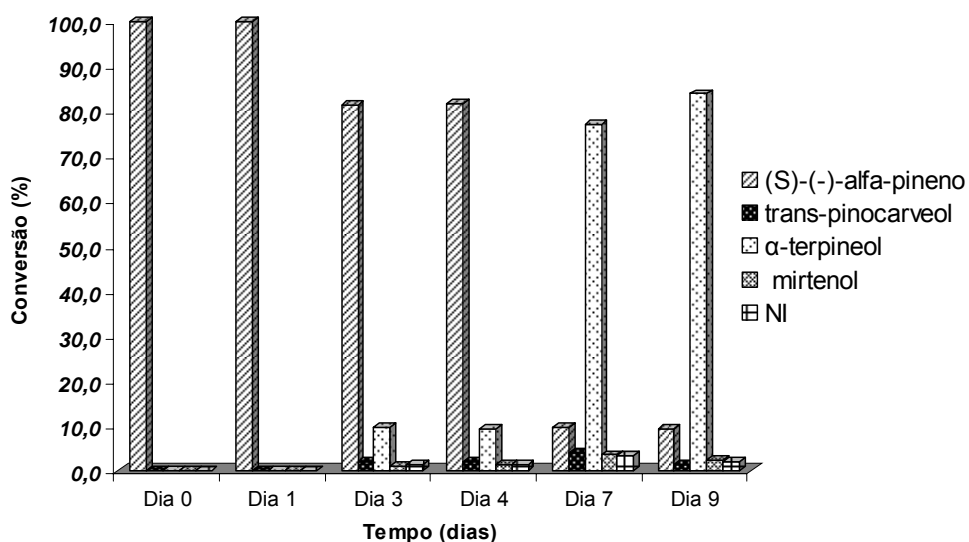


Gráfico 2: Biotransformação de (S)-(-)-α-pineno por suspensões celulares de *Catharanthus roseus*

As alíquotas referentes aos dias representados foram então avaliadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (anexo 3). Os resultados foram comparados com espectrotecas (NIST 62, LIMBERG) e com dados da literatura levando à caracterização do produto 2 como α-terpineol e índice de retenção (IR) de 1185. Os demais produtos foram identificados como *trans*-pinocarveol (produto 1) e IR de 1132, mirtenol (produto 3) e IR de 1192 e um produto não identificado (produto 4) com IR de 1198.

O produto 2, caracterizado como α-terpineol, foi purificado através de CCD preparativa em gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura hexano:acetato de etila (1:1, V/V). Este produto apresentou-se como um óleo

incolor idêntico ao obtido como produto de transformação de (*R*)-(+)- α -pineno com rendimento de 32,4% (19 mg). A caracterização da estereoquímica do produto foi realizada através de injeção em coluna quiral, observando-se para o α -terpineol, tempo de retenção igual a 11,15 minutos e a presença de um único pico (**Figura 52**), sendo descartada a presença de isômeros.

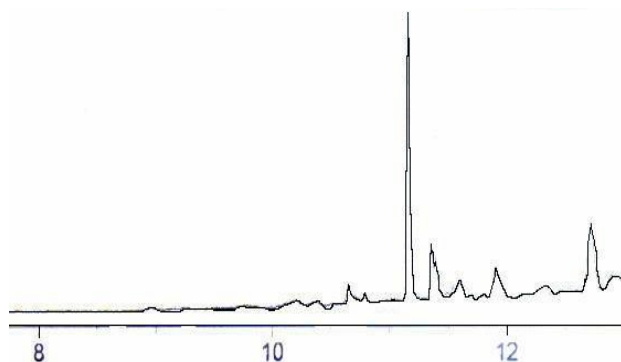


Figura 52.: Cromatograma da α -terpineol em coluna quiral

Após purificação por cromatografia em coluna, a fração enriquecida em α -terpineol apresentou rotação ótica de $[\alpha]_D = -21,0$, com leve desvio negativo. Os produtos formados encontram-se ilustrados na **figura 53**.

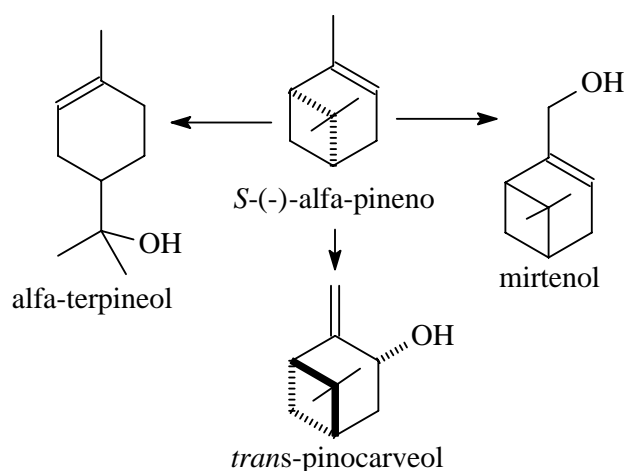


Figura 53.: Produtos de biotransformação de (*S*)-(-)- α -pineno em suspensões de células de *C. roseus*

O substrato de partida também foi conduzido como controle utilizando apenas meio de cultura e o produto de partida. Foi observado o consumo total de (S)-(-)- α -pineno comprovando estudos realizados que mostraram a formação de diversos produtos de degradação (LIMBERGER, 2001).

Muitos relatos descrevem que a autooxidação de monoterpenos como (S)-(-)- α -pineno leva (de forma idêntica ao do produto (R)-(+)- α -pineno) a produtos como verbenona, verbenol. Para o sistema utilizado, os produtos formados não coincidem com os produtos de degradação relatados na literatura, com exceção de mirtenol e, portanto, a maioria dos produtos de biotransformação podem ser atribuídos à catálise do sistema enzimático da cultura em estudo.

5.1.3. Produtos de Transformação de (S)-(-)- β -pineno

As reações de biotransformação com (S)-(-)- β -pineno foram realizadas durante 15 dias a fim de avaliar efetivamente o potencial de biotransformação da cultura celular. O experimento foi analisado através de cromatografia a gás cujo cromatograma é apresentado na figura abaixo (**Figura 54**).

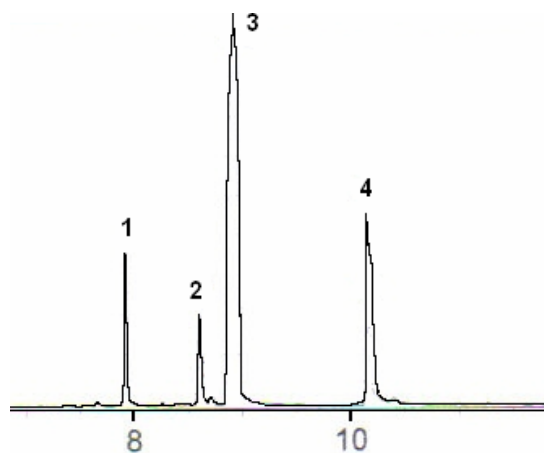


Figura 54.: Cromatograma transformação (S)-(-)- β -pineno. O substrato de partida, tempo de retenção de 5,2 minutos, não aparece no cromatograma.

Após o 15^o dia de experimento, os resultados revelam a formação de quatro produtos, sendo dois destes majoritários, com tempos de retenção determinados em 8,92 (produto 3) e 10,15 minutos (produto 4). Um novo experimento foi realizado, em triplicata, a fim de avaliar a cinética reacional. Os resultados obtidos são apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6.: Cinética da reação do de (S)-(-)- β -pineno em cultura de *Catharanthus roseus**

produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 4
(S)-(-)- β -pineno	100,0	73,0+/-1,4	3,3+/-1,2	1,5+/-1,3
Fenchol (tr 7,90)**	0,0	2,4+/-0,2	3,6+/-0,6	2,6+/-0,5
Borneol (tr 8,58)**	0,0	2,1+/-0,6	3,1+/-0,3	3,3+/-0,5
3 (tr 8,92)**	0,0	17,5+/-0,8	81,3+/-1,3	81,5+/-2,5
4 (tr 10,20)**	0,0	3,3+/-0,8	5,8+/-1,4	10,5+/-2,6

*Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

Os resultados demonstram que a partir do 1^o dia de experimento observamos o decréscimo do produto inicial com formação de uma mistura de quatro produtos, sendo um produto majoritário. A partir do 3^o dia observa-se predominância de um dos produtos, até 4^o dia, onde ocorre o máximo de formação conforme **gráfico 3**.

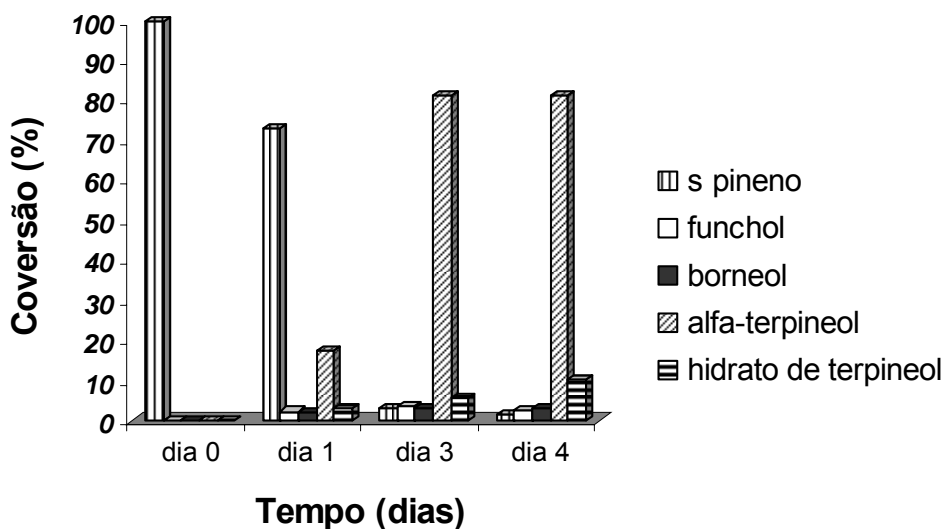


Gráfico 3.: Biotransformação de (S)-(-)-β pineno por *Catharanthus roseus*

As amostras foram, então, avaliadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (anexo 4). Os resultados foram comparados com espectrotescas (LIMBERG, 1998) e com dados da literatura levando à identificação do produto 3, caracterizado como α-terpineol e índice de retenção (IR) de 1186. Os demais produtos foram identificados como sendo funchol (produto 1) e IR de 1112, borneol (produto 2) e IR de 1162 e hidrato de terpineol (produto 4) e índice de retenção de 1292.

O produto majoritário foi purificado através de CCD preparativa, utilizando uma mistura hexano: acetato de etila (1:1, V/V), a partir da qual o produto foi obtido com rendimento de 23,7% (14 mg). Este apresentou-se como um óleo incolor idêntico ao obtido para (R)-(+)-α-pineno e (S)-(-)-α-pineno. Para avaliar a estereoquímica do produto foi realizada injeção em coluna quiral, observando-se a presença de um pico majoritário e praticamente puro, para o qual determinou-se um tempo de retenção igual a 11,09 minutos, conforme **figura 55**.

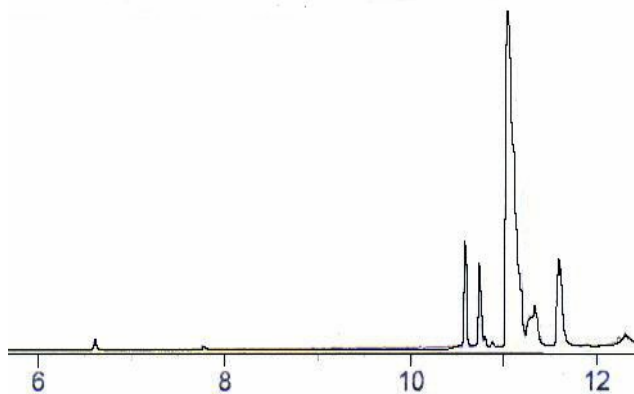


Figura 55.: Cromatograma de α -terpineol em coluna quiral

A avaliação da rotação ótica da fração purificada enriquecida em α -terpineol foi de $[\alpha]_D = -37,0$, com desvio negativo. As estruturas dos produtos formados podem ser observadas na **figura 56**.

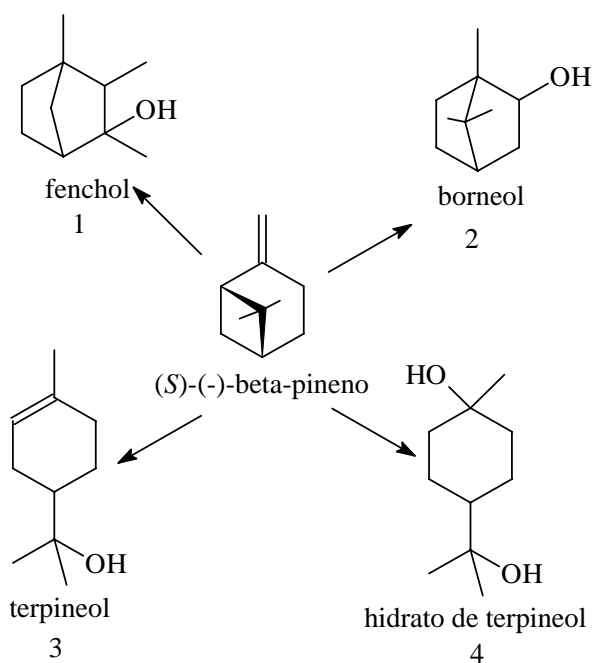


Figura 56.: Produtos de biotransformação de (S)-(-)- β -pineno em suspensões de células de *C. roseus*

A passagem de (S)-(-)- α -terpineol (produto 3) para hidrato de terpineol (produto 4) foi avaliada. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições dos experimentos anteriores, com a realização dos devidos controles, sendo adicionado 60 μ l de substrato em 100 mL de meio de cultura com células. Alíquotas foram retiradas até o 15º dia de experimento. Os resultados encontram-se apresentados na **tabela 7**.

Tabela 7.: Cinética da reação de (S)-(-)- β -pineno em cultura de *Catharanthus roseus**

Produto	Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 15
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 (tr 7,90)	0,0	5,6+/-0,7	6,2+/-2,5	5,7+/-2,3	5,9+/-0,8	4,8+/-2,3	6,4+/-0,8
2 (tr 8,58)	0,0	2,3+/-0,7	5,9+/-2,5	2,5+/-0,9	3,6+/-0,9	4,2+/-0,3	5,2+/-0,7
α -terpineol (tr8,92)	0,0	83,8+/-3,2	80,3+/-0,9	76,4+/-1,1	70,6+/-3,7	71,6+/-2,80	56,8+/-4,5
Hidrato de α -terpineol(tr 10,20)	0,0	8,4+/-2,6	9,2+/-7,7	12,5+/-7,5	18,8+/-8,0	17,6+/-3,9	30,7+/-6,7
5 (tr 10,38)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8+/-0,7

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

O experimento revelou que durante os quatro primeiros dias houve a formação de um produto majoritário (conforme experimento anterior) com tempo de retenção semelhante. A partir do 8º dia, observa-se um decréscimo de (S)-(-)- α -terpineol (produto 3) e a formação do hidrato de terpineol (produto 4), cujo tempo de retenção foi igual a 10,20 minutos (**Gráfico 4**).

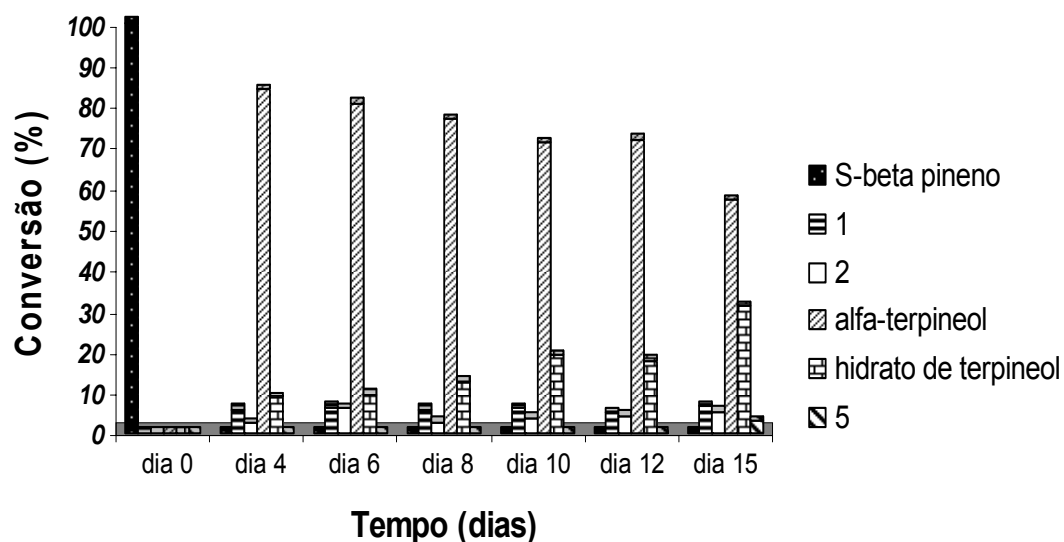


Gráfico 4.: Biotransformação de (S)-(-)-β-pineno por *Catharanthus roseus*

Durante a realização do experimento foram retiradas alíquotas para os dias quatro, seis, oito, dez, doze, quatorze e quinze, sendo observada formação máxima do produto 4, após o 15º dia de experimento. As alíquotas referentes a estes dias, foram então avaliadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Os resultados demonstraram que após a formação de α-terpineol, este foi transformado em um produto derivado, caracterizado como hidrato de terpineol (produto 4).

O produto 4 foi purificado através de CCD preparativa em gel de sílica, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano:acetato de etila (1:1, V/V), a partir da qual o produto pode ser obtido com rendimento de 35,1% (23 mg). Este apresentou-se como um óleo incolor, para o qual buscou-se definir a estereoquímica, sendo realizada injeção em coluna quiral. Como resultado dessa última análise, observou-se um tempo de retenção igual a 13,05 minutos para o o hidrato de terpineol (**Figura 57**).

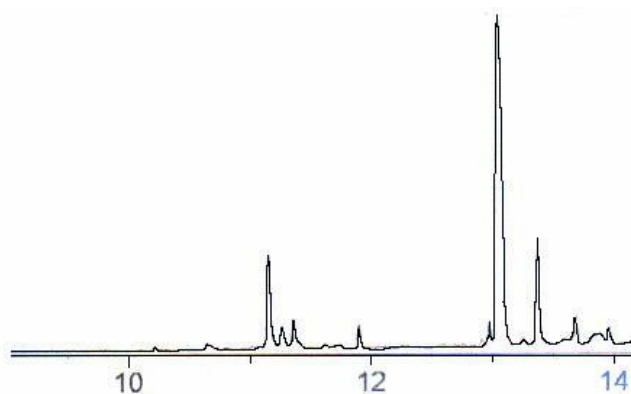


Figura 57: Cromatograma do produto 4 em coluna quiral

A avaliação da rotação ótica da fração enriquecida em terpineol, após purificação por cromatografia em coluna, foi de $[\alpha]_D = -11,0$, revelando leve desvio negativo.

O substrato de partida também foi conduzido como branco utilizando apenas meio de cultura e o produto de partida. Foi observado o consumo total de (S)-(-)- β -pineno comprovando estudos realizados que mostraram a formação de diversos produtos de degradação (LINDMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2004) não identificados. Para o sistema utilizado, os produtos formados não coincidem com os produtos de degradação relatados na literatura, com exceção de quantidades pequenas de α -terpineol e, portanto, todos os produtos de biotransformação são atribuídos ao sistema enzimático da cultura em estudo.

As reações realizadas com (S)-(-)- α -pineno e com (S)-(-)- β -pineno levaram à obtenção do mesmo produto majoritário, sugerindo que a formação de α -terpineol ocorra, para os três ensaios, através de um mesmo conjunto de enzimas

5.1.4. Produtos de Transformação do Óleo de Terebentina

Os resultados obtidos para os produtos isolados demonstraram a capacidade das culturas de células de *Catharanthus roseus* em transformar os monoterpenos (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -pineno. Isso possibilitou que novos estudos fossem realizados a fim de investigarmos reações utilizando óleo de terebentina. Este óleo apresenta em sua composição, dois constituintes monoterpênicos majoritários, α e β -pineno.

De acordo com estudos já realizados (KIMLAND e NORIN, 1972, PERSSON *et al.*, 1996), o óleo de terebentina apresenta composição de 42% de α pineno com relação de 62/38 para o isômero (*R*)-(+)- α -pineno e 27% de β -pineno com relação de 97/3 para o isômero (*S*)-(-)- β -pineno e 17% de limoneno. Em relação ao óleo utilizado observamos 49,9% de α -pineno e 38% de β -pineno, com relação de 80/20 para isômero (*S*)-(+)- α -pineno e quantidade superior a 99% de (*S*)-(-)- β -pineno. Desta forma, o experimento foi realizado com 60 μ l do óleo adicionado em 100 mL de meio MS contendo células, sendo acompanhado de controle com meio e inóculo. Os resultados são mostrados na tabela abaixo (**Tabela 8**).

Tabela 8.: Cinética da reação de terebentina em cultura de *Catharanthus roseus**

Produto	Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 15
α pineno	49,9	0,6-0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
β pineno	38,2	1,3-1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fenchol (tr 7,90)**	0,0	10,5+/-1,8	7,9+/-1,7	9,7+/-1,6	8,4+/-3,7	8,6+/-0,6	7,4+/-3,3
Borneol(tr 8,58**)	0,0	4,3+/-0,8	4,2+/-0,1	5,8+/-1,8	6,7+/-1,5	5,5+/-0,6	6,3+/-1,2
α terpineol (tr8,92**)	0,0	69,4+/-9,9	81,0+/-1,9	72,6+/-7,0	65,1+/-4,3	61,2+/-3,6	53,5+/-5,4
Hidrato de α -terpineol(tr 10,20**)	0,0	1,1+/-0,7	2,6+/-1,4	7,7+/-5,7	16,9+/-3,3	18,8+/-1,5	30,1+/-5,7

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

Os produtos obtidos e o cromatograma deste experimento podem ser observados no gráfico abaixo (**Gráfico 5**).

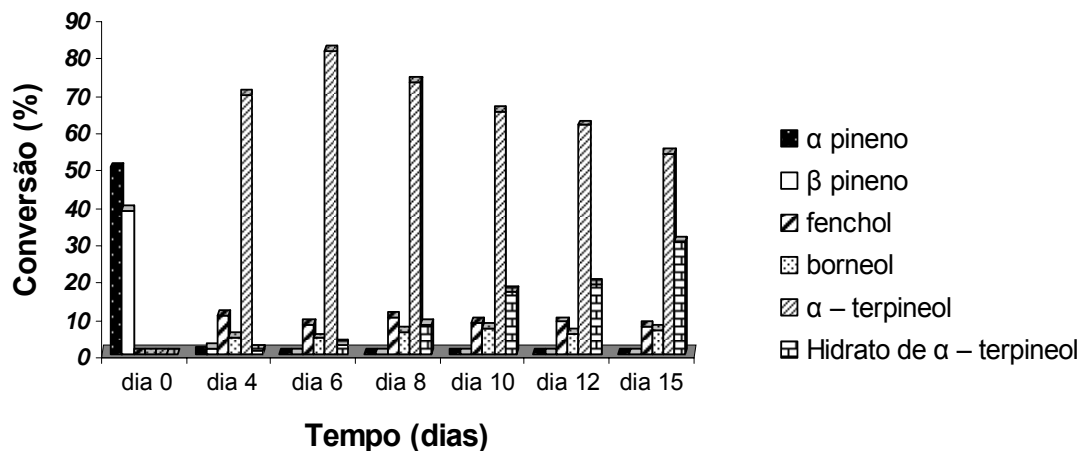


Gráfico 5.: Biotransformação de terebentina por *Catharanthus roseus*

De acordo com os cromatogramas obtidos e os dados de espectrometria de massas e de acordo com a comparação com dados da literatura e com espectrotescas (LIMBERG, 1998), os produtos foram identificados como fenchol (produto 1) e índice de retenção (IR) de 1112, borneol (produto 2) e IR de 1162, α-terpineol (produto 3) e IR de 1187 e hidrato de α-terpineol (produto 4) com IR de 1292,

O produto majoritário foi purificado através de CCD preparativa em gel de sílica, utilizando-se como fase móvel uma mistura hexano:acetato de etila (1:1, V/V), onde o produto foi obtido com pureza satisfatória. O produto 3, apresentou-se como um óleo amarelado com 21,6% de rendimento (13mg), enquanto o produto 4, apresentou-se como um óleo incolor com rendimento de 26,7 (16 mg). Na tentativa de determinar a estereoquímica destes produtos, foram realizadas injeções em coluna quiral, para as quais foram observados tempos de retenção iguais a 11,15 e 13,05, para o α-terpineol e o hidrato, respectivamente.

O substrato de partida também foi conduzido como controle utilizando-se apenas meio de cultura e o produto de partida. Verificou-se total conversão do óleo

de terebentina, sendo observados os mesmos produtos de degradação anteriormente descritos sendo, portanto, todos os produtos de biotransformação atribuídos ao sistema enzimático.

Em ensaio utilizando-se o óleo de terebentina como produto de partida, verificou-se a conversão total do substrato e a formação de α -terpineol como produto majoritário. Os resultados comparativos podem ser visualizados na **tabela 9**.

Tabela 9.: Produtos biotransformação monoterpenos

<i>Catharanthus roseus</i>				
	(R)-(+)- α -pineno	(S)-(-)- α -pineno	(S)-(-)- β -pineno	Terebentina
Produtos	Dia 7	Dia 9	Dia 4	Dia 6
fenchol	4,1+/-1,1	0,0	2,6+/-0,5	7,9+/-1,7
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	1,2+/-0,6	0,0	0,0
Borneol	3,7+/-0,3	0,0	3,3+/-0,5	4,3+/-0,1
terpin-4-ol	2,2+/-0,4	0,0	0,0	0,0
α -terpineol	82,4+/-1,3	83,9+/-0,5	81,5+/-2,5	81,0+/-1,9
Mirtenol	0,0	2,4+/-0,3	0,0	0,0
hidrato de terpineol	0,0	0,0	10,5+/-2,6	2,6+/-1,4

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção em minutos

O produto majoritário da conversão de todos os substratos utilizados foi α -terpineol, em proporções variando entre 81 e 84%. A bioconversão para o substrato (S)-(-)- β -pineno, foi observado, após o 4º dia de experimento, a formação do composto hidrato de terpineol com conversão de 10%. Os demais produtos observados foram obtidos em baixas proporções.

O produto α -terpineol foi avaliado quanto à pureza e estereoquímica através de injeção em coluna quiral, com a obtenção de um pico principal. Posteriormente, quando avaliado o desvio ótico, foi observado leve desvio do produto formado, sendo este positivo para o produto proveniente da transformação de (R)-(+)- α -

pineno e negativo quando obtido a partir das reações utilizando (S)-(-)- α -pineno e (S)-(-)- β -pineno.

Segundo trabalhos realizados por LINDMARK-HENRIKSSON (2003), as oxidações utilizando sistemas enzimáticos e envolvendo pinenos, levando à formação de α -terpineol, podem ser atribuídas à clivagem oxidativa do anel e posterior oxidação terminal, produzindo o respectivo álcool terpênico. Os processos enzimáticos também podem estar associados com reações envolvendo monoxigenases e a presença de co-fatores. Alguns estudos relacionam o desempenho satisfatório do sistema enzimático ao citocromo P-450, sendo possível que este componente esteja atuando como co-fator nas reações. (McCASKILL e CROTEAU, 1997).

O α -terpineol é um monoterpeno pouco abundante na natureza, com grande potencialidade farmacológica, sendo encontrado principalmente no óleo de *Melaleuca alternifolia*. Este terpeno está entre os principais compostos empregados na indústria como flavorizante tipo floral e doce, além de existirem relatos de sua atividade antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiinflamatória (ADAMS *et al.*, 2003).

As reações realizadas com monoterpenos e culturas de células vegetais de *Catharanthus roseus* mostraram a boa capacidade de conversão deste sistema. Estudos já realizados com pinenos mostram que estes substratos são muitas vezes modificados geralmente por oxidação (McCASKILL e CROTEAU, 1997), onde as transformações enzimáticas incluem hidroxilações realizadas pelo citocromo P-450. A hidroxilação de β -pineno com *Hyssopus officinalis* com formação de pinocanfona e isopinocanfona é um exemplo (KARP e CROTEAU, 1992). Além disso, transformações mediadas por culturas de células de *Picea abies* (LINDEMARK-HENRIKSSON *et al.*, 2003), possibilitaram que monoterpenos como alfa e beta pinenos formassem produtos via reações de oxidações alílicas e abertura de anel, semelhante às obtidas para *Catharanthus roseus*.

Pode-se verificar que muitos dos produtos obtidos nos ensaios realizados já foram anteriormente relatados (LINDEMARK-HENRIKMAN *et al.*, 2004), tais como pinocarveol e mirtenol, produtos de oxidação dos pinenos, preservando a estrutura bicíclica. Nestas reações o composto α -terpineol foi formado em baixas concentrações. Um relato recente mostra conversões de β -pineno para terpineol como produto principal, utilizando *Aspergillus niger*, entretanto com obtenção de apenas 4% (TONIAZZO *et al.*, 2005), o que demonstra a relevância dos resultados obtidos em alguns casos com formação de até 90%.

Quando avaliamos estudos realizados com *Catharanthus roseus* como sistema enzimático, observa-se que monoterpenos como geraniol, nerol e carvona são facilmente hidroxilados, possibilitando a formação de um grande número de compostos (HAMADA *et al.*, 1997). Este fato confirma a potencialidade do sistema em realizar reações de hidroxilação, fato este observado nos estudos deste trabalho.

A formação dos produtos de biotransformação através da oxidação de monoterpenos pode ser sugerida através da formação de cátions, derivados de pinenos. Estes cátions sofrem rearranjos e, através da adição de nucleófilos, formam diversos compostos, geralmente hidroxilados. As estruturas dos compostos obtidos com monoterpenos e *C.roseus* ratificam a utilização desta via mecanística na formação da maioria dos produtos derivados do cátion mentila, α -terpenila, com presença também de produtos de oxidação direta do esqueleto pinano.

O experimento utilizando óleo de terebentina, composto basicamente pela mistura de α e β pineno, foi realizado frente a *C. roseus*, uma vez que estes pinenos apresentaram resultados satisfatórios neste sistema. O experimento mostrou que o óleo foi completamente consumido e como produto principal obteve-se α -terpineol de forma idêntica aos experimentos quando utilizados individualmente, demonstrando potencialidade do emprego desta matéria-prima.

5.2. Biotransformação de monoterpenos por microrganismos

O estudo realizado com culturas de células de *Catharanthus roseus* possibilitou verificar reações de ensaios de biotransformação para todos os monoterpenos utilizados, observando-se a conversão total do substrato de partida e a formação de vários produtos. A fim de estabelecer novas condições reacionais, em sistemas mais simples, os substratos foram estudados em reações com culturas de fungos filamentosos de *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*.

Para as suspensões celulares dos fungos filamentosos *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina* foi realizada uma curva de crescimento das culturas, o que foi de suma importância para que a adição do substrato ao meio reacional fosse realizada durante a fase de crescimento exponencial, permitindo alcançar o máximo de conversão.

Os experimentos foram realizados de forma idêntica ao protocolo utilizado com cultura vegetal, porém, precedido do doseamento de glicose. Foram realizadas curvas para avaliar o ciclo de crescimento dos fungos em estudo. Para tanto, foram analisadas a massa de fungo e também a quantidade de glicose no meio (**Tabela 10.**).

Tabela 10.: Valores de glicose e massa seca para o fungo *C. elegans**

Tempo (Horas)	Valor Médio (g/l)	Desvio padrão	Massa (g)	Desvio Padrão
0	17,91	0,51	0,118	0,02
12	17,55	0,15	0,129	0,03
24	16,84	0,39	0,197	0,03
36	13,35	2,42	0,876	0,08
48	8,56	4,43	1,336	0,08
60	4,78	2,84	1,661	0,01
72	1,84	1,33	2,087	0,07
84	1,26	0,89	2,437	0,21
96	0,47	0,22	2,492	0,24

* Valores para duplicada de cada ponto

Estes dois fatores possibilitam analisar a faixa de crescimento exponencial e o consumo de açúcar, permitindo avaliar o melhor momento para iniciar os experimentos de biotransformação. Os resultados para o fungo *Cunninghamella elegans* são mostrados abaixo (**Gráfico 6.**).

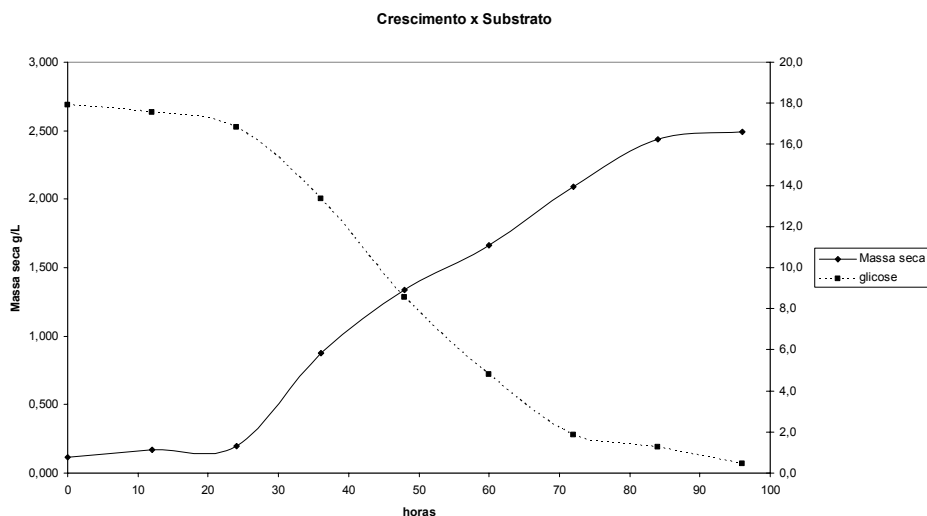


Gráfico 6.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo *Cunninghamella elegans* em meio Sabouraud.

O gráfico mostra que para o fungo *Cunninghamella elegans*, a partir de 20 horas, a massa celular aumentou, enquanto foi observada uma diminuição da concentração de glicose do meio, chegando a valores muito baixos em aproximadamente 80 horas. Desta forma, se estabeleceu que o substrato, quando adicionado no terceiro dia, garante a fase de crescimento exponencial, aumentando a taxa de metabolismo e diminuindo a quantidade de glicose no meio reacional, fazendo com que o substrato seja importante fonte de energia para a célula. Foram ainda analisadas as variações de pH durante o crescimento dos fungos. Os valores podem ser observados na **tabela 11.** abaixo.

Tabela 11.: Valores de pH para o fungo *C. elegans**

Tempo (horas)	pH	Desvio padrão
0	6,95	0,14
12	6,93	0,11
24	6,68	0,16
36	4,62	1,37
48	3,43	0,73
60	3,17	0,19
72	3,03	0,33
84	3,23	0,49
96	3,20	0,52

* Valores para duplicada de cada ponto

Para o fungo *Cunninghamella elegans* os resultados mostraram decréscimo com os valores chegando a aproximadamente 3 (**Gráfico 7.**). Isto ocorre porque o consumo de glicose e de outras fontes energéticas leva a formação de subprodutos como diversos ácidos orgânicos (ácido láctico).

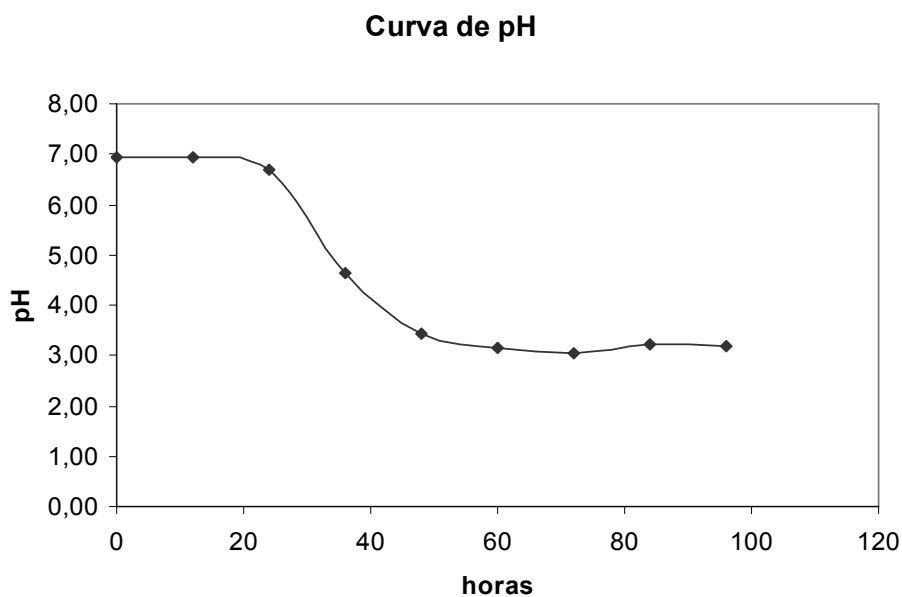


Gráfico 7.: Variação de pH para o fungo *Cunninghamella elegans* cultivado em meio SB

Para os fungos *C. echinullata* e *M. isabellina* também foram realizadas as curvas de crescimento sendo avaliada massa seca, glicose e pH. Inicialmente são

apresentados resultados de glicose e massa seca para o fungo *C. echinulata* (Tabela 12.).

Tabela 12.: Valores de glicose e massa seca para o fungo *C. echinulata**

Tempo (Horas)	Valor Médio (g/l)	Desvio padrão	Massa (g)	Desvio Padrão
0	20,17	0,98	1,099	0,07
14	18,60	2,07	1,038	0,07
24	16,71	0,71	1,327	0,08
38	9,99	0,57	1,771	0,05
49	2,63	0,14	2,900	0,01
62	0,37	0,22	4,238	0,01
70	0,01	0,00	4,969	0,00
86	0,00	0,00	5,626	0,06
110	0,00	0,00	5,854	0,19

* Valores para duplicada de cada ponto

Os resultados podem ser melhor avaliados através do **Gráfico 8.**

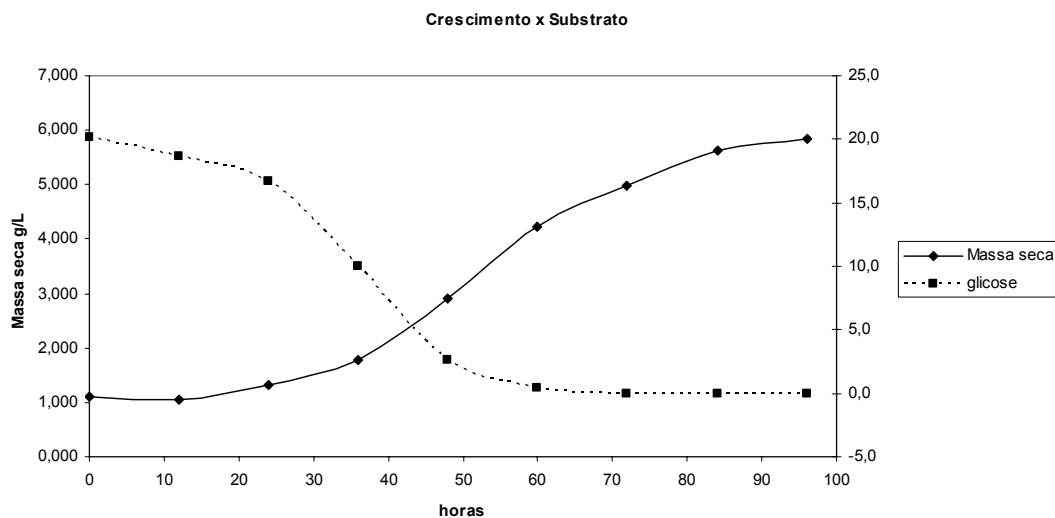


Gráfico 8.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo *C. echinulata* em meio SB.

O gráfico mostra que para o fungo *C. echinulata*, a partir de 30 horas o consumo de glicose diminuiu bruscamente enquanto o fungo seguia seu crescimento demonstrando crescimento exponencial a partir de 40 horas.

Os valores de pH podem ser observados na **Tabela 13.** abaixo.

Tabela 13.: Valores de pH para o fungo *C. echinulata**

Tempo (horas)	pH	Desvio padrão
0	5,50	0,06
12	5,48	0,00
24	5,40	0,18
36	4,28	0,99
48	3,64	0,18
60	3,31	0,01
72	3,53	0,01
84	3,45	0,13
96	3,62	0,06

* Valores para duplicada de cada ponto

Para o fungo *Cunninghamella echinulata* os resultados mostraram decréscimo com os valores chegando a aproximadamente 3,62 unidades de pH. Os valores mostraram valores decrescentes relativos ao consumo de glicose do meio reacional. Os resultados podem ser melhor avaliados através do **gráfico 9.**

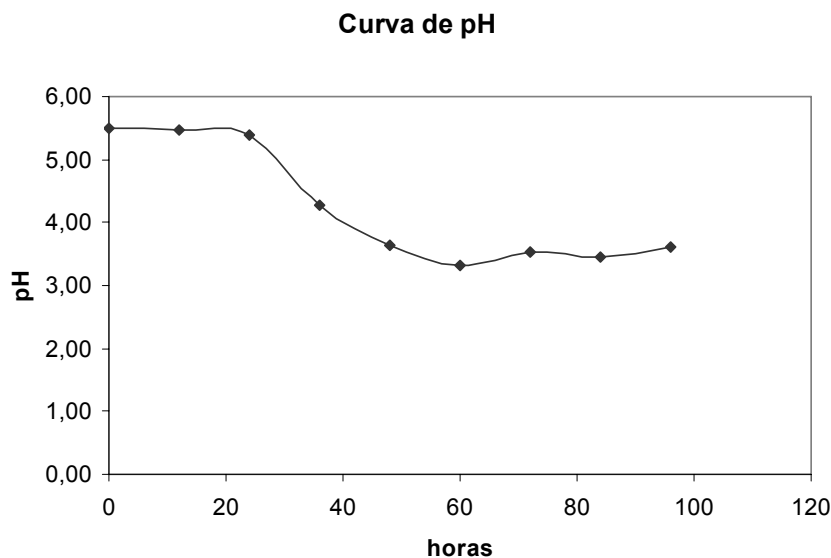


Gráfico 9.: Variação de pH para o fungo *Cunninghamella echinulata* cultivado em meio SB.

Finalmente foram realizados experimentos com o fungo *M. isabelina*, sendo realizadas as medidas de massa seca e glicose. (Tabela 14.).

Tabela 14.: Valores de glicose e massa seca para o fungo *M. isabelina**

Tempo (Horas)	Valor Médio (g/l)	Desvio padrão	Massa (g)	Desvio Padrão
0	15,60	1,58	1,185	0,06
14	14,71	0,32	1,240	0,06
24	13,14	2,28	2,430	0,01
38	0,80	0,01	3,905	0,03
49	0,01	0,00	4,375	0,01
62	0,01	0,00	5,240	0,00
70	0,01	0,00	5,940	0,01
86	0,00	0,00	6,600	0,01
110	0,00	0,00	7,060	0,07

* Valores para duplicada de cada ponto

Os resultados podem ser observados através do **Gráfico 10.**

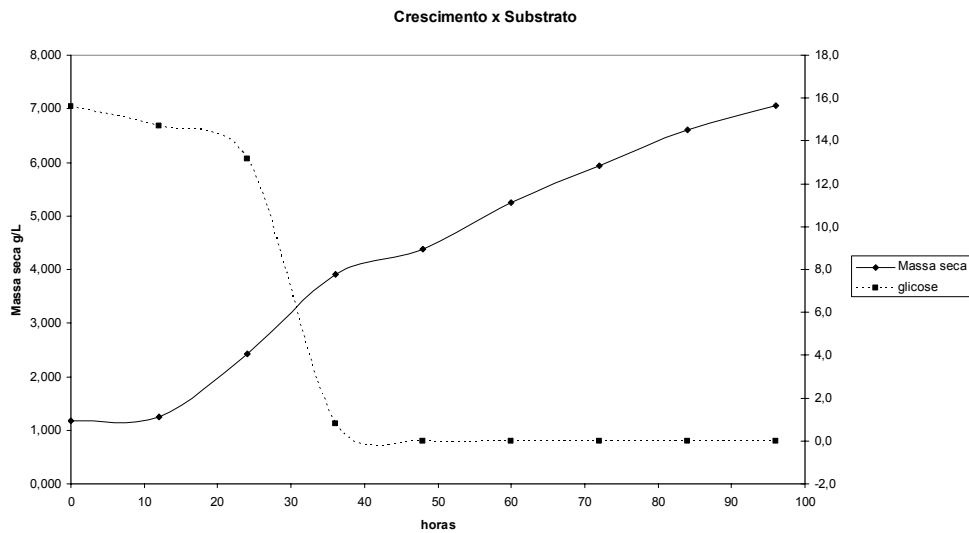


Gráfico 10.: Curva de crescimento e consumo de glicose do fungo *M. isabellina* em meio SB.

O gráfico mostra que para o fungo *Mortierella isabellina*, a partir de 30 horas o consumo de glicose chegou ao seu valor mínimo enquanto o fungo seguia seu crescimento demonstrando crescimento exponencial a partir de 40 horas.

Os valores de pH podem ser observados na **Tabela 15.** abaixo.

Tabela 15.: Valores de pH para o fungo *M. isabellina**

Tempo (horas)	pH	Desvio padrão
0	5,80	0,01
12	5,78	0,06
24	5,22	0,46
36	3,61	0,03
48	3,54	0,01
60	3,44	0,03
72	3,05	0,05
84	3,25	0,60
96	2,76	0,11

* Valores para duplicada de cada ponto

Para o fungo *M. isabellina* os resultados mostraram decréscimo com os valores chegando a aproximadamente duas unidades de pH (**Gráfico 11.**). Os valores se mostraram muito semelhantes aos obtidos anteriormente.

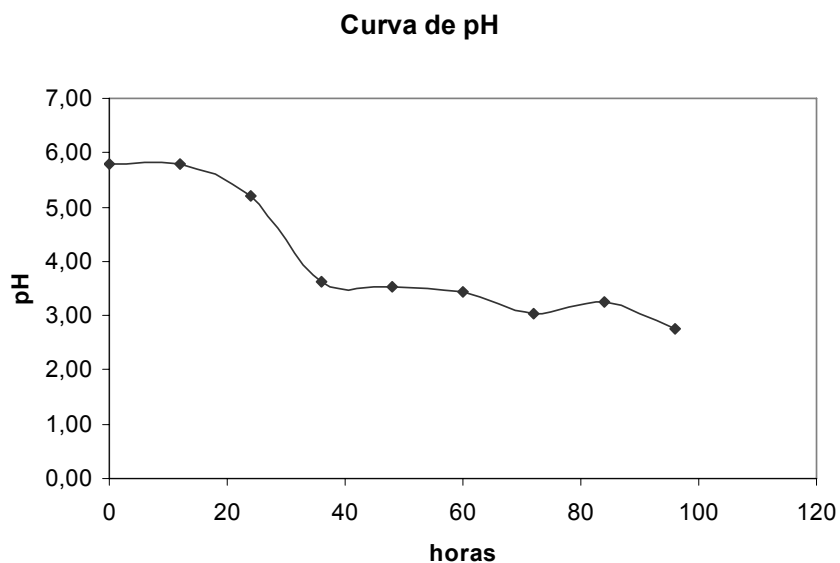


Gráfico 11.: Variação de pH para o fungo *M.isabellina* cultivado em meio SB.

Para as reações de biotransformação utilizando os monoterpenos todos os experimentos foram realizados em meio Sabouraud e o substrato adicionado no dia 3, sendo colocado 60 μ L em 70 mL de meio. Para o experimento foram retiradas alíquotas periódicas sempre acompanhadas de controle. Os resultados demonstraram que a adição do substrato deve ser realizada no terceiro dia de crescimento coincidindo com o decréscimo da taxa de glicose no meio e o período de crescimento exponencial, induzindo os microrganismos a utilizar fontes alternativas de carbono.

5.2.1. Produtos de Transformação de (*R*)-(+)- α -pineno com fungos filamentosos

Inicialmente foi utilizado como substrato (*R*)-(+)- α -pineno no estudo com os fungos filamentosos. Os resultados são mostrados na **tabela 16.** Após o tempo de incubação, o meio reacional foi extraído e obtida a fração orgânica, sendo analisada através de cromatografia à gás.

Tabela 16.: Cinética da reação do de (*R*)-(+)- α -pineno com fungos filamentosos *

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(<i>R</i>)-(+)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	9,2 \pm -1,5	12,3 \pm -1,3	17,1 \pm -1,6
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,11) **	0,0	13,6 \pm -1,1	0,0	0,0
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	13,7 \pm -5,4	0,0	0,0
α -terpineol (tr 5,55)**	0,0	26,7 \pm -1,3	32,5 \pm -1,7	26,0 \pm -5,7
Mirtenol (tr 5,70)**	0,0	15,7 \pm -1,3	13,1 \pm -3,7	6,7 \pm -1,1
Verbenona (tr 5,80)**	0,0	21,1 \pm -3,3	39,7 \pm -0,9	36,8 \pm -1,8
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(<i>R</i>)-(+)- α -pineno	100,0	11,3 \pm -0,1	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	4,6 \pm -1,0	10,2 \pm -1,2	12,1 \pm -4,5
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,11) **	0,0	8,5 \pm -1,2	9,1 \pm -0,6	10,0 \pm -2,1
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	11,1 \pm -8,6	9,0 \pm -0,5	4,0 \pm -0,9
α -terpineol (tr 5,55)**	0,0	34,8 \pm -3,1	42,1 \pm -1,2	33,2 \pm -4,0
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	9,2 \pm -1,5	8,5 \pm -1,0	11,8 \pm -1,1
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	21,5 \pm -2,1	34,3 \pm -3,2	17,2 \pm -1,4

<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
<i>R</i> -(+)-alfa-pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	5,4+/-2,2	12,0+/-1,9	12,7+/-1,6
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,11) **	0,0	9,9+/-1,2	9,2+/-0,8	14,7+/-1,7
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	2,0+/-0,5	3,4+/-0,9	8,4+/-0,5
α -terpineol (tr 5,55)**	0,0	28,8+/-1,4	34,5+/-3,6	34,0+/-1,8
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	6,7+/-1,5	5,9+/-0,8	11,5+/-2,9
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	29,2+/-6,9	30,4+/-0,6	20,4+/-7,0

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção produtos principais em minutos

NI: Produto Não Identificado

Para o fungo *Cunninghamella elegans* a formação dos produtos majoritários, bem como o consumo parcial do substrato de partida (*R*)-(+)- α -pineno podem ser avaliados através do gráfico, onde se mostra a alta taxa de conversão do produto de partida. A partir do primeiro dia observou-se a formação de seis produtos, sendo que o produto majoritário (6) mostrou máxima conversão no segundo dia de experimento (**Gráfico 12.**).

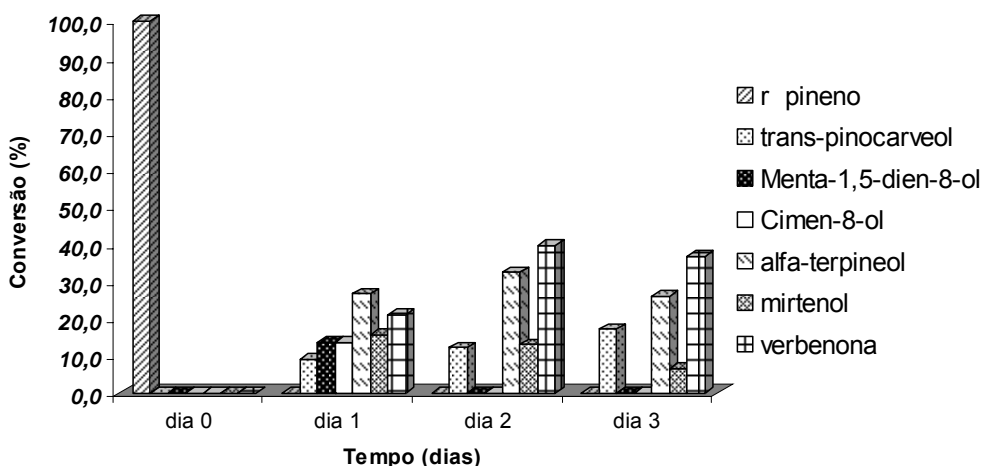


Gráfico 12.: Biotransformação de (*R*)-(+)- α -pineno com cultura de *Cunninghamella elegans*

Os resultados mostram que a partir do primeiro dia, seis novos produtos foram formados, e com o decorrer do experimento, foi observado o decréscimo do composto 2 e 3 e o aumento dos demais obtendo-se como resultado, 4 produtos. O rendimento total para a reação foi de 31,3% (17 mg). De acordo com os cromatogramas obtidos (anexo 5), os dados de espectrometria de massas e através de comparação com dados da literatura os produtos foram identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção (IR) de 1136, α -terpineol (4) e IR de 1186, mirtenol (5) e IR de 1192 e verbenona (6) com IR de 1198 cujas estruturas podem ser observadas na **figura 58**.

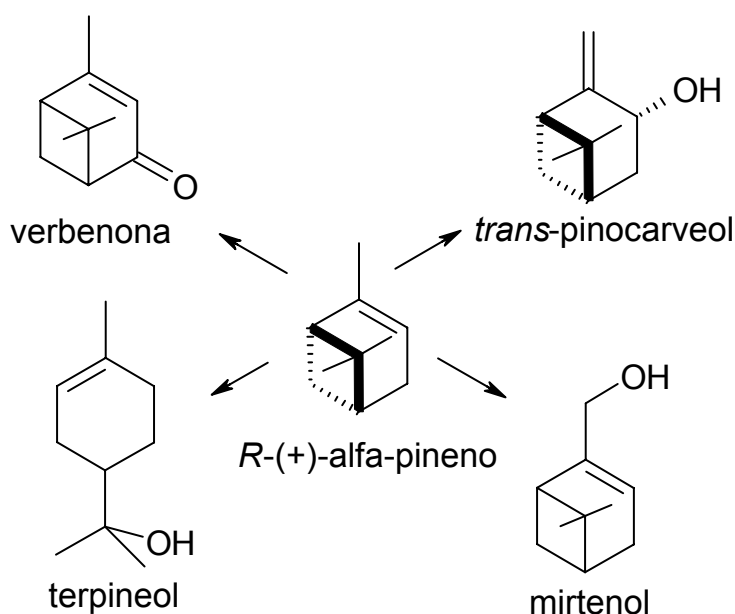


Figura 58.: Produtos de biotransformação de (*R*)-(+)- α -pineno com o fungo *C.elegans*.

O experimento utilizando como substrato (*R*)-(+)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata* mostrou que o produto de partida não foi totalmente consumido no primeiro dia. Posteriormente, foi observada a formação de uma mistura de seis produtos. A reação se mostrou rápida, com o máximo de conversão do produto de partida no segundo dia de experimento (**Gráfico 13**).

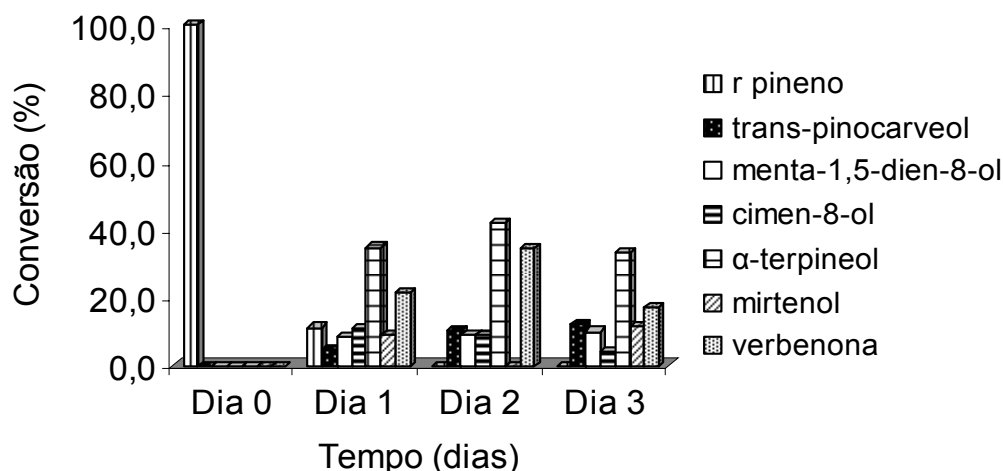


Gráfico 13.: Biotransformação de (*R*)-(+)- α -pineno com culturas de *Cunninghamella echinulata*

Os resultados mostram a formação de seis substâncias. De acordo com os cromatogramas obtidos, os dados de espectrometria de massas (anexo 6) e de acordo com a comparação com dados da literatura os produtos foram identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção (IR) de 1135, menta-1,5-dien-8-ol (2) e IR de 1166, cimen-8-ol (3) IR de 1180, α -terpineol (4) e IR de 1185, mirtenol (5) e índice de retenção de 1192 e verbenona (6) com IR de 1198, sendo o α -terpineol, produto majoritário, obtido com alta taxa de conversão (**Figura 59**). O rendimento total obtido foi de 37,2% (19 mg), considerando a massa total obtida após o tempo de experimento de 3 dias.

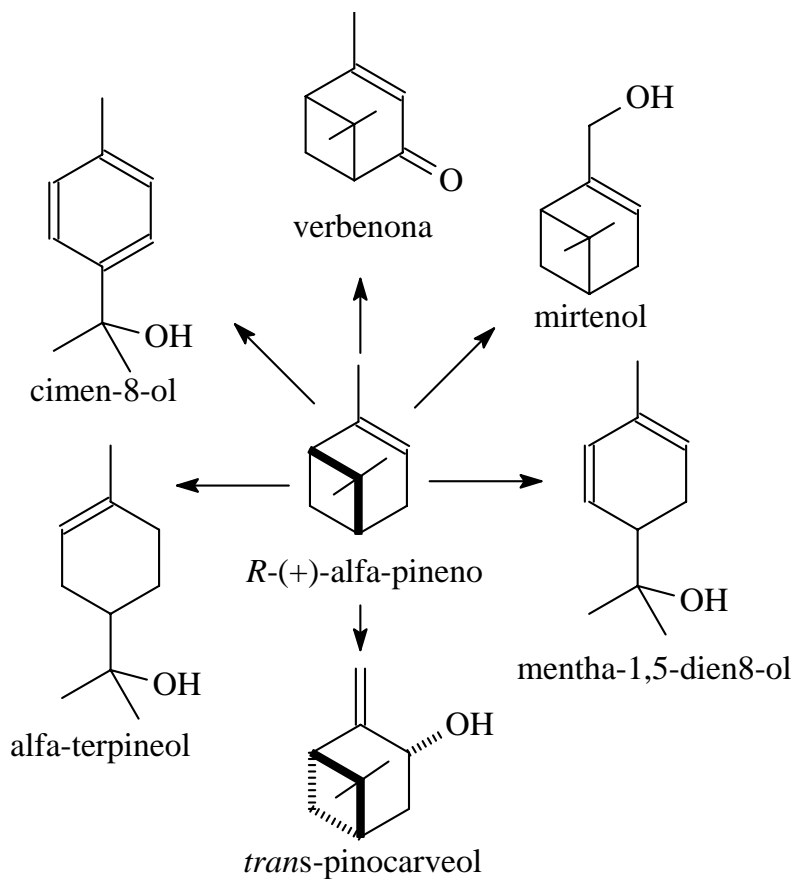


Figura 59.: Produtos de biotransformação de *R*-(+)- α -pineno com o fungo *C. echinulata*.

Na reação utilizando *Mortierella isabellina* a formação do produto majoritário com pode ser avaliada através do gráfico, onde se verificou a alta taxa de conversão do produto de partida. O resultado se mostrou semelhante ao obtido para *Cunninghamella elegans*, sendo completamente consumido todo substrato e observada a formação de uma mistura de seis produtos, dos quais, 2 majoritários (**Gráfico 14.**).

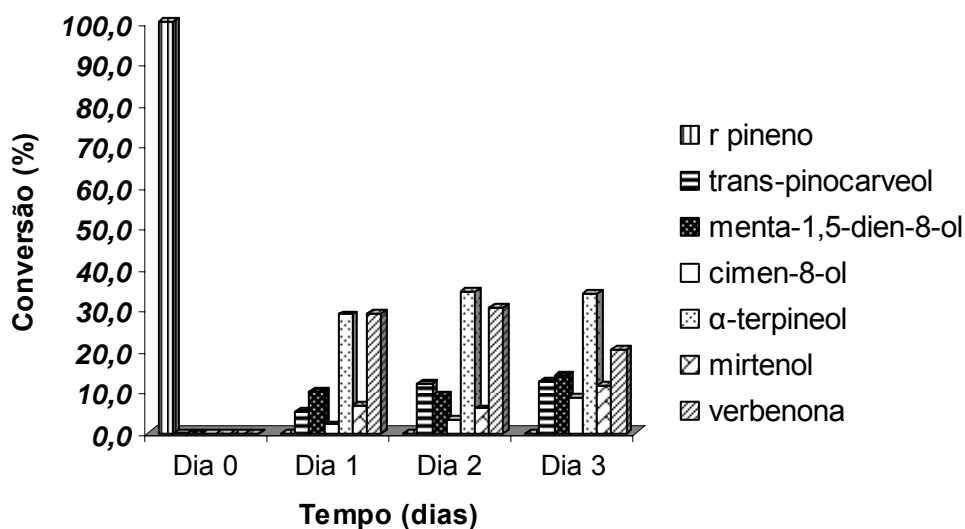


Gráfico 14.: Biotransformação de *(R)-(+)-α-pineno* com cultura de *Mortierella isabellina* em Meio SB.

De acordo com os cromatogramas obtidos e os dados de espectrometria de massas e comparação com dados da literatura os produtos foram identificados como *trans-pinocarveol* (produto 1) e índice de retenção (IR) de 1135, *menta-1,5-dien-8-ol* (2) e IR de 1165, *cimen-8-ol* (3) e IR de 1179, *α-terpineol* (4) e IR de 1184, *mirtenol* (5) e IR de 1193 e *verbenona* (6) com IR 1197, sendo o *α-terpineol* e *verbenona*, os produtos majoritários, obtidos com boa taxa de conversão com rendimento total obtido de 23,5% (12 mg), considerando a massa após 3 dias.

5.2.2. Produtos de transformação de *(S)-(-)-α-pineno* com fungos filamentosos

Os resultados das reações de biotransformação utilizando como substrato *(S)-(-)-α-pineno* estão mostrados na **tabela 17.** Após o tempo de incubação, o meio reacional foi extraído e obtido a fração orgânica, sendo analisada através de cromatografia a gás conforme descrito no experimento anterior.

Tabela 17.: Cinética da reação do de (S)-(-)- α -pineno com fungos filamentosos *

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	11,0+/-3,8	11,7+/-5,9	0,0
NI (tr 5,32) **	0,0	11,3+/-1,1	9,1+/-1,3	15,5+/-1,6
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	5,6+/-1,4	5,8+/-2,7	0,0
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	9,5+/-0,9	7,2+/-0,7	42,9+/-2,3
Diidro-carvona (tr 5,65) **	0,0	15,0+/-2,5	14,9+/-3,4	25,0+/-2,3
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	37,3+/-4,4	36,2+/-3,4	14,3+/-1,5

<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	0,0	9,0+/-2,5	8,7+/-0,5
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	11,3+/-1,8	4,0+/-2,9	13,4+/-1,6
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	20,3+/-1,6	16,4+/-0,7	17,4+/-1,0
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	44,2+/-4,3	21,5+/-2,9	16,5+/-1,2
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	19,2+/-1,5	19,6+/-9,4	44,0+/-1,5

<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr5,01)**	0,0	9,6+/-1,2	12,9+/-1,9	15,3+/-2,6
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,10) **	0,0	6,2+/-1,9	8,5+/-0,5	10,3+/-0,8
Cimen-8-ol (tr 5,47) **	0,0	19,0+/-1,8	16,1+/-1,5	10,4+/-2,0
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	9,2+/-0,6	13,2+/-0,6	14,6+/-1,5
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	14,7+/-2,2	15,3+/-2,3	11,2+/-4,2
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	22,8+/-1,6	15,2+/-4,4	22,8+/-3,4

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção produtos principais em minutos

NI: Produto Não Identificado

A formação do produto majoritário para o experimento com *Cunninghamella elegans*, bem como o consumo parcial do substrato de partida pode ser avaliado através do gráfico. Pode-se observar a conversão do produto de partida a partir do primeiro dia de reação (**Gráfico 15.**).

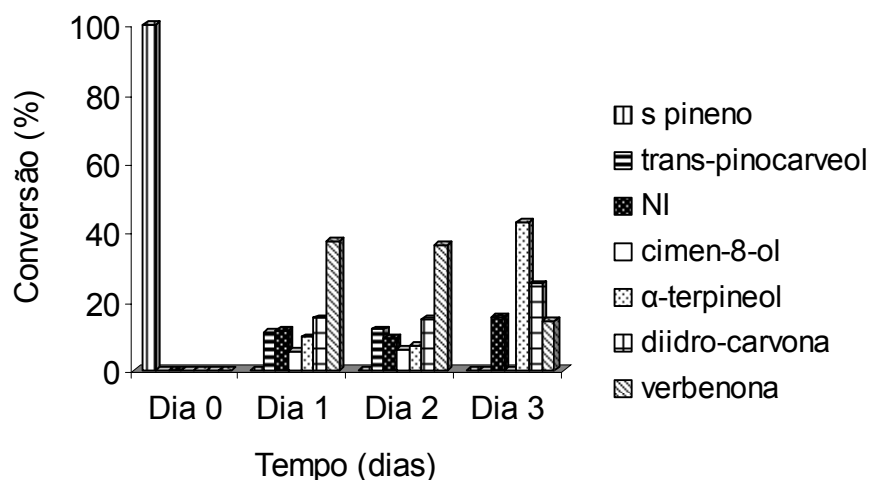


Gráfico 15.: Biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com cultura de *Cunninghamella elegans*.

Os resultados mostram que seis novos produtos foram formados e, com o decorrer do experimento, foi observado para o terceiro dia de experimento o decréscimo do composto 6 e aumento da formação dos compostos 3, 4 e 5, obtendo-se ao final, 4 substâncias. Os produtos foram identificados como, α -terpineol (4) e índice de retenção (IR) de 1185, diidro-carvona (5) e IR de 1195 e verbenona (6) com IR de 1198, sendo α -terpineol o produto majoritário e o produto 3 não identificado (anexo 7). O rendimento total do experimento foi de 21,5% (11 mg) considerando a massa total obtida. As estruturas podem ser observadas na **figura 60**.

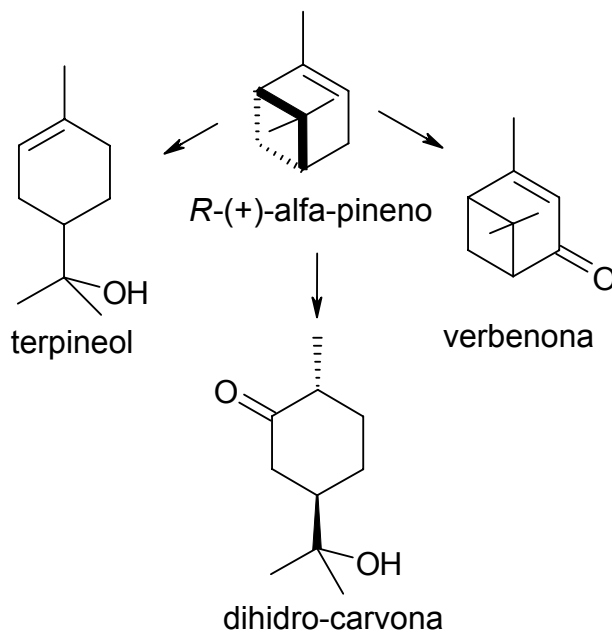


Figura 60.: Produtos de biotransformação de (*S*)-(-)- α -pineno com *C. elegans*.

Para o experimento utilizando como substrato (*S*)-(-)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata*, inicialmente, observou-se a formação de uma mistura de 4 produtos e o consumo total do substrato de partida. No terceiro dia foi observada a formação de uma mistura de cinco produtos, sendo o produto 5, majoritário. (**Gráfico 16.**)

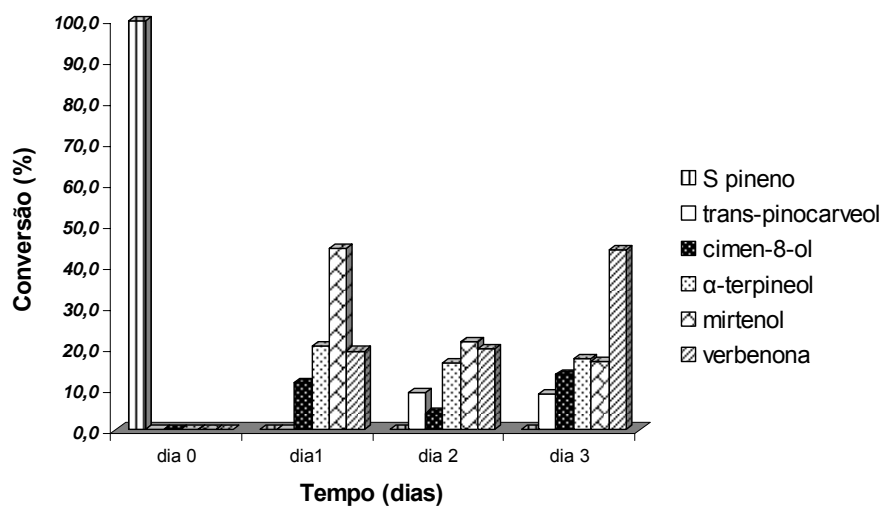


Gráfico 16.: Biotransformação de (*S*)-(-)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata*.

Na experimentação foi observada uma mistura de cinco monoterpenos identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção (IR) de 1135, cimen-8-ol (2) e IR de 1179, α -terpineol (3) e IR de 1185, mirtenol (4) e IR de 1192 e verbenona (5) com IR de 1201, sendo, a verbenona, o produto majoritário, obtido com alta taxa de conversão (anexo 8). O rendimento total do experimento foi de 29,4% (15 mg), considerando a massa total. Os produtos obtidos apresentam as estruturas conforme **figura 61**.

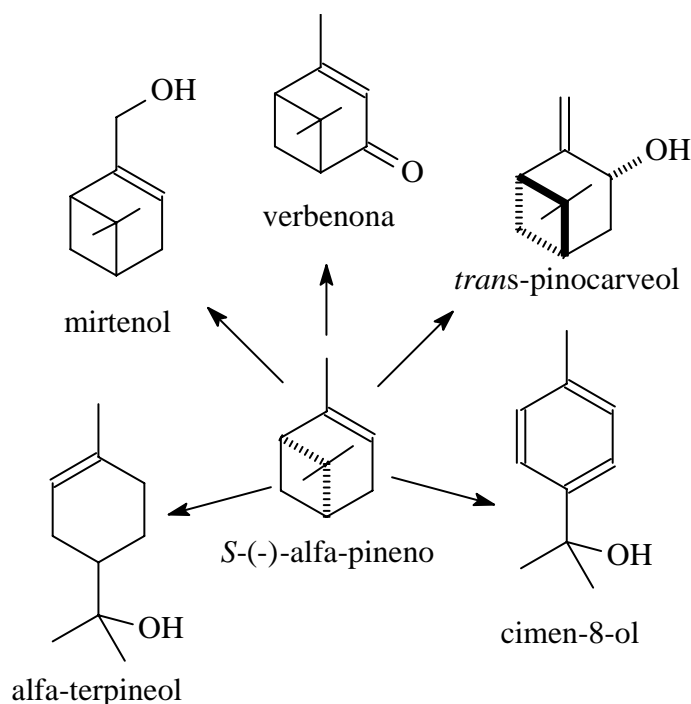


Figura 61.: Produtos de biotransformação de (*S*)-(-)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata*.

Para o fungo *Mortierella isabellina* foi observada a formação do produto majoritário, bem como o consumo total do substrato de partida, avaliado através do gráfico, com rápida conversão do produto de partida a partir do primeiro dia e formação de uma mistura de seis produtos. (**Gráfico 17.**)

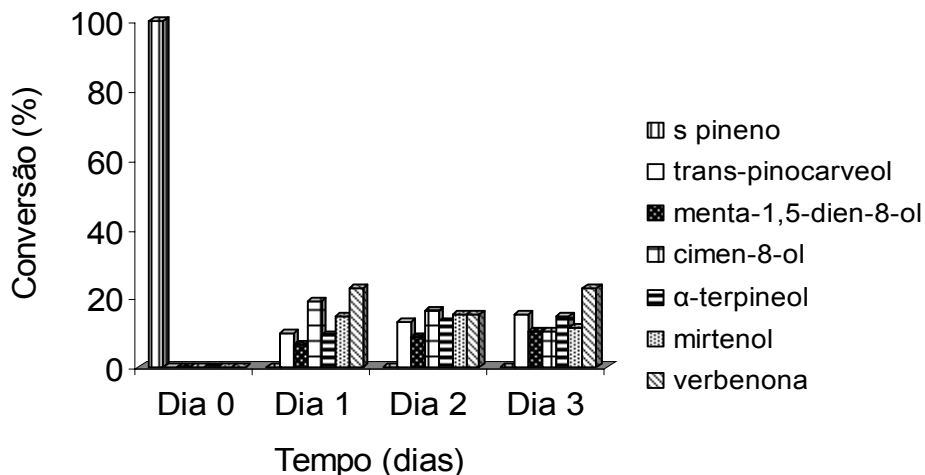


Gráfico 17.: Biotransformação de (S)-(-)- α -pineno com cultura de *Mortierella isabelina*.

Os resultados mostram que a partir do primeiro dia seis novos produtos foram formados, com tempo de retenção entre 5,01 (1) e 5,80 (6), idênticos aos obtidos para (R)-(+)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata*. Os produtos foram identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção de 1134, menta-1,5-dien-8-ol (2) e índice de retenção de 1167, cimen-8-ol (3) e índice de retenção de 1180, α -terpineol (4) e índice de retenção de 1186, mirtenol (5) e índice de retenção de 1190 e verbenona (6) com índice de retenção de 1202. O rendimento total do experimento foi de 31,3% (16 mg), considerando a massa total. Os produtos obtidos apresentam as estruturas mostradas na **figura 62**.

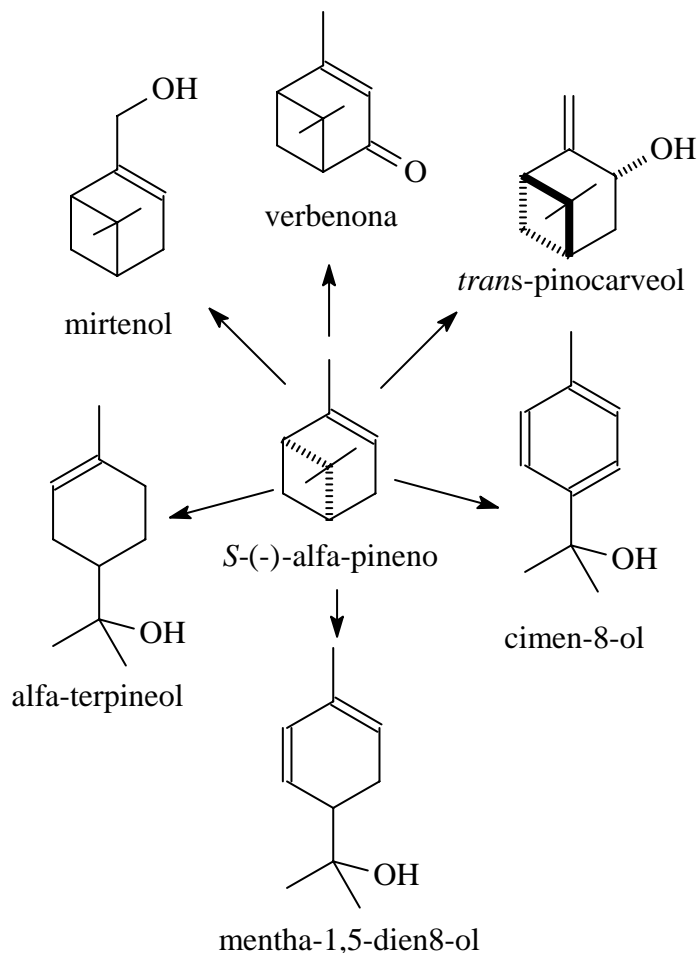


Figura 62.: Produtos de biotransformação de *S-(-)-α-pineno* com *Mortierella isabellina*.

5.2.3. Produtos de Transformação de *S-(-)-β-pineno* com fungos filamentosos

Após os estudos realizados com *(R)-(+)-α-pineno* e *(S)-(-)-α-pineno*, foram realizadas reações de biotransformação utilizando como substrato *(S)-(-)-β-pineno* no estudo com fungos filamentosos. Os resultados estão mostrados na **tabela 18**. Após o tempo de incubação o meio reacional foi extraído e obtido a fração orgânica, sendo analisada através de cromatografia a gás.

Tabela 18: Cinética da reação do de (S)-(-)- β -pineno em cultura de fungos filamentosos *

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	13,8+/-0,5	15,9+/-0,5	5,5+/-2,4
NI (tr 5,32) **	0,0	0,0	3,1+/-0,5	3,1+/-1,1
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	0,0	3,0+/-1,0	1,1+/-1,8
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	76,2+/-9,6	73,0+/-1,9	63,3+/-1,2
Mirtenol(tr 5,70) **	0,0	4,8+/-0,8	2,9+/-4,5	0,5+/-0,2
Verbenona (tr 5,80) **	0,0	0,0	0,8+/-0,3	22,8+/-3,6

<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,10) **	0,0	1,3+/-1,0	3,8+/-1,9	4,8+/-0,5
NI (tr 5,32) **	0,0	2,3+/-2,0	2,5+/-1,1	3,4+/-0,5
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	2,1+/-0,9	1,9+/-0,6	2,1+/-0,8
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	88,5+/-0,8	87,2+/-2,0	86,4+/-1,8
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	1,7+/-0,2	2,4+/-0,4	1,8+/-0,2

<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
(S)-(-)- β pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	2,4+/-1,0	1,7+/-0,9	3,9+/-1,2
NI (tr 5,32) **	0,0	3,6+/-0,3	3,6+/-0,8	1,6+/-0,3
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	2,1+/-0,6	1,7+/-0,4	1,8+/-0,4
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	89,8+/-2,5	90,1+/-3,5	86,1+/-1,6
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	1,5+/-0,3	1,7+/-0,3	2,9+/-0,7

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção produtos principais em minutos

NI: Produto Não Identificado

O experimento com *Cunninghamella elegans* mostrou o consumo total do substrato de partida, pode ser avaliado através do gráfico, onde se mostra total conversão do produto de partida desde o primeiro dia, sendo observada a formação de uma mistura de seis produtos após e dias de reação (**Gráfico 18.**), sendo dois majoritários.

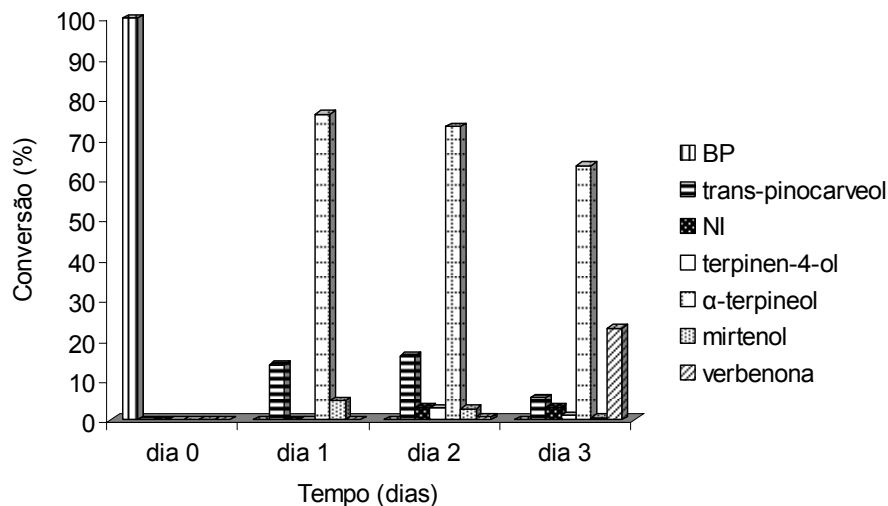


Gráfico 18.: Biotransformação de (S)-(-)-β-pineno com cultura de *Cunnighamella elegans*.

Os resultados mostram que, a partir do primeiro dia, três produtos foram formados havendo diminuição do teor do produto majoritário com formação de um novo produto a partir do terceiro dia. Os compostos apresentaram tempos de retenção entre 5,01 e 5,80 e, de acordo com os cromatogramas obtidos, os dados de espectrometria de massas (anexo 9) e com a comparação com a literatura os produtos foram identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção (IR) de 1136, terpinen-4-ol (3) com IR de 1173, α-terpineol (4) com IR de 1186, mirtenol (5) e IR de 1190 e verbenona (6) com índice de retenção de 1198. Um composto com tempo de retenção de 5,32 não foi identificado (2) apresentando índice de retenção de 1154 e como principais íons 59, 79, 95, 110, 136, 151. O rendimento total do experimento foi de 25,0% (13 mg), considerando todos os dias de experimento. As estruturas dos produtos são apresentadas no **figura 63**.

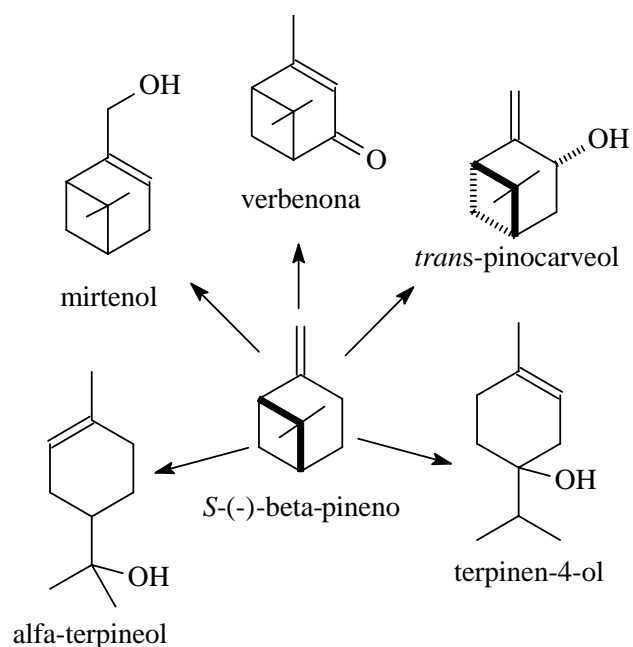


Figura 63.: Produtos de biotransformação de *(S)-(-)-β-pineno* com *Cunninghamella elegans*.

O experimento realizado utilizando como substrato *(S)-(-)-β-pineno* no estudo com *Cunninghamella echinulata* mostrou resultados que podem ser avaliados através do gráfico, com conversão do produto de partida a partir do primeiro dia e a formação de um produto majoritário idêntico ao obtido para o experimento anterior (**Gráfico 19.**).

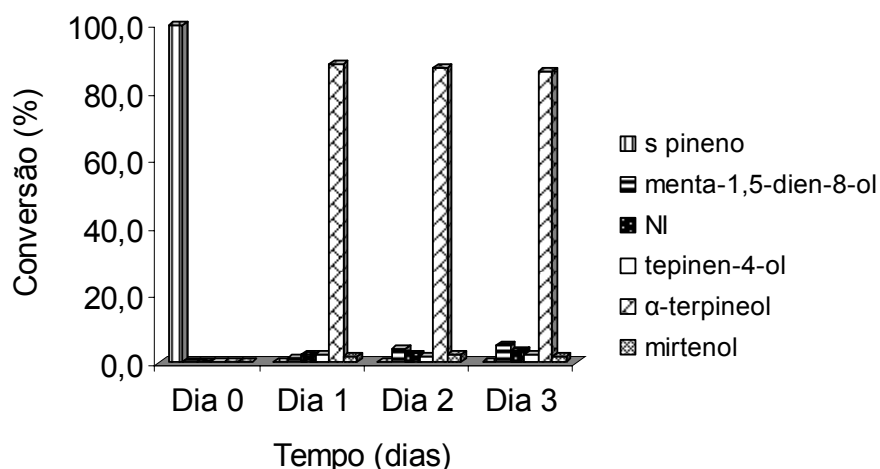


Gráfico 19.: Biotransformação de (S)-(-)-β-pineno com *Cunninghamella echinulata*.

Os resultados mostram que a partir do primeiro dia se observou a formação de predominantemente do produto 4, com uma conversão próxima a 89% e tempo de retenção de 5,55 minutos. Os demais compostos apresentaram tempo de retenção entre 5,10 (1) e 5,70 (5) e foram identificados como menta-1,5-dien-8-ol (1) e índice de retenção (IR) de 1166, terpinen-4-ol (3) e IR de 1173, α-terpineol (4) e IR de 1185 e mirtenol (5) com índice de retenção de 1192 (anexo 10). Os produtos obtidos apresentam as estruturas conforme **figura 64**. O rendimento total do experimento foi de 28,8% (15 mg), considerando a massa total. Os espectros dos compostos, bem como os espectros de massa são idênticos aos obtidos anteriormente, sendo o produto 2 não identificado.

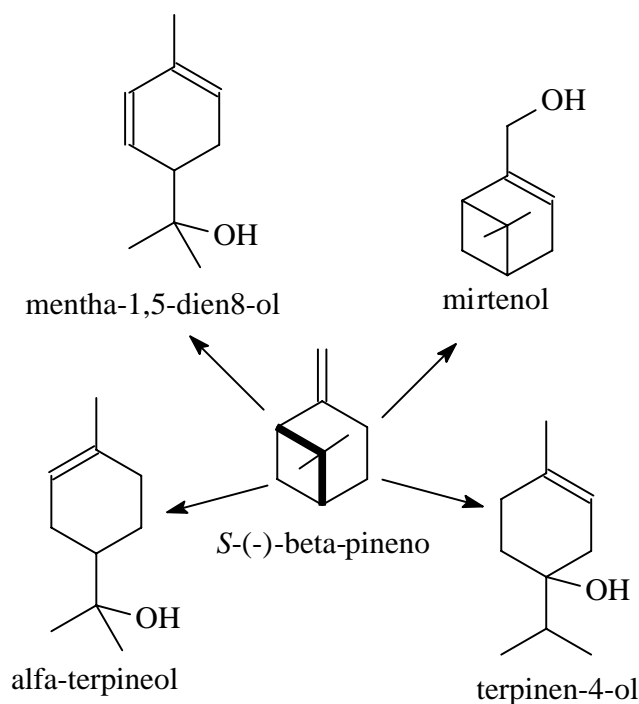


Figura 64.: Produtos de biotransformação de (*S*)-(-)- β -pineno com *Cunninghamella echinulata*.

No experimento utilizando *Mortierella isabellina* como biocatalista verificou-se o consumo total do substrato de partida e conversão de quase 90% para o produto majoritário (**Gráfico 20.**).

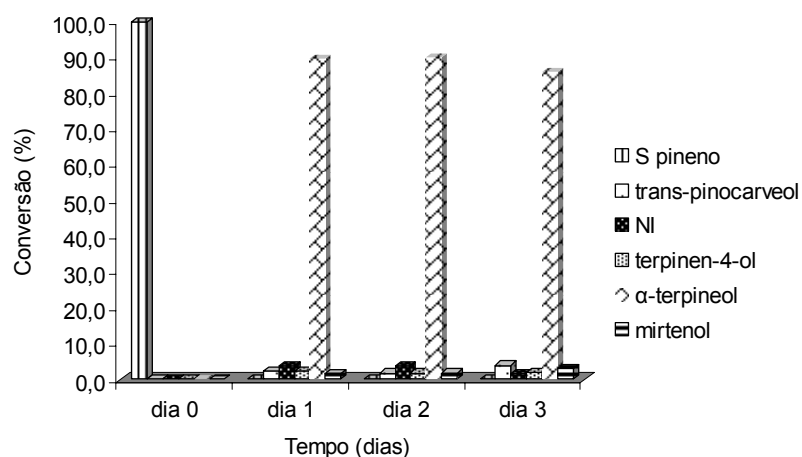


Gráfico 20.: Biotransformação de (*S*)-(-)- β -pineno com cultura de *Mortierella isabellina*

Os produtos apresentaram tempo de retenção de 5,01 (1), 5,32 (2), 5,40 (3), 5,55 (4) e 5,70 (5) minutos, respectivamente e foram identificados como *trans*-pinocarveol (1) e índice de retenção (IR) de 1134, terpinen-4-ol (3) e IR de 1172, α -terpineol (4) e IR de 1184 e mirtenol (5) com índice de retenção de 1192. O rendimento total do experimento foi de 32,6% (17 mg), considerando a média. O produto com tempo de retenção de 5,32 não foi identificado. Os produtos obtidos apresentam as estruturas mostradas na **figura 65**.

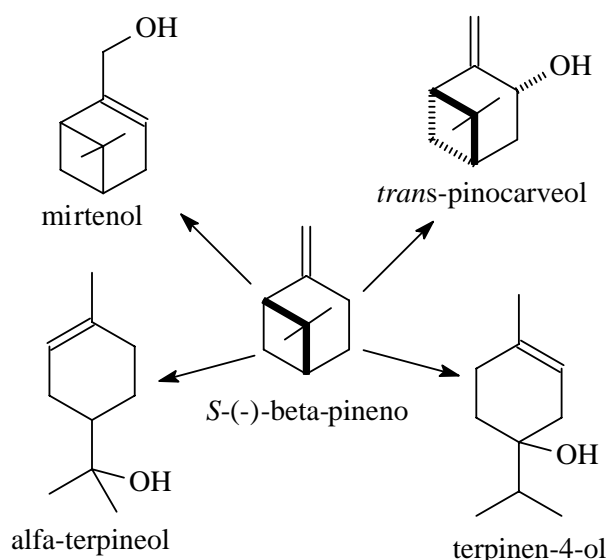


Figura 65.: Produtos de biotransformação de (*S*)-(-)- β -pineno com *Mortierella isabellina*.

5.2.4. Produtos de transformação de óleo de terebentina com fungos

Os resultados obtidos para os produtos isolados mostraram a habilidade das culturas de fungos em biotransformar os monoterpenos (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -pineno. Isso possibilitou que novos estudos fossem realizados, a fim de investigarmos reações utilizando o óleo de terebentina, caracterizado pela presença alfa e beta pineno como produtos majoritários. Conforme apresentado anteriormente nas reações com *C. roseus* o óleo utilizado é composto de 49,9% de

α -pineno e 38% de β -pineno, sendo adicionado 60 μ l de óleo. Os resultados são mostrados na tabela abaixo (**Tabela 19.**).

Tabela 19.: Cinética da reação do óleo de terebentina em cultura de fungos filamentosos*

<i>Cunninghamella elegans</i>				
Produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	10,1+/-3,6	7,7+/-4,5	12,4+/-1,4
NI (tr 5,32) **	0,0	8,6+/-3,0	7,1+/-4,1	10,0+/-0,4
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	4,6+/-1,0	3,6+/-1,8	5,0+/-0,4
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	71,5+/-4,0	75,2+/-10,2	56,7+/-4,5
Mirtenol (tr 5,70) **	0,0	1,7+/-0,5	3,2+/-2,1	4,6+/-1,3
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
Produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	5,5+/-1,0	11,5+/-1,5	14,4+/-1,6
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,10) **	0,0	11,1+/-1,0	10,2+/-0,6	11,2+/-0,5
NI (tr 5,32) **	0,0	4,8+/-0,6	5,1+/-0,1	4,7+/-0,2
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	4,2+/-0,8	5,0+/-1,8	6,3+/-4,3
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	73,3+/-2,6	57,4+/-4,3	58,6+/-6,4
<i>Mortierella isabellina</i>				
Produtos	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol (tr 5,01) **	0,0	1,4+/-0,3	3,9+/-1,6	11,3+/-0,5
Menta-1,5-dien-8-ol (tr 5,10) **	0,0	10,5+/-1,1	11,1+/-0,2	15,3+/-0,5
NI (tr 5,30) **	0,0	2,6+/-1,1	4,9+/-1,2	6,5+/-0,5
Terpinen-4-ol (tr 5,40) **	0,0	19,6+/-1,6	21,0+/-0,6	6,7+/-2,2
α -terpineol (tr 5,55) **	0,0	63,4+/-3,6	53,7+/-0,6	55,9+/-6,1

* Traços de outros produtos foram desprezados

** Tempo de retenção produtos principais em minutos

NI: Produto Não Identificado

Para o experimento com *Cunninghamella elegans* o consumo dos produtos de partida ocorreu de forma extremamente rápida, levando a formação de um

produto majoritário chegando a 71% de conversão no primeiro dia como se observa no **gráfico 21**, havendo diminuição acentuada no seu teor a partir do terceiro dia.

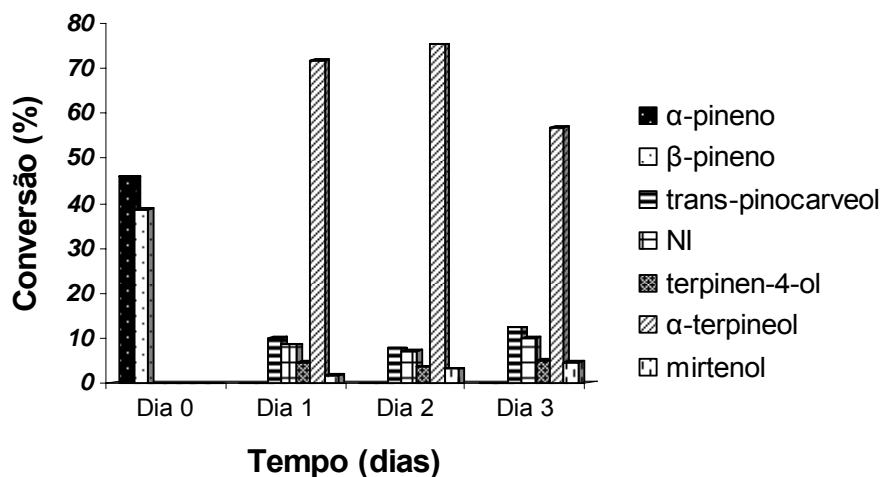


Gráfico 21.: Biotransformação de terebentina com cultura de *Cunninghamella elegans*.

Os produtos apresentaram tempo de retenção de 5,01 (1), 5,32 (2), 5,40 (3), 5,55 (4) e 5,70 (5) minutos, respectivamente e foram identificados como *trans*-pinocarveol (1), terpinen-4-ol (3), α-terpineol (4) e mirtenol (5) com índices de retenção idênticos aos obtidos nos experimentos anteriores sendo o produto 5,32 (2) não identificado. Os produtos obtidos apresentam as estruturas conforme **figura 66** com rendimento de 41,6% (25 mg), considerando a massa total para o experimento.

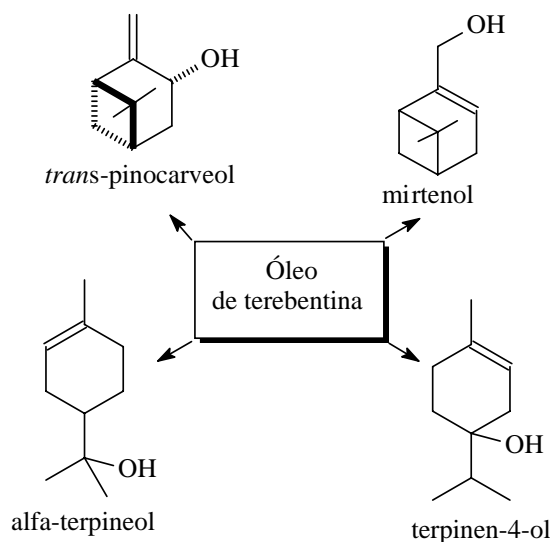


Figura 66.: Produtos de biotransformação de terebentina com *Cunninghamella elegans*.

No experimento utilizando como substrato óleo de terebentina no estudo com *Cunninghamella echinulata* foi observada a formação do produto majoritário (α -terpineol) com uma conversão próxima a 73% apresentando tempo de retenção de 5,55 minutos (5) (**Gráfico 22.**) e diminuição do seu teor no segundo dia.

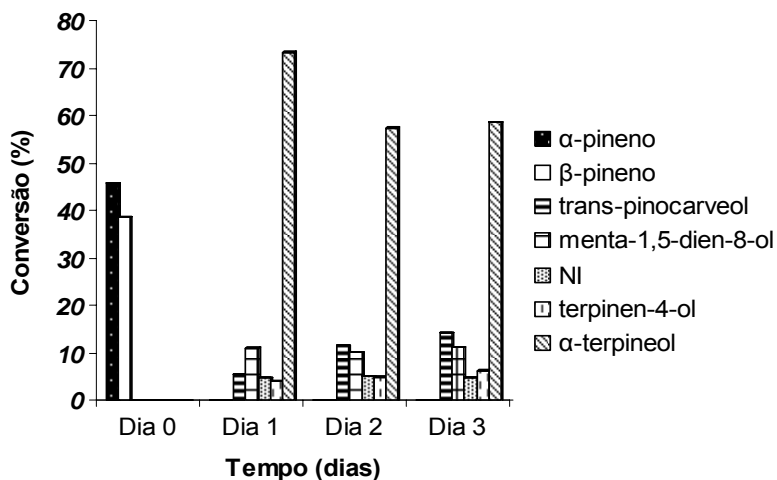


Gráfico 22.: Biotransformação de terebentina com cultura de *Cunninghamella echinulata*.

Os produtos apresentaram tempo de retenção entre 5,01 (1) e 5,55 (5) e foram identificados como *trans*-pinocarveol (1), menta-1,5-dien-8-ol (2), terpinen-4-ol (4) e α -terpineol (5) semelhantes aos obtidos no experimento anterior com acréscimo do composto 2. O rendimento total do experimento foi de 29,4% (15 mg), considerando a massa total. O composto com tempo de retenção de 5,32 não foi identificado apresentando índice de retenção de 1154 e fragmentação semelhante ao obtido para o experimento de (*S*)-(-)- β -pineno e *C. elegans*. Os produtos obtidos apresentam as estruturas mostradas no **figura 67**. Os índices de retenção foram semelhantes aos produtos já obtidos.

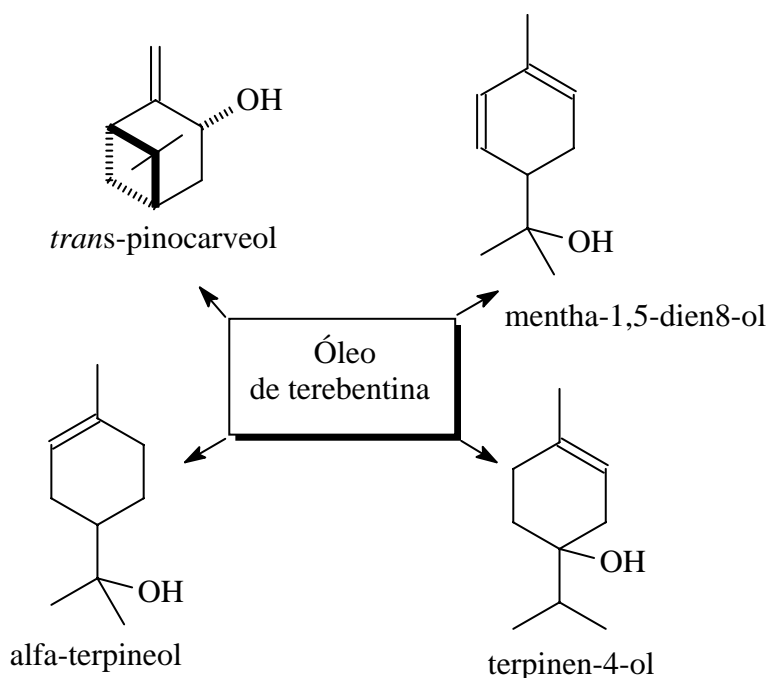


Figura 67.: Produtos de biotransformação de terebentina com *Cunninghamella echinulata*.

No experimento com *Mortierella isabellina* verificou-se conversão total do produto de partida a partir do primeiro dia e conversão de aproximadamente 55% para o produto majoritário (**Gráfico 23**).

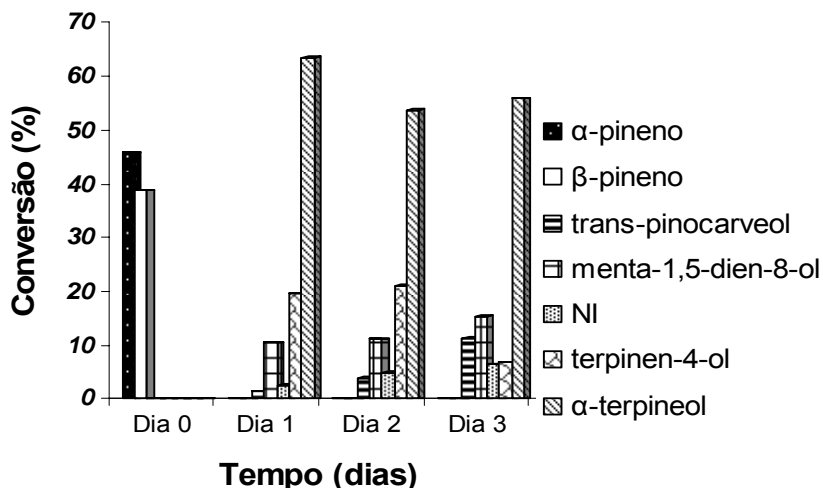


Gráfico 23.: Biotransformação de terebentina com cultura de *Mortierella isabellina*.

Os resultados mostram que a partir do primeiro dia o produto de partida mostrou alta capacidade de bioconversão com uma conversão máxima já no primeiro dia. Os compostos apresentaram tempo de retenção de 5,01 (1), 5,10 (2), 5,30 (3), 5,40 (4) e 5,55 (5) minutos, respectivamente, sendo identificados como *trans*-pinocarveol (1), menta-1,5-dien-8-ol (2), terpinen-4-ol (4) e α -terpineol (5) e índices de retenção idênticos aos obtidos nos experimentos anteriores. O rendimento total do experimento foi de 28,3% (17 mg), considerando a massa total. Os produtos formados são idênticos aos obtidos no experimento anterior.

5.3.5. Produtos de transformação de monoterpenos utilizando PDB

Os monoterpenos utilizados para as reações foram submetidos a novos experimentos onde foi então modificado o meio reacional buscando verificar a formação de novos produtos ou a diminuição do tempo de conversão. Para isto foram utilizados 70 mL de meio PDB (caldo batata-dextrose) adicionados 60 μ l do substrato, sendo realizado um único experimento com branco, com o procedimento

idêntico para os demais substratos. Inicialmente foi utilizado (*R*)-(+)- α -pineno e os resultados podem ser observados na **tabela 20**. abaixo.

Os resultados obtidos para este substrato com os fungos em estudo mostram que a conversão ocorreu de forma rápida logo no primeiro dia de experimento. Foi observada a formação de um produto majoritário, α -terpineol, com máximo de conversão no terceiro dia de experimento para todos os sistemas. Os demais produtos formados foram caracterizados utilizando espectrometria de massas e comparados com dados da literatura com estruturas semelhantes às obtidas para os experimentos utilizando meio Sabouraud.

Tabela 20.: Produtos de biotransformação de fungos para (*R*)-(+)- α -pineno em meio PDB.

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
<i>R</i> -(+) α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
(<i>trans</i> -pinocarveol)	0,0	10,5	4,9	4,7
(menta-1,5-dien-8-ol)	0,0	9,5	7,4	3,7
(Ni)	0,0	9,2	7,2	9,9
(α -terpineol)	0,0	59,4	69,2	72,5
(verbenona)	0,0	11,2	6,1	5,1
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
<i>R</i> -(+)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
(<i>trans</i> -pinocarveol)	0,0	11,7	10,5	3,3
(Ni)	0,0	5,3	3,6	3,4
(α -terpineol)	0,0	59,2	69,1	80,1
(verbenona)	0,0	7,5	10,1	13,1
<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
<i>R</i> -(+) α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
(<i>trans</i> -pinocarveol)	0,0	9,8	6,2	7,9
(menta-1,5-dien-8-ol)	0,0	7,8	6,4	4,9
(α -terpineol)	0,0	60,8	69,6	72,9
(verbenona)	0,0	6,7	11,3	9,6

* Traços de outros produtos foram desprezados

Para o substrato (S)-(-)- α -pineno a conversão ocorreu de forma rápida, sendo observado para o sistema com *Cunninghamella echinulata* o maior conversão do composto majoritário (α -terpineol), obtido com 54% de conversão (**Tabela 21**). Para os demais sistemas, além da formação de α -terpineol foi observada formação de verbenona, ambos produtos obtidos com máximo de conversão após três dias.

Tabela 21.: Produtos de biotransformação de fungos para (S)-(-)- α -pineno em meio PDB.

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	7,4	11,9	12,7
Menta-1,5-dien-8-ol	0,0	7,1	10,9	9,6
α-terpineol	0,0	27,9	22,7	27,2
diidro-carvona	0,0	23,2	19,3	11,8
verbenona	0,0	3,6	17,1	19,8
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	12,4	12,2	8,8
Menta-1,5-dien-8-ol	0,0	11,9	10,2	3,8
cimen-8-ol	0,0	27,1	38,4	4,8
α-terpineol	0,0	11,5	8,1	54,8
verbenona	0,0	3,1	16,4	4,1
<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	Dia 3
(S)-(-)- α -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	11,2	10,7	9,1
Menta-1,5-dien-8-ol	0,0	11,5	10,1	4,1
cimen-8-ol	0,0	8,3	9,7	7,3
α-terpineol	0,0	22,2	31,4	39,7
mirtenol	0,0	15,2	6,5	3,7
verbenona	0,0	10,4	16,6	25,1

* Traços de outros produtos foram desprezados

O experimento utilizando como substrato (S)-(-)- β -pineno foi realizado seguindo a mesma metodologia anterior cujos resultados são observados na **tabela 22**.

Tabela 22.: Produtos de biotransformação de fungos para (S)-(-)- β -pineno em meio PDB.

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	1,2	5,1	1,4
borneol	0,0	2,8	4,2	4,9
terpinen-4-ol	0,0	1,3	9,3	1,2
α-terpineol	0,0	91,2	79,9	80,9
mirtenol	0,0	1,2	1,5	1,1
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
Menta-1,5-dien-8-ol	0,0	2,7	3,2	2,5
borneol	0,0	6,4	2,2	1,5
α-terpineol	0,0	79,3	92,8	84,1
verbenona	0,0	6,9	1,5	4,2
<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
(S)-(-)- β -pineno	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	6,7	2,4	2,8
borneol	0,0	3,7	3,3	2,3
α-terpineol	0,0	88,3	92,1	94,2
mirtenol	0,0	1,4	1,3	1,6

* Traços de outros produtos foram desprezados

Os resultados obtidos para este substrato com os fungos em estudo mostram a formação de um produto majoritário, α -terpineol, com máximo de conversão no primeiro dia de experimento para *C. elegans*, no segundo dia para *C. echinulata* e terceiro dia para *M. isabellina* e rendimentos superiores a 80%.

Para o óleo de terebentina foram realizados os estudos com os fungos utilizando a mesma metodologia. Os resultados estão mostrados na **tabela 23**.

Tabela 23.: Produtos de biotransformação de fungos com Óleo de terebentina em meio PDB.

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	4,1	5,2	9,2
Ni	0,0	4,7	4,4	5,5
terpinen-4-ol	0,0	3,9	5,7	3,6
A-terpineol	0,0	85,7	68,2	67,7
mirtenol	0,0	1,5	9,4	1,2
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	12,4	6,7	5,2
Ni	0,0	5,2	3,5	3,1
A-terpineol	0,0	65,5	80,5	84,7
<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	dia 0	dia 1	dia 2	dia 3
α -pineno	45,7	0,0	0,0	0,0
β -pineno	38,6	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	0,0	7,3	6,5	5,1
Ni	0,0	3,4	4,4	2,7
A-terpineol	0,0	71,1	75,5	82,8

* Traços de outros produtos foram desprezados

Foi observada a formação de um produto majoritário, α -terpineol, com máximos de conversão com tempos similares ao experimento realizado com (S)-(-)- β -pineno e rendimentos máximos superiores a 80%. Os monoterpenos utilizados nos experimentos com meio Sabouraud e PDB apresentaram resultados muito promissores quando ao tempo e produtos formados. No entanto, a variação do meio pode possibilitar a formação de novos compostos. Desta forma foi utilizado tampão fosfato como meio reacional para a reação de biotransformação com os fungos filamentosos em estudo com os monoterpenos.

Para todos os substratos foram adicionados 60 μ L ao meio reacional sendo realizado um único experimento acompanhado de controle. Para os substratos, (R)-(+)- α -pineno, (S)-(-)- α -pineno, (S)-(-)- β -pineno e óleo de terebentina não foram observados produtos de conversão para nenhum dos fungos sendo apenas obtidos os respectivos produtos de partida analisados por cromatografia a gás e o meio utilizado foi considerado inadequado para a reação utilizando estes substratos. Como produtos majoritários nos experimentos utilizando os monoterpenos α e β pineno foi observada a formação de α -terpineol e verbenona conforme podemos observar na **tabela 24.** abaixo.

Tabela 24.: Produtos de biotransformação de monoterpenos com fungos filamentosos em meio Sabouraud.

<i>Cunninghamella elegans</i>				
produtos	(R)-(+)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- β -pineno Dia 3	Terebentina Dia 3
<i>trans</i> -pinocarveol	17,1+/-1,6	0,0	5,5+/-2,4	12,4+/-1,4
terpin-4-ol	0,0	0,0	1,1+/-1,8	5,0+/-0,4
A--terpineol	26,0+/-5,7	42,9+/-2,3	63,3+/-1,2	56,7+/-4,5
Diidro-carvona	0,0	25,0+/-2,3	0,0	0,0
mirtenol	6,7+/-1,1	0,0	0,5+/-0,2	4,6+/-1,3
Verbenona	36,8+/-1,8	14,3+/-1,5	22,8+/-3,6	0,0
<i>Cunninghamella echinulata</i>				
produtos	(R)-(+)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- β -pineno Dia 3	Terebentina Dia 3
<i>trans</i> -pinocarveol	12,1+/-4,5	8,7+/-0,5	0,0	14,4+/-1,6
menta-1,5-dien-8-ol	10,0+/-2,1	0,0	4,8+/-0,5	11,2+/-0,5
cimen-8-ol	4,0+/-0,9	13,4+/-1,6	0,0	0,0
terpin-4-ol	0,0	0,0	2,1+/-0,8	6,3+/-4,3
A-terpineol	33,2+/-4,0	17,4+/-1,0	86,4+/-1,8	58,6+/-6,4
Diidro-carvona	0,0	0,0	0,0	0,0
mirtenol	11,8+/-1,1	16,5+/-1,2	1,8+/-3,6	0,0
verbenona	17,2+/-1,4	44,0+/-1,5	0,0	0,0
<i>Mortierella isabellina</i>				
produtos	(R)-(+)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- α -pineno Dia 3	(S)-(-)- β -pineno Dia 3	Terebentina Dia 3
<i>trans</i> -pinocarveol	12,7+/-1,6	15,3+/-2,6	3,9+/-1,2	11,3+/-0,5
menta-1,5-dien-8-ol	14,7+/-1,7	10,3+/-0,8	0,0	15,3+/-0,5
cimen-8-ol	8,4+/-0,5	10,4+/-2,0	0,0	0,0
terpin-4-ol	0,0	0,0	1,8+/-0,4	6,5+/-0,5
A-terpineol	34,0+/-1,8	14,6+/-1,5	86,1+/-1,6	55,9+/-6,1
mirtenol	11,5+/-2,9	11,2+/-4,2	2,9+/-0,7	0,0
verbenona	20,4+/-7,0	22,8+/-3,4	0,0	0,0

Os experimentos realizados com fungos levaram à formação de α -terpineol como produto majoritário, com conversões entre 14 e 86 % em meio Sabouraud. O máximo de conversão em verbenona (44% em 3 dias de experimento) foi obtido com o sistema *Cunninghamella echinulata* e (S)-(-)- α -pineno e para a obtenção de alfa-terpineol os sistemas mais adequados foram (S)-(-)- β -pineno com *C. echinulata* e *M. isabellina*. Os resultados sugerem que a formação de terpineol e verbenona constituem rotas competitivas no processo de biocatálise, uma vez que nos experimentos onde ocorre o acúmulo de verbenona, ocorre diminuição na formação de α -terpineol.

A troca do meio Sabouraud para PDB não modificou os tempos reacionais, parece inibir a rota de formação de verbenona, observando-se majoritariamente alfa-terpineol, com obtenção de até 94% deste produto no sistema *M. isabellina* e (S)-(-)- β -pineno (**Tabela 25.**). A utilização de tampão fosfato não mostrou reação de biotransformação para nenhum dos substratos utilizados.

Tabela 25. Produtos majoritários de biotransformação de monoterpenos com fungos filamentosos em meio Sabouraud e PDB.

<i>Cunninghamella elegans</i>									
	(R)-(+)- α -pineno		(S)-(-)- α -pineno		(S)-(-)- β -pineno		Terebentina		
	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	
Produtos	Dia 3		Dia 3		Dia 3		Dia 3		
α-terpineol	26,0	72,5	42,9	27,2	63,3	80,9	56,7	67,7	
verbenona	36,8	5,1	14,3	11,8	22,8	0,0	0,0	0,0	
<i>Cunninghamella echinulata</i>									
	(R)-(+)- α -pineno		(S)-(-)- α -pineno		(S)-(-)- β -pineno		Terebentina		
	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	
produtos	Dia 3		Dia 3		Dia 3		Dia 3		
α-terpineol	33,2	80,1	17,4	54,8	86,4	84,1	58,6	84,7	
verbenona	17,2	13,1	44,0	4,1	0,0	4,2	0,0	0,0	
<i>Mortierella isabellina</i>									
	(R)-(+)- α -pineno		(S)-(-)- α -pineno		(S)-(-)- β -pineno		Terebentina		
	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	SB	PDB	
Produtos	Dia 3		Dia 3		Dia 3		Dia 3		
α-terpineol	34,0	72,9	14,6	39,7	86,1	94,2	55,9	82,8	
verbenona	20,4	9,6	22,8	25,1	0,0	1,6	0,0	0,0	

O segundo produto formado em quantidades apreciáveis, a verbenona apresenta também vasta aplicação na indústria alimentícia, sendo constituinte do sabor de morango-framboeza, conferindo notas canforadas e mentoladas (RAVID *et al.*, 1997).

Quando comparamos os resultados para os sistemas catalíticos utilizando as culturas de fungos filamentosos, para monoterpenos observamos conversões mais rápidas. Para os monoterpenóides poucos estudos foram realizados em transformação com os fungos utilizados. Dentre estes trabalhos, destacam-se hidroxilações com *C. echinulata* (CARREARAS *et al.*, 1995) e hidroxilações benzílicas com *M. isabellina* em vários substratos aromáticos (HOLLAND *et al.*, 1993).

As reações utilizando pinenos com fungos filamentosos levaram a vários compostos, dentre estes, destaca-se o α -terpineol. No entanto, estes sistemas enzimáticos possibilitaram que outros compostos fossem formados com conversão superior às obtidas para o sistema de culturas vegetais de *C. roseus*, sendo a via mecanística utilizada por estes sistemas semelhante ao observado para a cultura de células.

Quando são comparados os rendimentos para as reações que utilizam *C. roseus* observamos que o melhor resultado obtido para o produto majoritário α -terpineol foi para o monoterpeno (S)-(-)- β -pineno chegando a 35%. Dentre os fungos filamentosos observamos melhores rendimentos para o óleo de terebentina chegando a 41,6% para o fungo *C. elegans*. Os rendimentos podem ser observados na **tabela 26** abaixo.

Tabela 26.: Rendimentos para as reações de biotransformação com fungos e células.

RENDIMENTOS (α -terpineol) %			
<i>C. roseus</i>			
(<i>R</i>)-(+)- α -pineno	(<i>S</i>)-(-)- α -pineno	(<i>S</i>)-(-)- β -pineno	Terebentina
29,7	32,4	35,1	21,6
<i>C. elegans</i>			
31,3	21,5	25,0	41,6
<i>C. echinulata</i>			
37,2	29,4	28,8	29,4
<i>M. isabellina</i>			
23,5	31,3	32,6	28,3

Um importante fator a considerar é o valor dos produtos obtidos nas reações de biotransformação. Todos os produtos de partida mostram valores comerciais inferiores a 100 dólares, diferentemente dos produtos formados que apresentam valores de compra que chegam a mais de 1000 dólares. Os valores podem ser observados na **tabela 27**.

Tabela 27.: Preços dos produtos de partida e obtidos com as reações de biotransformação*.

Produtos partida	Preço (\$) 5 ml	Produtos formados	Preço (\$)
(<i>R</i>)-(+)- α -pineno	10,20	<i>trans</i> -pinocarveol	1.152,00
(<i>S</i>)-(-)- α -pineno	38,00	α-terpineol	836,00
(<i>S</i>)-(-)- β -pineno	88,00	Mirtenol	928,00
		Verbenona	345,00

* Os preços referem-se a valores cotados em dólares em 20/06/2006 no catálogo *on line* sigma-aldrich.

Os produtos avaliados nas reações com células vegetais e fungos filamentosos mostraram que o estudo com estes sistemas são promissores, tornando-se necessárias novas avaliações quanto aos meios reacionais, na busca de condições que possam incrementar os produtos formados.

6. CONCLUSÕES

- A realização da curva de crescimento para *Catharanthus roseus* possibilitou que fosse definido o dia 4 como o melhor para a inoculação do substrato no meio reacional.

- A purificação dos experimentos realizados com (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno, (*S*)-(-)- β -pineno levaram ao isolamento de α -terpineol com 29,7%, 32,4%, 23,7 de rendimento, respectivamente utilizando *C.roseus*.

- Para o óleo de terebentina na reação com *C.roseus* foi purificado e isolado o produto α -terpineol obtido rendimento de 21,6% quando comparado com a massa total de óleo adicionado.

- Nos experimentos utilizando (*S*)-(-)- β -pineno foi isolado o produto hidrato de terpineol com rendimento de 3,51%. Para o óleo de terebentina o produto hidrato de terpineol foi obtido rendimento de 26,7% em relação à massa adicionada de óleo.

- O experimento de (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno e (*S*)-(-)- β -pineno e óleo de terebentina com *Catharanthus roseus* levou ao consumo total do produto de partida em tempos entre 7 e 9 dias, sendo α -terpineol o produto majoritário para todas as reações, com conversões superiores a 80%. O experimento de (*S*)-(-)- β -pineno realizado em 15 dias levou ao consumo parcial de α -terpineol a partir do dia 6, com formação de hidrato de terpineol.

- A curva para avaliar o ciclo de crescimento dos fungos e identificar o ponto de crescimento exponencial definiu o dia 3 como o melhor para a adição do substrato no meio reacional.

- Os experimentos de (*R*)-(+)- α -pineno, (*S*)-(-)- α -pineno, (*S*)-(-)- β -pineno e óleo de terebentina com *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e

Mortierella isabellina levaram ao consumo total do produto de partida em 3 dias e formação de α -terpineol, em concentrações que variaram de 14 a 86%, em 3 dias de reação em caldo Sabouraud.

- O experimento de (S)-(-)- α -pineno com *Cunninghamella echinulata* levou ao consumo total do produto de partida em 3 dias e formação de verbenona como produto majoritário, na concentração de 44%, acompanhada de 17% de α -terpineol.

- O melhor rendimento de verbenona obtido foi de 41,6% para o fungo *C.elegans* com óleo de terebentina.

- A utilização de PDB como meio reacional levou a alterações significativas no perfil biocatalítico dos fungos estudados, ocorrendo favorecimento na formação de α -terpineol.

- Quando as reações foram conduzidas em tampão fosfato pH 7,0, nenhum produto de biotransformação foi observado, para os substratos (R)-(+)- α -pineno, (S)-(-)- α -pineno, (S)-(-)- α -pineno e óleo de terebentina.

- Todos os produtos obtidos pelas reações de biotransformação apresentaram valores comerciais superior aos produtos de partida utilizados nos experimentos.

7. REFERÊNCIAS

ABEL, A.M.; CARNELL, A.J.; DAVIS, J.A.; PAYLOR, M. The synthesis of buprenorphine intermediates by regioselective microbial *N*- and *O*-demethylation reactions using *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p. 743-748, 2003.

ADAM, W. Biotransformation of (1-phenyl) ethyl hydroperoxide with *Aspergillus niger*: a model study on enzyme selectivity and on the induction of peroxidases activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1427, p. 236-244, 1999.

ADAMS R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry**. New York: Academic, 2001.

ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; KIMPE, N.D. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. **Phytochemistry**, v.80, p. 525-534, 2003.

AKHTAR, M.S.; BOTTING, N.B.; COHEN, M.A.; GANI, D. Enantiospecific synthesis of 3-substituted aspartic acids via enzymatic amination of substituted fumaric acids. **Tetrahedron Asymmetry**, v.9, p. 2301-2310, 1989.

ALEIXO, A.M. Desenvolvimento de metodologias para oxidações seletivas em esqueletos *p*-mentânicos. Utilização em reações de transposição 1,2 de enonas ou apenas de carbonilas. Aplicações em sínteses de produtos naturais. **Tese de Doutorado**, UNICAMP, 1999.

ALMEIDA, M. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laninariaceae family. **Phytochemistry**, v.13, p. 1889-1892, 2001.

ANDERSSON, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Bioconversions in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microb. Technol.** V.12, p.242-254, 1990.

ARANDA, G.; MORENO, L.; CORTES, M.; PRANGE, T.; MAURS, M.; AZERAD, R. A new example of 1 α -hidroxylation of drimanic terpenes through combined microbial and chemical processes. **Tetrahedron**, v.57, p. 6051-6056, 2001.

ARCHELAS, A.; FOURNERON, J.D.; FURSTOSS, R. Microbial transformations .8. 1st example of a highly enantioselective microbiological hydroxylation process. **J. Org. Chem.** v.53, p. 1797, 1988.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation and Uses**, 2nd ed. VCH., New York: 1990.

BERNARDI, R.; BRAVO, P.; CARDILLO R.; GHIRINGHELLI, D.; RESNATI G. Homochiral fluoro-organic compounds - microbial reduction of 1-fluoro-3-(para-tolylsulphonyl)propan-2-one and of 1-fluoro-3-(para-tolylsulphenyl) propan-2-one. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, p.2831, 1988.

- BEVINAKATTI, H.S.; BANERJI, A.A. Lipase catalysis in organic-solvents - Application to the synthesis of (R)-atenolol and (S)-atenolol **J. Org. Chem.** Lipase v. 57, p. 6003, 1992.
- BHATTACHARYYA, P.K.; PREMA, B.R.; KULKARNI, B.D.; PRADHAN, S.K. Microbiological transformation of terpenes: Hydroxylation of α -pinene. **Nature**, v.187, p. 689-690, 1960.
- BOLAND, W., FROBL, C., LORENZ, M., Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. **Synthesis**, p. 1049-1072, 1991.
- BOHM, H.; RINK, E. Betalaines In: Constabel F., Vasil, I, editors. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, vol 5, New York: Academic .1988, p.449-463.
- BORSCHUEUR, U.T.; KAZLAUSKAS R.J. Hydrolases in: **Organic Synthesis**, Verlag, Chemie: Weinheim, 1999.
- BOSHOFF, A. Optimization of catechol production using membrane-immobilised polyphenol oxidase. **Biotechnol. Bioeng**, v. 83, p. 1-7, 2003.
- BOTES, A.L.; WEIJERS, C.A.G.M.; VANDYK, M.S. Biocatalytic resolution of 1,2-epoxyoctane using resting cells of different yeast strain with novel epoxide hydrolase activities. **Biotech. Lett.**, v. 20, p. 421-426, 1998.
- BOUGIONKOU, D.J.; SMOUNOU, I. Chloroperoxidase-catalysed cyclodimerization of methyl(2E)-2,4-pentadienoate: a (4+2) cycloaddition product. **J. Mol. Catal. B. Enzym.**, v. 17, p. 257-259, 2002.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A.; MILESE, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.
- BOWEN, E.R. Potencial by products from microbial transformation of d-limonene. **Prod. Fla. Stade Hortic. Soc.** v.88, p. 304-308, 1975.
- BOYD, D.R. Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.12, p. 564-573, 2001.
- BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L.A.; FRANCOIS, G., SANKARA NARAYANAN, A.S.; PETERS, K.; PETERS, E.M. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllun peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity and crystal structure of benzul ester. **Planta Medica**, v. 63, p. 225-257. 1997.
- BROWEN, E.G. Commercial significance of plants: History and pointers to the future. In: FULLER, K.W.; GALLON, J.R., **Plant products and the new technology. Annual Proceeding of the Phytochemical Society of Europe**, 1985, v.26., p. 1-10.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinalés**, 2ª edição. Zaragoza: Acribia, 2001.

BUCCIARELLI, M.; FORNI, A.; MORETTI, I.; PRATI, F.; TORRE, G.; RESNATI, G.; BRAVO, P. Biotransformations of fluorinated sulfenyl and sulfonyl compounds. **Tetrahedron**, v. 45, p. 7505, 1989.

BUHLER, B. Characterization and application of xilene monooxygenase for multistep biocatalyses. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 560-568, 2002.

BULOW, N.; KONIG, W.A. The role of germacreno D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v.55, p. 141-168, 2000.

BUNSIRI, A.; KETSA, S.; PAULL, R.E. Phenolic metabolism and lignin synthesis in damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 61-71, 2003.

BURTON, S. G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. **Trends in Biotechnology**, v.21, p. 543-549, 2003.

CANE, D.E. Isoprenoid Biosynthesis: Overview. In: **Comprehensive Natural Products Chemistry**, v. 2. BARTON, K.N.; MENTH-COHN, O. (Eds), Oxford: Elsevier Science, 1999, p.1-14,

CARNELL, A.J.; IACAZIO, G.; ROBERTS, S.M.; WILLETTS, A.J. Preparation of optically-active cyclohexanediols and (+)-alpha hydroxycycloheptanone by an enzyme-catalyzed stereo inversion/oxidation process. **Tetrahedron Lett.**, v.35, p. 331, 1994.

CARRERAS, C.R.; RODRIGUEZ, J., SILVA; H.J., ROSSOMANDO, P.; GIORDANO, S.; GUERREIRO, E. Hydroxylation of sodic grindelate by *Cunninghamella echinulata*. **Phytochemistry**, v.41, p. 473-475, 1996.

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

CHAI, W.; HAMADA, H.; SUHARA, J., HORIUCHI, C.A. Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones by plant cultured cell. **Phytochemistry**, v. 57, p. 669-673, 2001.

CHEETHAM, P.S.J. Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours. In: **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**.. R.G. Berger (ed) Berlin: Springer-Verlag, , 1997, v.55. p.17.

CHEN, A.R.M.; REESE, P.B. Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Phytochemistry**, v. 59, p. 57-62, 2002.

CHENEVERT, R.; NGATCHA, B.T.; ROSE, Y.S.; GOUPIL, D. Regio and enantioselectivity of the enzyme catalysed hydrolysis of citric acid derivatives. **Tetrahedron Asymmetry**, v.9, p. 4325-4329, 1998.

CHENEVERT, R.; THIBOUTOT, S. Baker's yeast reduction of 1,2-diketones. Preparation of pure (S)-(-)-2-hydroxy-1-phenyl-1-propanone. **Chem. Lett.**, p. 1191, 1988.

CIRINO, P.C.; ARNOLD, F.H. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 6, p. 130-135, 2002.

CLARK-STILL, W.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatography technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem.**, v. 43, p. 4923, 1978.

COLONNA, S. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 163-168, 1999.

CORNELISSEN, J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 709-12, 1993.

CRABBE, P. Some aspects of steroid research based on natural products from plant origin. **Bull. Soc. Chim. Belg.**, v. 88, p. 345, 1979.

CRAKER, L. E. Herbs and volatile oils. **The Herb, Spice and Medicinal Plant Digest**, v. 8, p. 1-5, 1990.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Review**, v. 87, p. 929-954, 1987.

DAMLE, S.V.; PATIL, P.N.; SALUNKHE, M. Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-Atenolol and (S)-propranolol. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2167-2170, 2000.

DAVIS, P. J.; GLADE, J.C.; CLARK, A.M.; SMITH, R.V. N-demethylation of lergotriple by *Streptomyces platensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 38, p. 891-895, 1979.

DELUCA, M.E.; HUDLICKY, T. Microbial oxidation of naphthalene derivatives. Absolute configuration of metabolites. **Tetrahedron Lett.**, v. 31, p. 13-16, 1990.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; DePOOTER, H.L. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. **Phytochemistry**, v.41, n.4, p. 1079-1082, 1996.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; KIMPE, N.D. Biotransformation of terpenes by fungi study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 265-270, 2001.

DERFER, J. M.; DERFER, M. M. Terpenoids. In: Kirk, Raimound Eller. **Encyclopedia of Chemical Technology**. (3ed.). New York: Wiley-Interscience, 1981, v.22.

DESRUT, M.; KERGOMARD, A.; RENARD, M.F.; VESCHAMBRE, H. Microbial reduction of alpha,beta-unsaturated carbonyl-compounds - a general property. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.110, p. 908, 1983.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. England: John Wiley e Sons, 1997.

DEWICK, P.M. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.** v. 16, p. 97-130, 1999.

DHAVALIKAR, R.S.; BHATTACHARYA, P.K., Microbiological transformations of terpenes: Part VIII-fermentation of limonene by a soil *Pseudomonas*. **Ind. J. Biochem.**, v.3, p. 144-157, 1966.

DiCOSMO, F.; MISAWA, M. **Plant Cell Culture Secondary Metabolism: Toward Industrial Application**. Canada: CRC , 1996.

DOUGALL, D.K., Nutrition and metabolism in: Staba, E. editor. **Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Boca Raton, FL: CRC, 1980 p21-58,.

DONDONI, A.; FANTIN, G.; FOGAGNOLO, M.; MASTELLARI, A.; MEDICI, A.; NEFRINI, E, PEDRINI P. Preparation and reactivity of metallated (silicon and tin) thiazoles and oxazoles with carbon electrophiles - new approaches towards heterocyclic and acyclic building-blocks. **Gazz. Chim. Ital.**, v.118, p. 211, 1988.

DONG, H., WANG. H.D.; CAO, S.G.; SHEN, J.C. Lipase-catalysed polymerisation of lactones and linear hidroxyesteres. **Biotechnol. Lett.** v. 20, p. 905-908, 1998.

DUETZ, W.A. Using proteins in their natural environment: potencial and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 12, p. 419-425, 2001.

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

ELLIS, B.E. Natural products from plants tissue cultures. **Nat. Prod. Rep.**, Cambridge University Press, v. 5, p. 581-612 , 1988.

EMA, T.; SUGIYAMA, Y., FUKUMOTO, M.; MORIYA, H.; CUI, J.N.; SAKAI, T.; UTAKA, M. Highly enantioselective reduction of carbonyl compounds using a reductase purified from bakers yeast **J. Org. Chem.** v. 63, p. 4996-5000, 1998.

ERMAN, W.F. **Chemistry of Monoterpenes (Studies in Organic Chemistry)**, New York: Mercel Decker, 1985, vol I e II.

EVANS, C.; McCAGUE, R.; ROBERTS, S.M.; SUTHERLAND, A.G. Synthesis of either enantiomer of cis-3-aminocyclopentanecarboxylic acid from both enantiomers of racemic 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. **J.Chem.Soc., Perkin Trans.1**, p. 656, 1991.

EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIEVRE, Y. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1056-1068, 1996.

FABER, K. In: **Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook**, 3^a ed, Berlin: Springer, 2000.

FANG, J.M. Enzymes in organic synthesis: oxireductions. **J. Chem. Soc.**, p. 967-977, 1995.

FETZNER, S. Enzymes involved in aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2-4-dioxygenases. **Naturwissenschaften**, v.87, p. 59-69, 2000.

FIGUEIREDO, A. C. S. *Achillea millefolium* sp. *millefolium*: **Produção de metabólitos secundários in vitro e in vivo**. Tese de Doutorado. Lisboa: Universidade de Lisboa, 1992.

FINDEIS, M.H.; WHITESIDES, G.M., Fumarase-catalysed synthesis of l-treo-chloromatic acid and its conversion to 2-deoxy-d-ribose and d-erthyro-sphingosine. **J. Org. Chem.** v.52, p. 2838-2848, 1987.

FRAGA, B.M.; GONZALEZ, P.; GUILHERMO, R.; HERNANDEZ, M.G. Microbiological transformation of manoyl oxide derivatives by *Mucor plumbeus*. **Journal of Natural Products** v. 61, p. 1237-1241, 1998.

FRAGA, B.M.; HERNANDEZ M.G.; ARTEGA, J.M.; SUAREZ, S. The microbiological transformation of the diterpenes dehydrobietenol and teideadiol by *Mucor plumbeus*, **Phytochemistry**, v. 63, p. 663-668, 2003.

FROSCH, F. **Bioactive substances from Basf for cosmetics**. *Pollena: Tluszcz, Srodki Piorace. Kosmet.*, v. 31, p. 144-147, 1987. Resumo.

FRUETEL, J. A. Relationship of active site topology to substrate specificity for cytochrome P450 (CYP108). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28815-28821, 1994.

FUJITA, Y.; HARA, Y.; OGINO, T.; SUGA, C. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. **Plant Cell Rep.** v.1, p.59-60, 1981.

FUKUDA, Y.; HARADA, T.; IZUMI, Y. Succinoglucan producing ability of mutant of *alcaligenes-faecalis* var *myxogenes*, requiring glycerol for optimal growth. **J. Ferment. Technol.**, v. 51, p. 393, 1973.

FUKUSIMA, Y.; HAYASHI, M.; FUJIWARA, M.; MIYAGAWA, T.; YOSHIHAWA, G.; YANO, T.; NAKAJIMA, H. Enzimatic synthesis of carbocyclic analogues of fructose-2-6-bisphosphate with 6-phosphofructo-2-kinase. **Chem. Lett.**, v.7, p. 575-576, 1998.

FURUYA, T. Production of usefull compounds by plant cells cultures – synthesis and biotransformation *Yakugaku zosshi*. **Pharmaceutical Society of Japan**, v.108, p. 675-696, 1988.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. **Fisioterápicos**. André Tosello, Campinas, p. 17, 1996.

GIBSON, M.; SPOER, G.J.; PARFITT, R.T.; SEWELL, G.J. Enzyme-mediated *N*-demethylation of codeine. **Enzyme Microb. Technol.**, v.6, p. 471-475, 1984.

GIFFHORN, F. Rare sugars and sugar-base synthons by chemo-enzymatic synthesis. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 734-742, 2000.

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

GRAMATICA, P.; MANITTO, P.; RANZI, B.M.; DELBIANCO, A.; FRANCAVILLA, M. Stereospecific reduction of geraniol to (R)-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Experientia**, v. 38, p. 775, 1982.

GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GUTMAN, A.L.; ZUOBI, K.; GUIBÉ-JAMPEL, E., Lipase catalysed hydrolysis of γ -substituted α -aminobutyrolactones. **Tetrahedron Lett.**, p. 2037-2038. 1990.

HAMADA, H.; NAKAMURA, N.; ITO, S.; KAWABE, S.; FUNAMOTO, T. Enantioselectivity in reduction of α -dicarvelone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v.27, n.12, p. 3807-3808, 1988.

HAMADA, H.; FUCHIKAMI, Y.; JANSINO, R.L.; KAMINSKY, L.S. Regioselective hydroxylation of warfarin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v.33, n.3, p. 599-600, 1993.

HAMADA, H.; FUCHIKAMI, Y.; IKEMATZU, Y.; HIRATA, T.; WILLIAMS, H.J.; SCOTT, A.I., Hidroxylaton of Piperitone by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v.37, n.4, p. 1037-1038, 1994.

HAMADA, H.; YASUMUNE H.; FUCHIKAMI, Y.; HIRATA, T., SATTLER,; WILLIAMS, H.J.; SCOTT, I. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)-and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 615-621, 1997.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HANSON, J. R. Biochemical & Medicinal Chemistry Series in: **An introduction to biotransformations in organic chemistry**, Oxford, 1995, p. 1-89.

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

HIBINO, K.; USHIYAMA, K. Commercial production of ginseng by plants tissue culture technology. In: FUN, T.J., SINGH, G., CURTIS, W.R. (Ed.). **Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients**. New York: Plenum publisher, 1999, p. 215-224.

HIRATA, T.; HAMADA, H.; AOKI, T.; SUGA, T. Stereoseletivity of the reduction of carvone and dihydrocarvone by suspension cells of *Nicotiana tabacum* **Phytochemistry**, v. 21, p. 2209, 1982.

HOEKS, F.W.J.M.M.; MEYER, H.P.; QUARROZ, D.; HELWIG, M.; LEHKY, P. Scale-Up of the Process for the Biotransformation of Nicotinic Acid into 6-hydroxynicotinic Acid In: **Biotransformations**, COPPING, L.G.; MARTIN, R.E.; PICKETT, J.A.; BUCKE, C.; BUNCH, A.W., London: Elsevier 1990, p. 67.

HOLLAND, H.L. **Organic Chemistry with Oxidative Enzymes**, Berlim: VCH Publishers, 1992, p. 5-40.

HOLLAND, H.L.; KINDERMANN, M.; KUMARESAN, S.; STEFANAC, T. Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. Part 5. Exploring the benzylic hydroxylase of *Mortierella isabellina*. **Tetrahedron Asymmetry**, v.4, p. 1353-1364, 1993.

HOLLAND, H.L., WEBER H.K. Enzymatic hydroxylation reactions. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.11, p. 547-553, 2000.

HOOK, I., LECKY, R., MCKENNA, B., SHERIDAN, H. Biotransformation of linalyl acetate by suspension cultures of *Papaver bracteatum*. **Phytochemistry**, v.29, p. 2143-2144, 1990.

HOPP, R. Some high lights of H&R research: A review of nearly 120 years of research at Haarmann & Reiner in: HOPP, R., MORI, K. editors. **Recent developments in flavour and fragrance chemistry.**, p. 14-28, 1993.

HULST, A.C.; TRAMPER, J.; BRODELIUS, P.; EIJKENBOOM, L.J.C.; LYBEN, K.C.A. Immobilized plant cells: respiration and oxygen transfer. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 35, p. 189-204, 1985.

HULST, A.C.; TRAMPER, J. Immobilized plant cells: a literature survey. **Enzyme Microb. Technol.** v.11, p.546-558, 1989.

IKAN, R. **Natural Products: A Laboratory Guide**. 2^a ed. London: Academic, 1991.

IKEDA, T.; MATSUMOTO, T., NOGUCHI, M. Effects of inorganic nitrogen source and physical factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture **Agric. Biol. Chem**, v.41, p.1197-1201, 1977.

ITOH, T.; YOSHINAKA, A.; SATO, T.; FUJISAWA, T. A simple stereocontrolled synthesis of optically-active deoxysugars l-rhodinose and d-amicetose. **Chem. Lett**, p.1679, 1985.

IVANCIUC, O.; IVANCIUC, T.; SPULBER, A.; VANATORU, M. Reductive biotransformations of organic compounds by *Saccharomyces cerevisiae*. Part 1. Reduction of ketones **Stiinte si Tehnologii Alimentare**, v.4, p.128-134, 1998.

IZUMISAWA, C. M. **Biotransformação de fenilpropanóides e lignóides por *Aspergillus niger* IFO 4414**. Dissertação de Mestrado. São Paulo: USP, 1998.

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

JENNINGS, W.; SHIBAMOTO, T. **Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography**. New York: Academic, 1980.

JOHNSON, T.S.; RAVISHANKAR, G.A. Precursor biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell culture of *Capsicum frutescens*. **Plant Cell, Tissue Organ. Cult.**, v. 44, p. 117-121, 1996.

JONES, A.; VELIKY, A.I. Effect of medium constituents on the viability of immobilized plant cells. **Canadian Journal of Botany**, v.39 p. 511-521, 1981.

KARP, F.; CROTEAU, R.; Hydroxylation of (-)- β -pinene and (-)- α -pinene by a cytochrome P-450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*). In: PETRSKI, R.J.; McCORMICK, S.P. (Eds.), **Secondary-Metabolite biosynthesis and metabolism**. New York: Plenum, 1982 p. 253-260.

KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, L.M.; CHEN, C.H.; GARRETT, P.E.; LEE, K.H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives a potent anti HIV agents. **J. Med Chem.**, v. 39, p. 1016-1017, 1996.

KAWAI, Y.; HAYAASHI, M.; INABA, Y.; SAITOU, K.; OHNO, A. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from bakers yeast. **Tetrahedron Lett.** v. 39, p. 5225-5228, 1998a.

KAWAI, Y.; HIDA, K.; DAO, D.H.; OHNO, A. Asymmetric synthesis of β -hidroxy esters having three consecutive chiral centers with a reductase from bakers yeast. **Tetrahedron Lett.** v.39, p. 9219-9222, 1998b.

KERGOMARD, A.; RENARD, M.F.; VESCHAMBRE, H., Microbiological reduction of α,β -unsaturated ketones by *Beauveria sulfurescens*. **J. Org. Chem.**, v. 47, p. 792, 1982.

KERGOMARD, A.; RENARD, M.F.; VESCHAMBRE, H.; COURTOIS, D.; PETIARD, Reduction of α,β -unsaturated ketones by plant suspension cultures, **Phytochemistry**, v. 27, p.407-409 1988.

KIM, B.M.; GUARE, J.P.; HANIFIN, C.M.; ARFORD-BICKERTAFF, D.J.; VACCA, J.P.; BALL, R.G. A convergent synthesis novel conformationally restricted HIV-1 protease inhibitors. **Tetrahedron Lett.**, v. 35, p. 5153, 1994.

KIMLAND, B.; NORIN, T. Wood extractives of common spruce, *Picea abies* (L.) Karst. **Svesk papperstidn.** v.75, p. 403-409, 1972.

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

KISE, K.J.; BOWLER, B.E. Enantioselective synthesis of an unnatural amino acid and its incorporation into a peptide . **Tetrahedron Asymmetry**, v. 9, p. 3319-3324, 1998.

KITAZUME, T.; KOBAYASHI, T. Synthesis of optically-active α -fluoro- α -methyl- β -hydroxyesters of *erythro* or *threo* configuration with baker yeast. **Synthesis**, p. 187, 1987.

KITAZUME, T.; NAKAYAMA, Y. Synthetic approach to versatile chiral molecules containing a fluorine atom. **J. Org. Chem.**, p. 2795, 1986.

KLIBANOV, A.M., Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents. **Acc. Chem Res.** v. 23, p. 144-120, 1990.

KNOBLOCH, K.H.; BERLIN, J., Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. G.Don Z. **Naturforsch.**, v.35, p.551-556, 1980.

KREIS, W.; REINHARD, E. 12β -hydroxylation of digtoxin by suspension cultured *Digitalis lanata* cells: production of digoxin in 20 L and 300 L airlift reactors. **J. Biotechnol.**, v.26, p.257-273, 1992.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic-solvents. *Biotechnol. Bioeng.* V. 30, p.81-87, 1987.

LAYMAN, P.L. Flavors and fragrances industry faces season of consolidation. *Chem. Eng.* v. 30, p.7-13, 1984.

LEAK, D.J.; ALKENS, P.J.; SEYED-MAHMOUDIAN, M. The microbial production of epoxides. *Trend. Biotechnol.*, v.10, p. 256-261, 1992.

LEMEIRE, G.L.; LEPOIVRE, J.A.; ALDERWEIRELDT, F.C., Hlad-catalysed oxidation of alcohols with acetaldehyde as a coenzyme recycling substrate. *Tetrahedron Lett.*, v. 26, p. 4527-4528, 1985.

LIM, C.H.; YOO, Y.J. Synthesis of *ortho*-directed polyaniline using horseradish peroxidases. *Process. Biochem.*, v. 36, p. 233-241, 2000.

LIMA, A.W.O.; AGNES, L. Biotálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Química Nova*, v. 22, p. 229-245, 1999.

LIMBERGER, R. **Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero *Mikania* (*Asteraceae*) e da subtribo *Myrtinae* (*Myrtaceae*) de ocorrência no Rio Grande do Sul.** Dissertação de Mestrado, UFRGS, 1998.

LIMBERGER, R.P., **Composição Química de Óleos Voláteis de *MYRCIINAE* (*MYRTACEAE*) e Biotransformação de Terpenóides**, Tese de doutorado, 2001.

LINDMARK-HENRIKSSON, M.; ISAKSSON, D.; SJODIN, K.; HUGBERG, H-E.; VANEK, T.; VALTEROVA, I. Transformation of α -pinene using *Picea abies* suspension culture. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 337-343, 2003.

LINDMARK-HENRIKSSON, M.; ISAKSSON, D.; VANEK, T.; VALTEROVÁ, I.; HOGGERG, H-E.; SJODIN, K. Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *Journal of Biotechnology*, v.107, p. 173-184, 2004.

LITTECHILD, J. Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 3, p. 28-34, 1999.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.D.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; KATZIN, A.M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. By Waiapi Amazon Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v.67, p. 313-319, 1999.

LOPES, S.; von POSER, G.L.; KERBER, V.A.; FARIAS, F.M.; KONRATH, E.L.; MORENO, P.; SOBRAL, M.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 1187-1195, 2004.

- LOUGHLIN, W. A. Biotransformations. In: **Organic synthesis. Bioresource Technology**, 2000, v. 74, p. 49-62,
- MADYASHA, K.M.; REDDY, G. V.B. Mucor piriformis an efficient N-dealkylating reagent for thebaine and its N-variants. **J. Chem Soc. Perkin Trans. 1**, p. 11-12, 1994.
- MAHATO, S.B.; MAJUMDAR, I. Current Trends. In: Microbial Steroid Biotransformation. **Phytochemistry**, v.34, p. 883-898, 1993.
- MARKER, R.E. Steroidal sapogenins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 69, p. 2167, 1947.
- MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis**. New York: Oxford Science, 1994.
- MANTELL, S.H.; SMITH, H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures In: Mantell S.H., Smith, H, editors. **Plant Biotechnology**. Cambridge: Cambridge Univ. p.75-108, 1984.
- MATSUMURA, S.; KAWAI, Y.; TAKAHASHI, Y.; TOSHIMA, K. Microbial-production of (2r,4r)-2,4-pentanediol by enantioselective reduction of acetylacetone and stereoinversion of 2,4-pentanediol. **Biotechnol. Lett.**, v.16, p. 485, 1994.
- MAY, S.W. Enzyme epoxidation reactions. **Enzyme. Micro. Technol.** v.1, p. 15-22, 1979.
- MAYAUX, J.F.; BOUSSEAU, A.; PAUWELS, R.; HUET, T.; HENIN, Y.; DEREU, N.; EVERS, M.; SOLER, F.; POUJADE, C.; DE CLERCQ, E. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 3564-3568, 1994.
- McANDREW, B.A. Sesquiterpenoids: The lost dimension of perfumery. **Perfumer & Flavorist**, v.17, p. 1-17, 1992.
- McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Prospects for the bioengineering of terpenoid biosynthesis. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, T. Scheper (Ed.) Berlin-Heidelberg: Springer, 1997, v. 55, p.107-145.
- MENGER, F.M. Enzyme reactivity from an organic perspective. **Acc.Chem. Res.** 26, p. 226-212, 1979.
- MIYAZAWA, M.; NOBATA, M.; HYAKUMACHI, M.; KAMEOKA, H. Biotransformation of (+)-and(-)-camphorquinones by fungi. **Phytochemistry**, v.39, p. 569, 1995.
- MOLINARI, F.; OCCHIATO, G.; ARAGOZZINI, F.; GUARNA, A. Microbial biotransformations in water/organic solvent system. Enantioselective reduction of

aromatic β - and γ -nitroketones. **Tetrahedron Asymmetry**, v.9, p.1389-1394, 1998.

MOORE, R.N.; GOLUMBIC, C.; FISHER, G.S. Autoxidation of α -pinene. **J. Am. Chem. Soc.** v. 78, p. 1173-1176, 1956.

MORANT, M.; BAK, S.; MOLLER, B.L.; WERCK-REICHHART, D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 151-162, 2003.

MORENO, P. R. H. **Influence of stress factors on the secondary metabolism in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells**. Tese de Doutorado. Leiden, 1994.

MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; BARATTI, J.; FURTOSS, R. Determination of the regioselectivity occurring during oxirane ring opening by epoxide hydrolases: A theoretical analysis and a new method for its determination. **Tetrahedron Asymmetry**, v.9, p. 1539-1547, 1998.

MUKHERJEE, P.K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B.P. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. **Planta Med.**, v.63. p.367-369, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** v. 5, p. 473, 1962.

NAKAMURA, K.; MATZUDA, T. Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. **J. Org. Chem.** 63, p. 8957-8964, 1998.

NAKAGAWA K.; KONAGAI A.; FUKUI, H.; TABATA, H. Release and crystallization of berbeline in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. **Plants Cell. Rep.**, v.3, p.254-257, 1988.

NAWANI, N.; DOSANJH, N.S.; KAUR, J. A. novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotech. Lett.**, v.20, p. 997-1000, 1998.

NEIDLEMAN, S.I.; GEIGERT, J. The enzymatic synthesis of heterogenous dihalide derivatives: A unique biocatalytic discovery. **Trends Biotechnol.**, 1, p.21-25, 1983.

NELSON, W.L.; BURKE, T.R. Absolute configuration of glycerol derivatives: Oxprenol enantiomers. **J.Org. Chem.**, v.43, p. 3641, 1978.

O'DONNELL, G.W.; SUTHERLAND, M.D. Terpenoid chemistry: (-)-anymol from *Myoporum crassifolium* Forst, the C7 epimer of (-)- α -bisabolol from camomile. **Aust. J. Chem.**, v.42, p. 2021, 1989.

OIKAWA, H., KOBAYASHI, T., KATAYAMA, K., SUZUKI, Y., ICHIHARA, A. Total synthesis of (-)-solanapyrone A via enzymatic Diels-Alder reaction of prosolanapyrone. **Trans. J. Org. Chem.** v.63, p. 8748-8756, 1998.

OLIVEIRA, B.H.; SANTOS, M.C.; Leal, P.C. Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. **Phytochemistry**, v.51, p. 737-741, 1999.

OLIVEIRA, B.H.; STRAPASSON, R. Biotransformation of isosteviol by *Fusarium verticilloides*. **Phytochemistry**, v.43, n.2, p. 393-395, 1996.

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

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

PAGE, P.C.B.; CARNELL, A.J.; MCKENZIE, M.J. Biocatalysis of deracemization in 1,2-diols. **Synlett**, p. 774, 1998.

PANDA, A.K.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S.; BHOJWANI, S.S. Plant cell reactors – a perspective. **Enzyme Microb. Technol.**, v.11, p. 386-397, 1989.

PANKE, S. Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid phase applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p. 5619-5923, 1999.

PASUTTO, F.M.; SINGH, M.M.; JAMALI, F.; COUTTS, R.T.; ABUZAR, S. Microbiological systems in organic-synthesis - preparation of racemic prenalterol utilizing *Cunninghamella echinulata*. **J. Pharm. Sci.**,v.76, p. 177, 1987.

PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRICE, C.; SHULER M.L. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture In: PAYNE, G. F., BRINGI, V., PRICE, C., SHULER M.L. (Ed.), **Plant cell and Tissue Culture in Liquid Systems**, Hanser, 1991a, p. 1-10.

PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRICE, C., SHULER M.L. Suspension culture In: PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRICE, C.; SHULER M.L. (Ed.), **Plant cell and Tissue Culture in Liquid Systems**, 1991b, p. 145-176.

PEDRAGOSA-MOREAU, S.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Microbiological transformations enantiocomplementary epoxide hydrolyzes as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide. **J.Org. Chem.**, v.58, p. 5533, 1993.

PERSSON, M.; SJODIN, K.; BORG-KARLSON, A.K.; NORIN, T.; ERGER, I. Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*. **Phytochemistry**, v.42, p. 1289-1297, 1996.

PERVAIZ, S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 333-344, 2004.

PETERSON D.H.; MURRAY H.C.; EPPSTEIN S.H. Microbiological Transformations of steroids.1. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. **J. Am. Chem. Soc.**, v.74, p. 5933-5936, 1952.

PFRUNDER, B.; TAMN, C. Mikrobiologische umwandlung von bicyclischen monoterpenen durch **Absidia orchidis** (Vuill) Hagem. Teil: reduction von campherchinon und isofenchonchinon. **Helvetica Chimica Acta**, v.52, p.1630, 1969.

PHILLIPS, R.S.; MAY, S.W. Enzymic sulfur oxidation reactions. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.3, p. 9-18, 1981.

PIETRUSZKO, R.; CLARK, A.; JOHN, M.; GRAVES, H.; RINGOLD, H.J. The steroid activity and multiplicity of crystalline horse liver alcohol dehydrogenase **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.23, p.526-534, 1966.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.S.; CHAGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG., H.H.; KINGHORN, A.D.; BROWN, D.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nat. Med.**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.

QUESNELL, A.A., ELLIS, B.E., Comparison of UV-irradiation and *p*-fluorophenylalanine as selective agents for the production of aromatic compounds in plant cell culture. **J. Biotechnol.** v.10, p.27-28, 1989.

RAMAN, A. Antimicrobial affects of tea-tree oil and its major components on *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21,n. 4, p. 242-245, 1995.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of β -cyclodextrin and fungal elicitor. **Process Biochemistry**, v.35, p.341-348, 1999.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freshly suspended and immobilized cell culture of *Capsicum frutescens*. **J. Biotechnol.**, v.76, p. 1061-1064, 2000.

- RATES, SM.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; KATZIR, I.; LEWINSOHN, E.; DUDAI, N. Identification of (1R)-(+)-verbenone in essential oils from *Rosmarinus officinalis* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v.12, p. 119-1112, 1997.
- REBOLLEDO, F.; ROBERTS, S.M.; WILLETTS, A.J. Biotransformation of cycloalkanediones by microorganisms: stereoselective reduction of (+/-)-camphorquinone. **Biotechnology Letters**, v.13, p. 245, 1999.
- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; GUEHO, J.; JULIEN, H.R.; HOSTETT-MANN, K.; RIOS, J.L. Investigation on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Med.**, v.61, p. 9-12, 1995.
- RHODES, P.M.; WINSKILL, N. (Pfizer, New York), **Microbiological process for the preparation of l-carvone**. USA, Patent N^o. 4495284, 1985.
- RIDGEWAY, T. Novel bioconversions of the production of designer antioxidant and colorant flavanoids using polyphenol oxidases. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** v. 14, p. 165-190, 1997.
- RODAKIEWICZ-NOWAK, J. Effect of various water miscible solvents on enzymatic activity of fungal lacases. **J. Mol. Catal. B. Enzym.** v.11, p.1-11, 2000.
- ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Nat. Prod. Rep.** v.16, p. 565-574, 1999.
- ROHMER, M.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C. Biosynthetic routes to the building blocks of isoprenoids. In: STEINBUCHER, T., **Biopolymers**. New York: Koyama, Wiley-VCH, 2001, v.2, p. 49-72.
- RONADIVE, A.S. Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products In: CHARALAMBOUS, G. **Spices, herbs and edible fungi**. London: Elsevier Science, 1994, p. 517-577.
- ROTHENBERG, G.; YAYZIV, Y.; SASSON, Y. Comparative autoxidation of 3-carene and α -pinene: Factors governing regioselective hydrogen abstraction reactions. **Tetrahedron**, v.54, p. 593-598, 1998.
- RUSS, R. Benzylic biooxidation of various toluenes to aldehydes by peroxidases. **Tetrahedron Lett.**, v.43, p. 791-793, 2002.
- SAEKI, K.; HARA, K. **Topical compositions containing Tetrahedron Lett., bisabolol for the treatment of acne**. Jpn. Kokai Tokyo Jp 63 27425 (88 27425) (IPC A61K-031/045). 5 feb 1988, appl. 86/171354.21 jul 1986, 5pp.

SAKAI, T.; KISHIMOTO, T.; TANAKA, Y.; EMA, T.; UTAKA, M. Low-temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalysed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols. **Tetrahedron Lett.**, v.39, p. 7881-7884, 1998a.

SAKAI, T.; MIKI, Y.; NAKATANI, M.; EMA, T.; UNEYAMA, K.; UTAKA, M. Lipase-catalysed kinetic resolution of 2-acyloxy-2-(penta-fluorophenyl acetonitrile). **Tetrahedron Lett.**, v.39, p. 5233-5236, 1998b.

SAKAMOTO, K.; IIDA, K.; SAWAMURA, K.; HAJIRO, K.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T.; FUKUYA, T. Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. **Phytochemicals**, v.33, p.357-360, 1992.

SAKAMOTO, Y.; ONISHI, N.; HIROSAWA, T. Delivery systems for tissue culture by encapsulation in: AITKEN-CHRISTIE, J. KOSAI, T, SMITH, M.A.L. ed. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994., p. 215-243.

SALGADO-GARCICLIA, R.; OCHOA-ALEJO, N., Increase capsaicin content in PFP resistant cells of chilli pepper (*Capsicum annum* L.) **Plant. Cell. Rep.**, v.8, p.617-620, 1990.

SANDRA, P.; BICCHI, C. **Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis**. New York: Huething, 1987.

SANFILIPINO, C.; NICOLOSI, G. Catalytic behavior of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in oxidation of cyclic conjugated dienes. **Tetrahedron Asymmetry**, v.13, p. 1889-1892, 2002.

SANO, S.; HAYASHI, K.; MIWA, T.; ISHII, T.; FUJII, M.; MIMA, H.; NAGAO, Y. New enantiodivergent procedure for the chiral α -alkyl- α -aminomalonates utilizing enzymatic hydrolysis, **Tetrahedron Lett.** v.39, p. 5571-5574, 1998.

SASSE, F., KNOBLOCH, K, BERLIN, J. Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmata* In: FUJIWARA, A. editor. **Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture**. Tokyo: Abe , 1982., p.343-344.,

SAYED, A. K.; HALIM, A.F.; ZAGHLOUL, A.M.; DUMBAR, D.C.; McCHESNEY, J.D. Transformation of jervine by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. **Phytochemistry**, v.55, p.19-22. 2000.

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

SCHMITZ, G.; FRANKE, D.; STEVENS, S.; TAKORS, R.; WEUSTER-BOTZ, D.; WANDREY, C. Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella*

blakesleeana. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p. 313-324, 2000.

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

SCHUTZE, B., WUBBOLTS, M.G. Biocatalyses for industrial production of the chemicals. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.10, p. 609-615, 1999.

SCHWAB, W.; WILLIAMS, D.C.; CROTEAU, R. Mechanism of monoterpene cyclization: stereochemistry of transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 20, p. 415-421, 2002.

SHARPELL, F.H. **Comprehensive Biotechnology**. Oxford and New York: Pergamon, 1985.

SHIMODA, K.; YAMANE, S.; HIRAKAWA, H.; OHTA, S.; HIRATA, T. Biotransformation of phenolic compounds by cultures cell of *Catharanthus roseus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 275-281, 2002.

SIH, C.J.; WU, S-H. In: Eliel, E.L., Allinger, N.L., Denmark, S.E., (Eds.), **Topics in Stereochemistry**, , New York: Interscience, 1989, v.19, p. 63.

SILVERMAN, R.B. **The Organic Chemistry of Enzyme-catalysed Reactions**, New York: Academic , 2000, p.8000.

SOLER, F.; POUJADE, C.; EVERS, M.; CARRY, J.C.; HENIN, Y. Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1069-1083, 1996.

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

STAFFORD, A.; GRAHAM, W. **Plant cell and tissue culture**. Londres: Open University, 1991.

SUGA, T.; HIRATA, T. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell culture. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2393-2406, 1990.

SUN, D-A. Biotransformation of 4(20),11(12)-taxadiene derivatide. **Bioorg. Med. Chem.** v.9, p. 793-800, 2001.

SUSKE, W. A. Purification and characterization of 2-hydroxybifhenyl 3-monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP1. **J. Biol. Chem.** v.272, p. 24257-24265, 1997.

SWEERS, H.M.; WONG, C-H. Enzyme-catalysed regioselective deacylation of protected sugars in carbohydrate synthesis. **J. Am. Chem. Soc.** v.108, p. 6421-6422, 1986.

TABATA, M.; FUGITS, Y. Production of shikonin by plants cultures. In: ZAITLIN, M., DAY, P., HOLLANDER, A. **Biotechnology in Plant Science**, New York: Academic, 1985, p. 207-218.

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

TAKAGI, K.; MIKAMI, Y.; MINATO, Y.; YAJIMA, I.; HAYASHI, K. (hasegawa Perfumery) **Bacterial oxidation of limonene to carvona**. Jpn Patent N^o. 7238998, 1972.

TAKAISHI, Y.; YANG, Y-L.; DITULLIO, D.; SIH, C.J. Bifuncional chiral synthons via microbiological methods: Optically-active α -hydroxy aldehydes **Tetrahedron Lett.**, v.23, p.5489, 1982.

TAKANO, S; Synthesis of natural-products using chiral glycol precursors. **Pure Appl. Chem.**, v.59, p. 353, 1987.

TAYLOR, S.J.C.; SUTHERLAND, A.G.; LEE, C., WISDOM, R.; THOMAS, S.; ROBERTS, S.M.; EVANS, C. Chemoenzymatic synthesis of (-)-carbovir utilizing a whole cell catalysed resolution of 2-azabicyclo(2.2.1)hept-5-en-3-one. **J. Chem. Soc. Chem. Comm.**, p.1120-1121, 1990.

TECELÃO, C.S.R.; KEULEN, F.; FONSEVA, M.M.R. Development of a reaction system for the selective conversion of (-)-trans-carveol to (-)-carvone with whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL 14. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p. 719-724, 2001.

THOMAS, S.M.; DiCOSMO, R.; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 238-242, 2002.

TICOZZI, C.; ZANAROTTI, A. Baker's yeast reduction of 5-acetyl-2-isoxazolines synthesis of enantiomerically pure 2,3-dihydroxy ketones and 1,2,4-triols. **Tetrahedron Lett**, v.29, p. 6167, 1988.

TONIAZZO; G. DE OLIVEIRA; D; DARIVA, C, OESTREICHER, E.G., ANTUNES, O.A.C. Biotransformation of (-) beta-pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.121, p.837-844, 2005.

TORSELL, K.G.B. Natural Product Chemistry. **Apotekarsociteten-Swedish Pharmaceutical Society**, v. 16, p. 53-72. 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A. **Microbiologia**, 3^a. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TRIGO, J.R.; LEAL, I.R.; MATZENBACHER, N.I.; LEWINSOHN, T.M. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1011-1022, 2003.

TYLER, V. E.; ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, 1996.

TYRRELL, M.H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technol.**, v.44, p. 68-74, 1990.

UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Enzyme-catalysed polymerization to functional polymers. **J. Mol. Catal. B. Enzym.** v.785, p. 1-11, 2002.

VAN DEN HEUVEL, R.H.H., Vanillyl-alcohol oxidase, a tasteful biocatalyst. **J. Mol. Catal. B. Enzym.**, v.11, p. 185-188, 2001.

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

VENEK T.; VALTEROVA, I.; VANKOVA, R.; VAISAR, T. Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. **Biotechnol Lett.**, v.21, p. 625-628, 1999a.

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

WACKETT, L.P. Mechanism and applications of Rieske non-haem iron dioxygenases. **Enzyme Microb. Technol.** v.31, p. 577-587. 2002.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p. 239-254, 1996.

WARZECHA, H.; OBITZ, P.; STOCHIGT, J. Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- β -glucosidase from cell culture of *Rauwolfia serpentine*. **Phytochemistry**, v.50, n 7, p. 1099-1109, 1999.

WELSH, F.W.; MURRAY, W.D.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, p. 15-115, 1989 .

WITIAK, D.T.; INBASEKARAM, M.N. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 4th Ed. ; New York: Wiley-Interscience, v.18, p. 511, 1982.

YAMAMOTO, K.; OISHI K.; FUJIMATSU I.; KOMATSU K.I., Production of (*R*)-(+)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC-8750. **Appl Environ. Microbiol.**, p. 3028-3032, 1991.

YAMAMOTO, T., MIZUGUCHI, R., Yamada Y. Selection of a high stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. **Their Appl. Genet.**, v.16, p.113-116, 1982.

YASUKAWA, K.; TAKIDO, M.; MATSUMOTO, T.; TAKEUCHI, M.; NAKAGAWA, S. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. **Oncology**, v. 48, p. 11799-11803, 1991.

YE, M.; DAI, J.; GUO, H.; CUI, Y.; GOU, D. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus*. **Tetrahedron Lett.** v.43, p. 8535-8538, 2002.

YEOMAN, M.M. Techniques, characteristics, properties and commercial potential of immobilized plant cells. **Cell Culture and Somatic Cell genetics of plants**, v.4, p. 197-215, 1985.

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

ZAFFAR, R.; AERI, V.; DATTA, A. Application of plant tissue and cell culture for production of Secondary Metabolites. **Fitoterapia**, v. 43, n.1, p. 33, 1992.

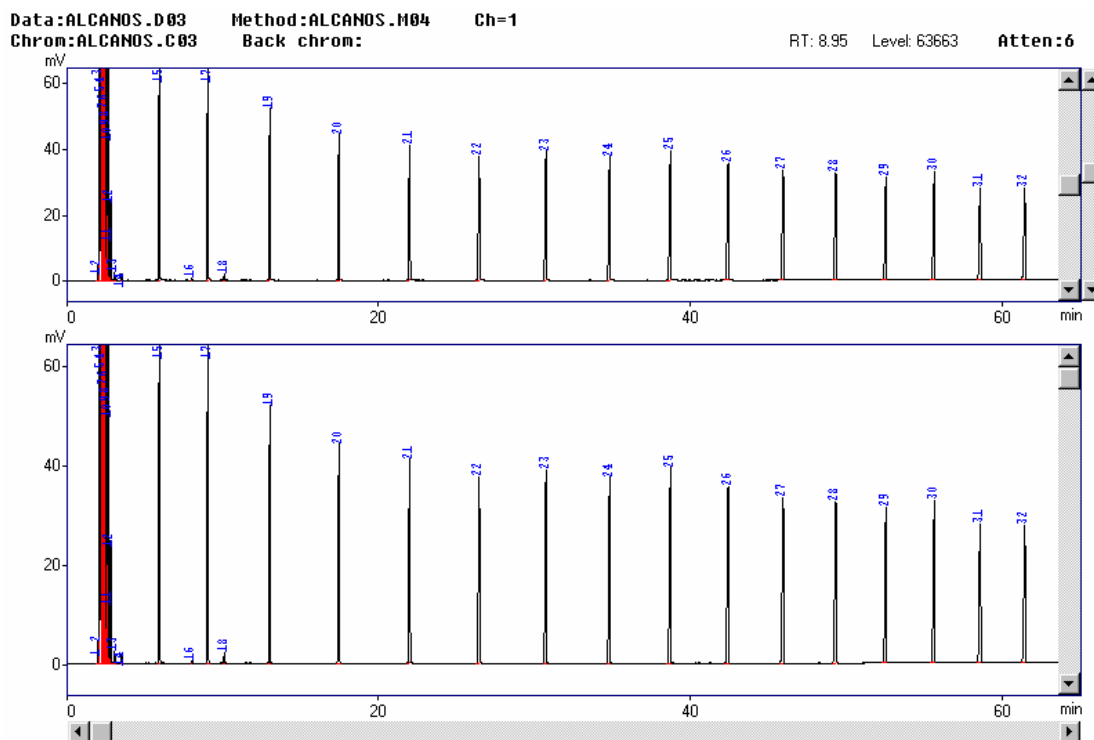
ZAKS, A. Industrial Biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 130-136, 2001.

ZENK, M. H. The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. In: THORPE, T. A. **Frontiers of plants Tissue Culture**, Alberta: University of Calgary, 1978, p. 1-13.

ZENK, M.H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as pot of gold. **Phytochemistry**, v.30, p. 3861-3863. 1999.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Cromatograma e equação utilizados para os cálculos dos índices de retenção dos produtos formados.



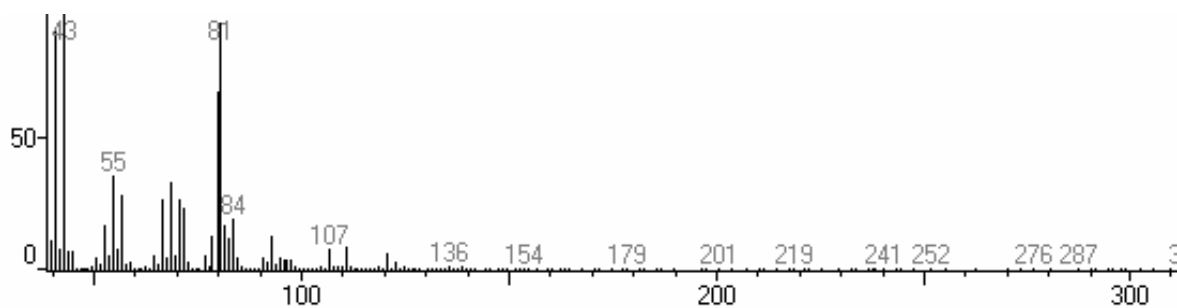
$$I_r = \frac{(RT_m - RT_n) \times 100 + 100n}{(RT_m - RT_n)}$$

Onde:

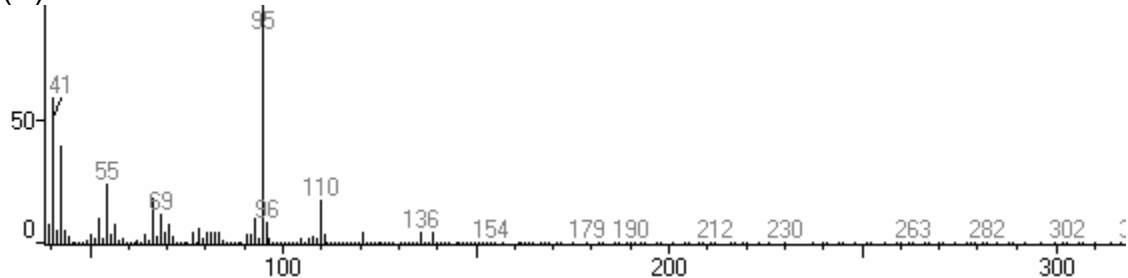
n = número de carbonos do carbono mais leve
 m = número de carbonos do carbono mais pesado

ANEXO 2: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células vegetais de *C. roseus* em reação de biotransformação utilizando (*R*)-(+)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (Fenchol), (B) produto 2 ((Borneol), (C) Produto 3 (Terpinen-4-ol) e (D) produto 4 (Terpineol).

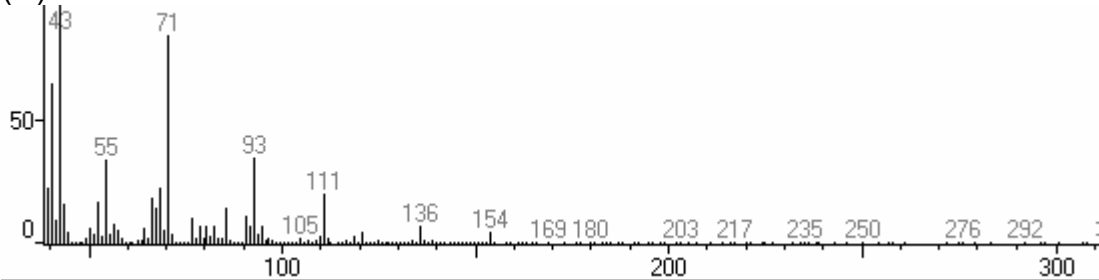
(A)



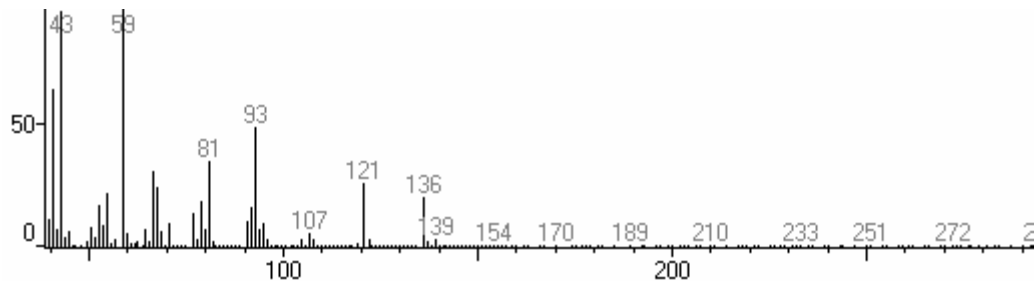
(B)



(C)

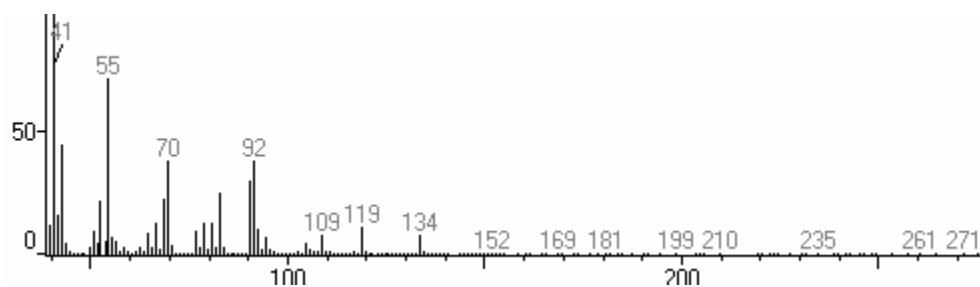


(D)

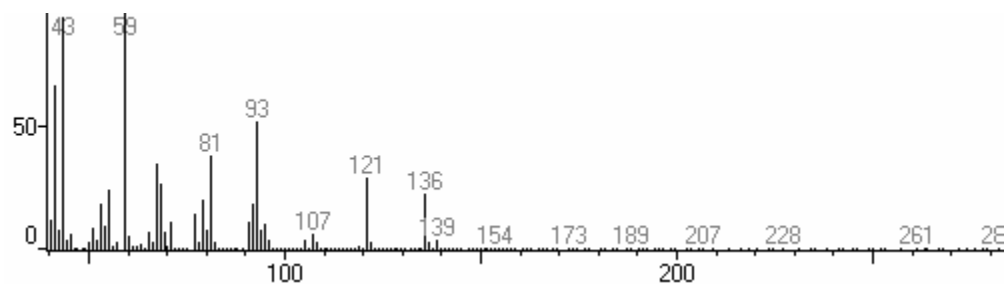


ANEXO 3: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células vegetais de *C. roseus* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (*trans*-pinocarveol), (B) produto 2 (Terpineol), (C) Produto 3 (Mirtenol) e (D) produto 4 (Não identificado).

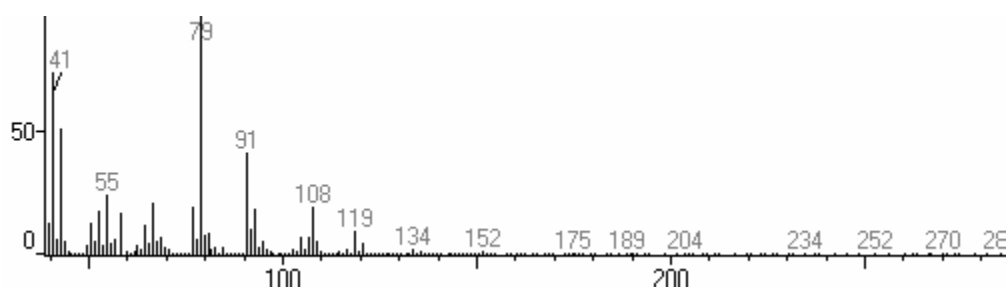
(A)



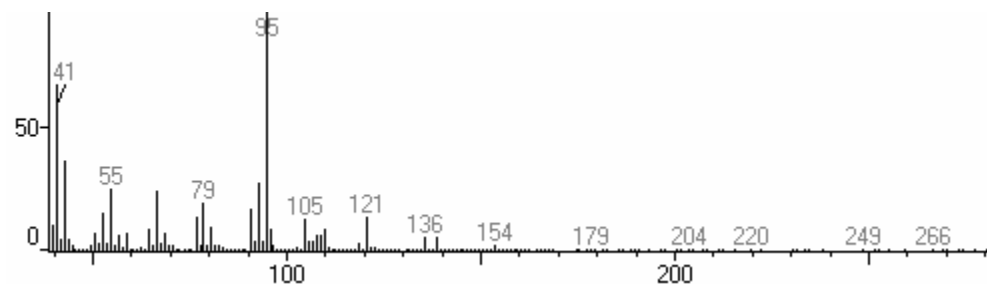
(B)



(C)

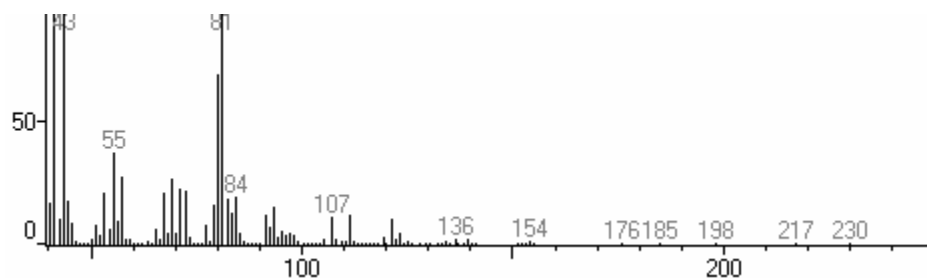


(D)

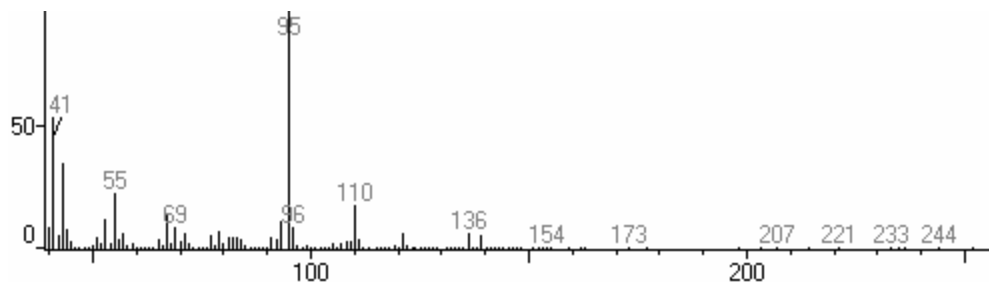


ANEXO 4: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células vegetais de *C. roseus* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- β -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (Fenchol), (B) produto 2 (Borneol), (C) Produto 3 (Terpineol) e (D) produto 4 (Hidrato de Terpineol).

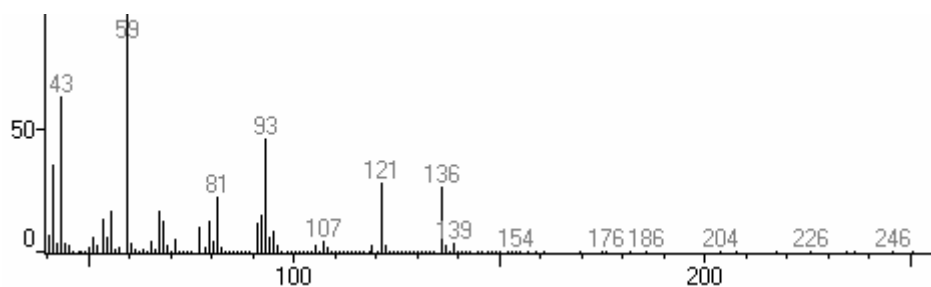
(A)



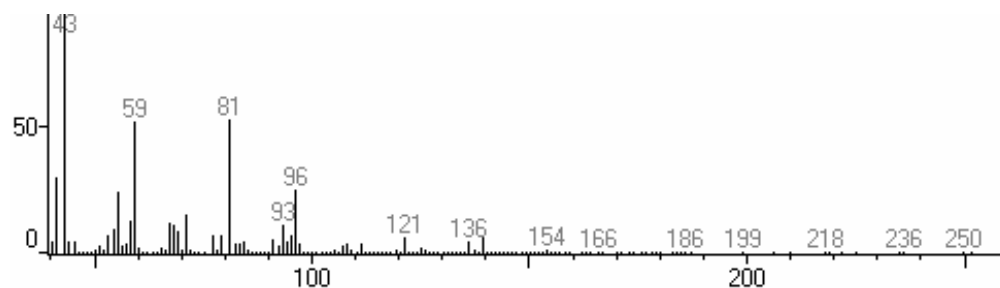
(B)



(C)

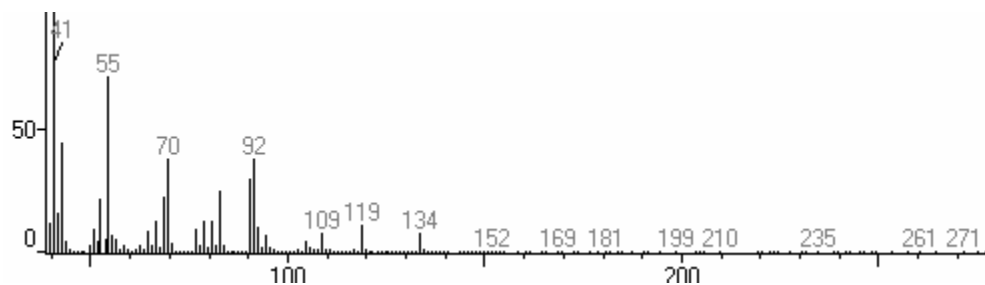


(D)

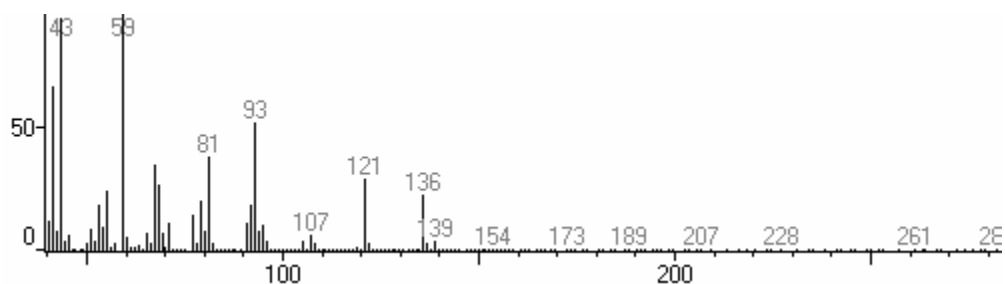


ANEXO 5: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. elegans* em reação de biotransformação utilizando (*R*)-(+)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (*trans*-pinocarveol), (B) produto 2 (Terpineol), (C) Produto 3 (Mirtenol) e (D) produto 4 (Verbenona).

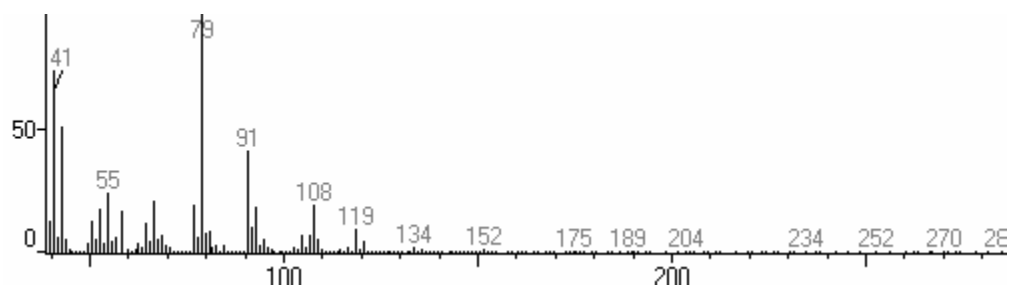
(A)



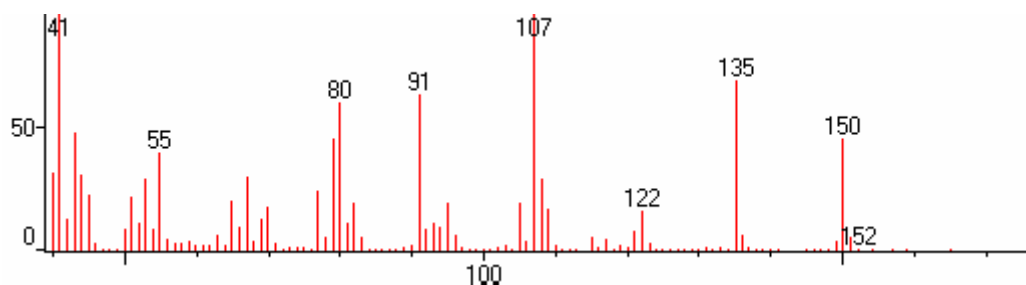
(B)



(C)

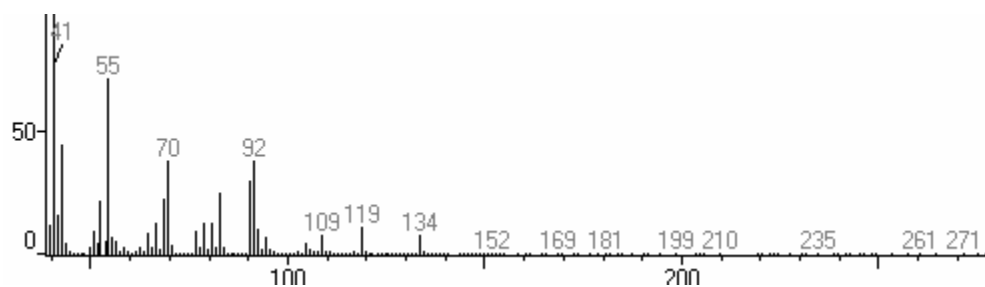


(D)

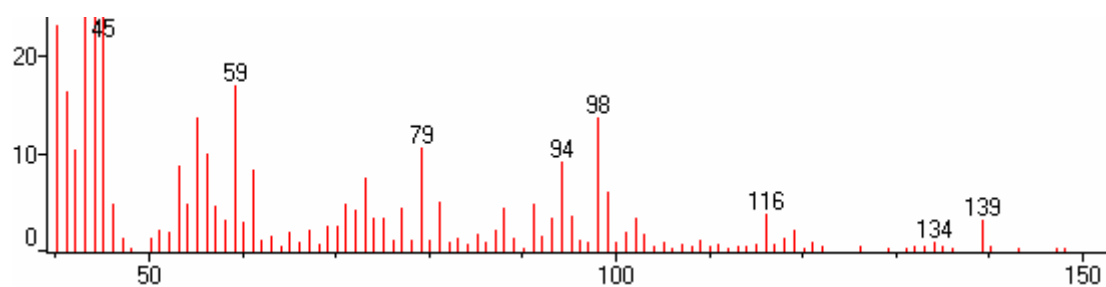


ANEXO 6: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. echinulata* em reação de biotransformação utilizando (*R*)-(+)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (*trans*-pinocarveol), (B) produto 2 (Menta-1,5-dien-8-ol), (C) Produto 3 (Cimen-8-ol), (D) produto 4 (Terpineol), E produto 5 (Mirtenol) e (F) produto 6 (Verbenona).

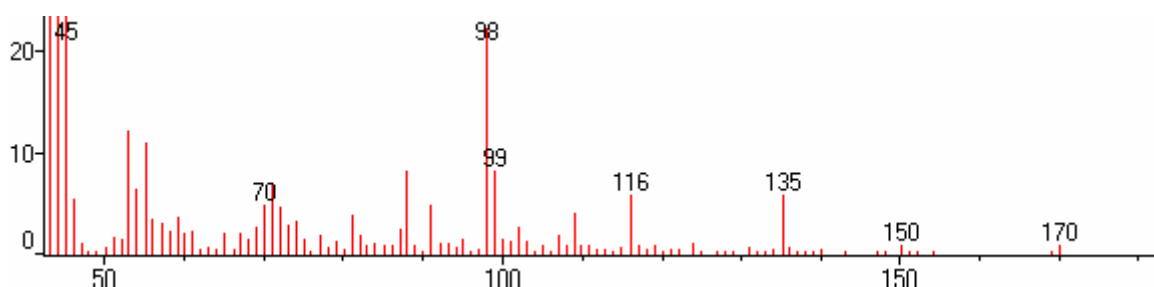
(A)



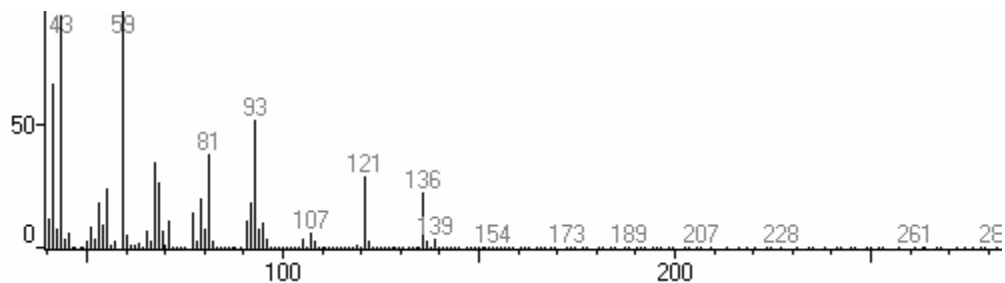
(B)



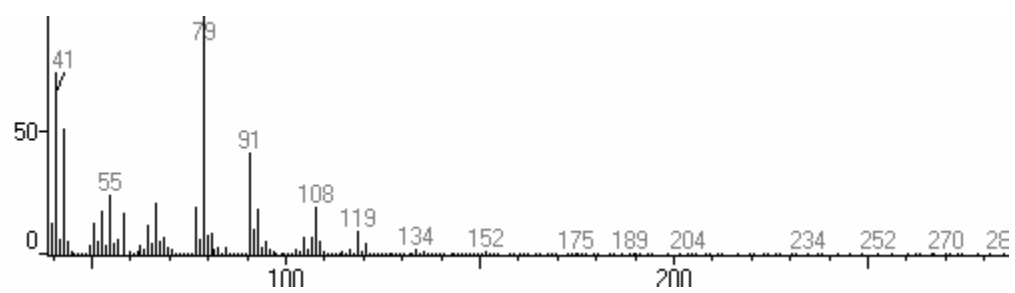
(C)



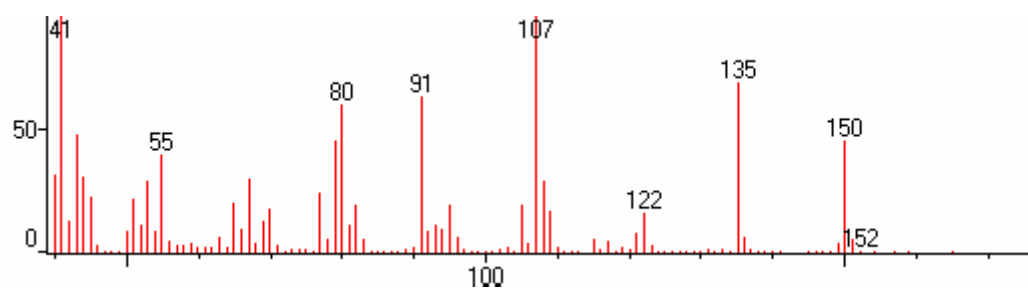
(D)



(E)

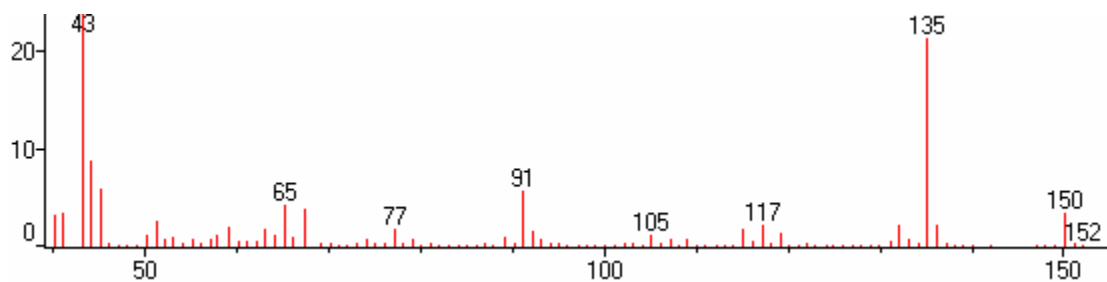


(F)

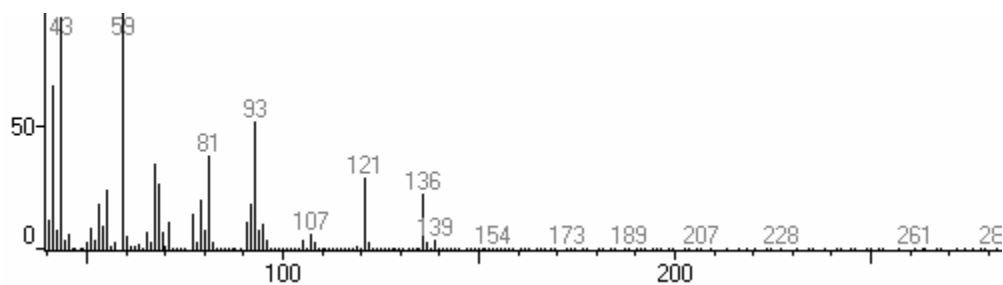


ANEXO 7: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. elegans* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 3 (Não identificado), (B) produto 4 (Terpineol), (C) produto 5 (Dihidro-carvona) e (D) produto 6 (Verbenona).

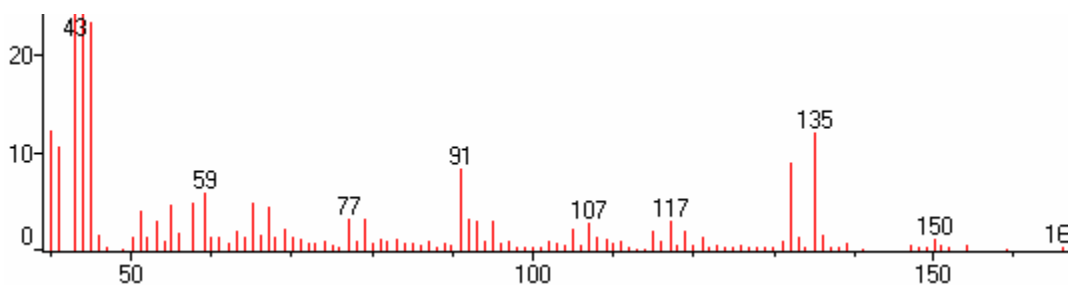
(A)



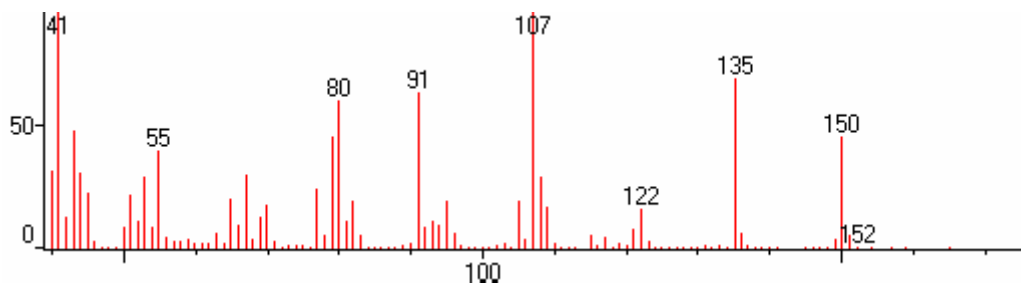
(B)



(C)

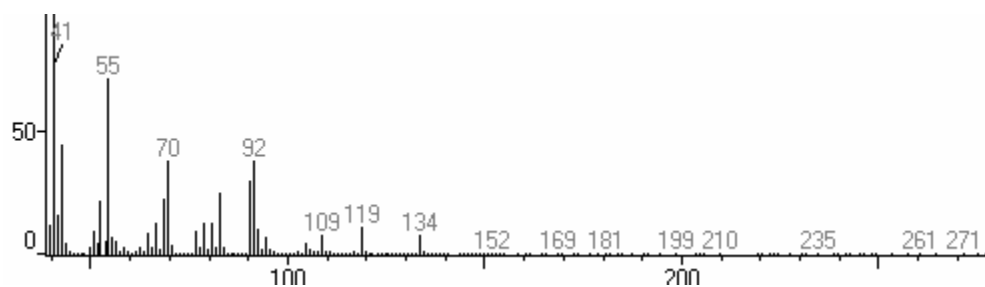


(D)

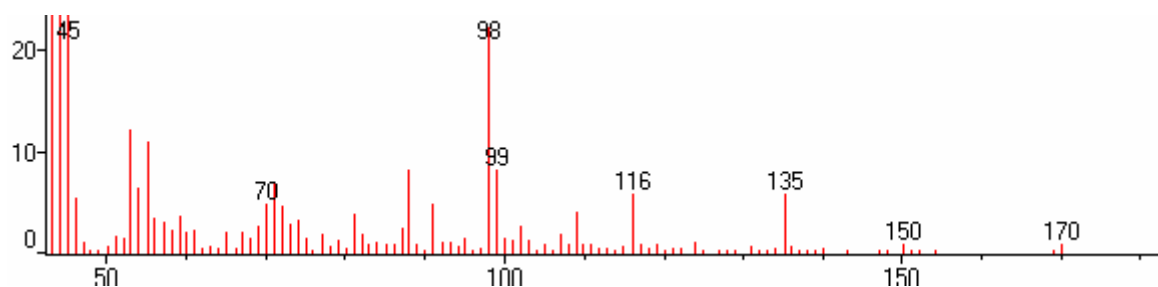


ANEXO 8: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. echinulata* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- α -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (*trans*-pinocarveol), (B) produto 2 (Cimen-8-ol), (C) produto 3 (Terpineol), (D) produto 4 (Mirtenol) e (E) produto 5 (Verbenona).

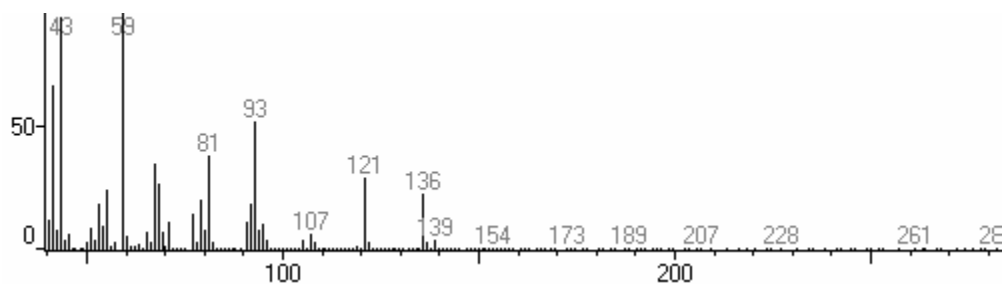
(A)



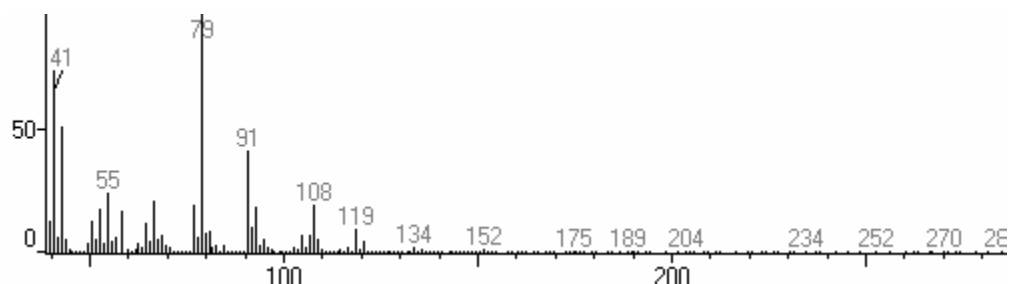
(B)



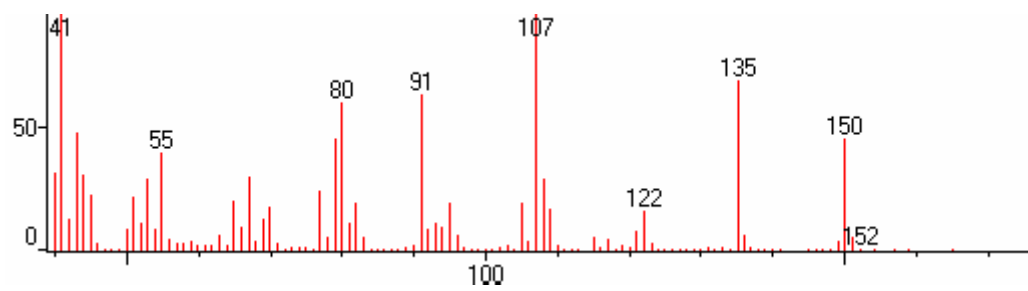
(C)



(E)

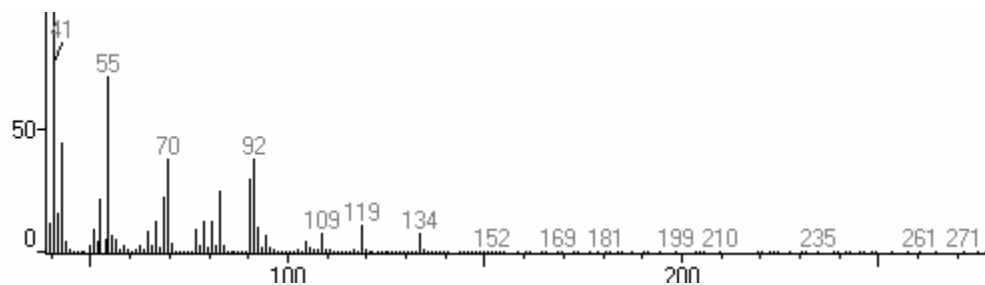


(F)

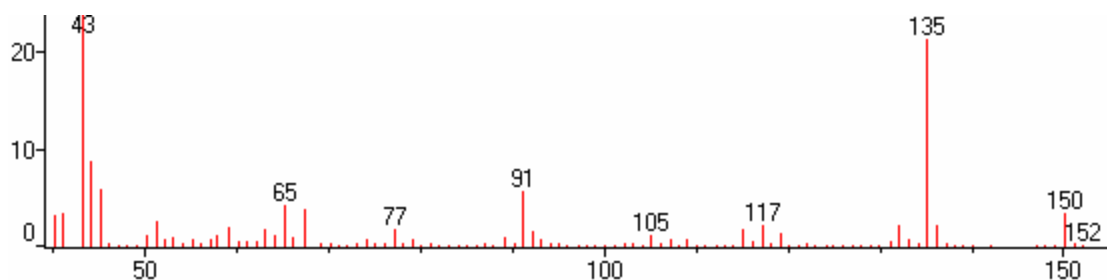


ANEXO 9: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. elegans* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- β -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (*trans*-pinocarveol), (B) produto 2 (Não identificado), (C) produto 3 (Terpinen-4-ol), (D) produto 4 (Terpineol), (E) produto 5 (Mirtenol) e (D) produto 6 (Verbenona).

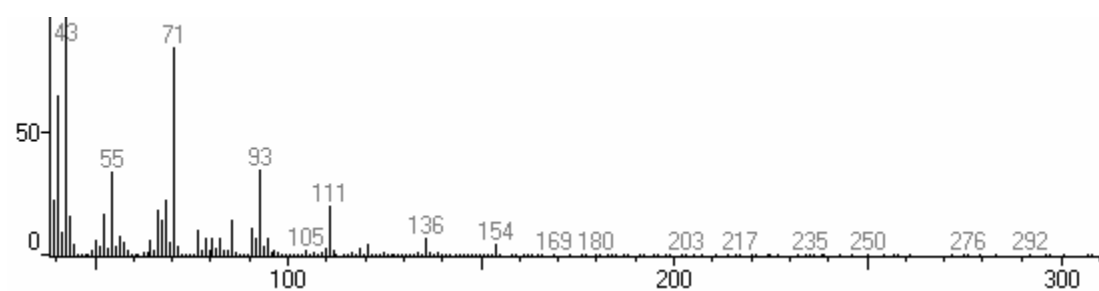
(A)



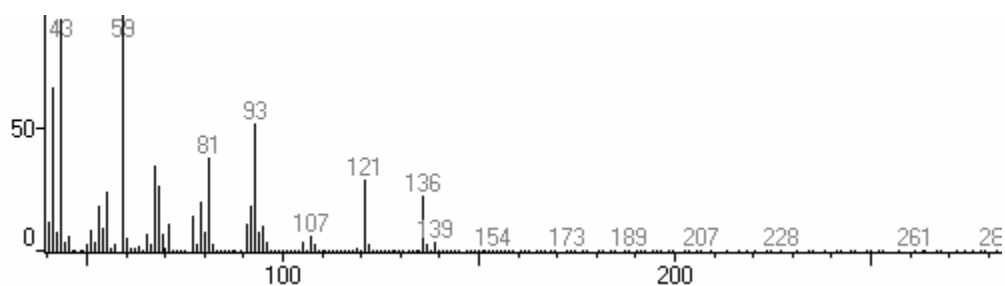
(B)



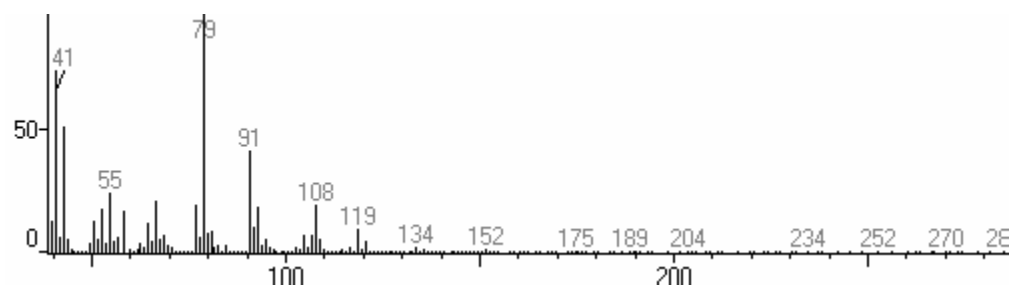
(C)



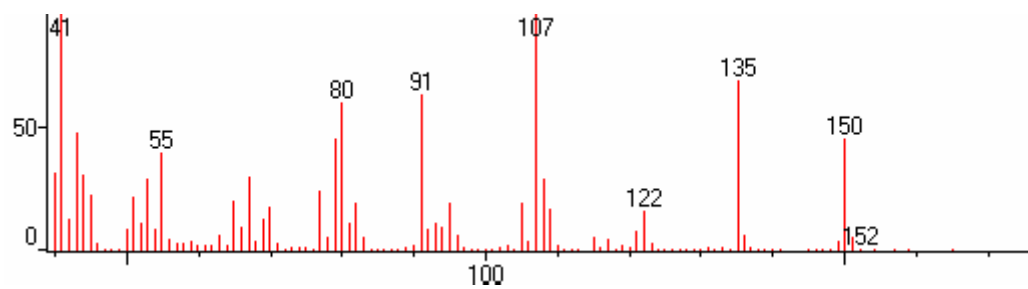
(D)



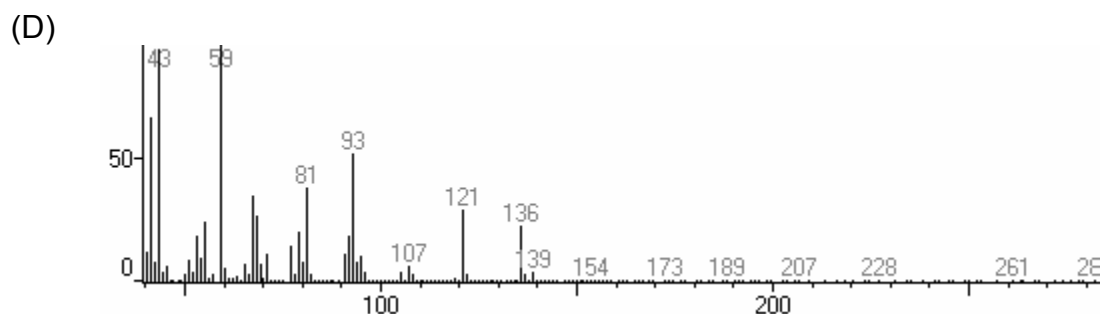
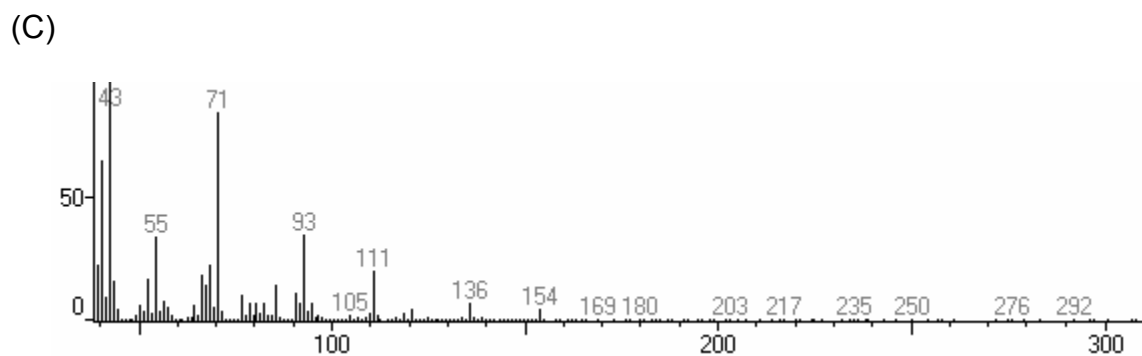
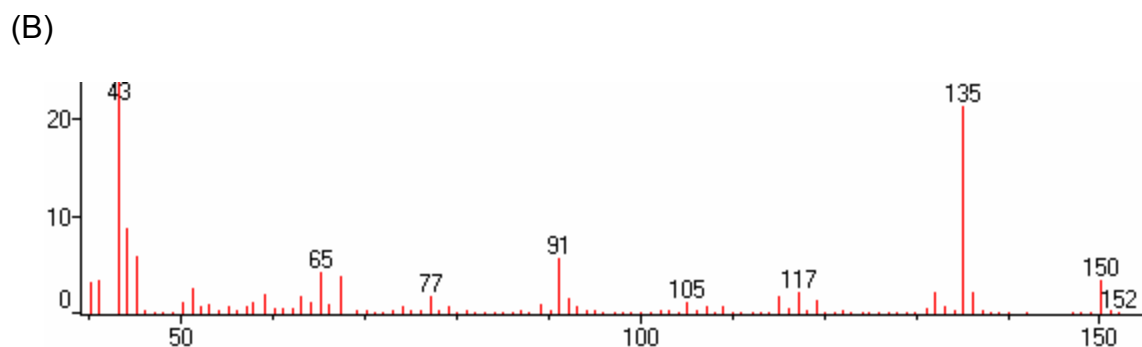
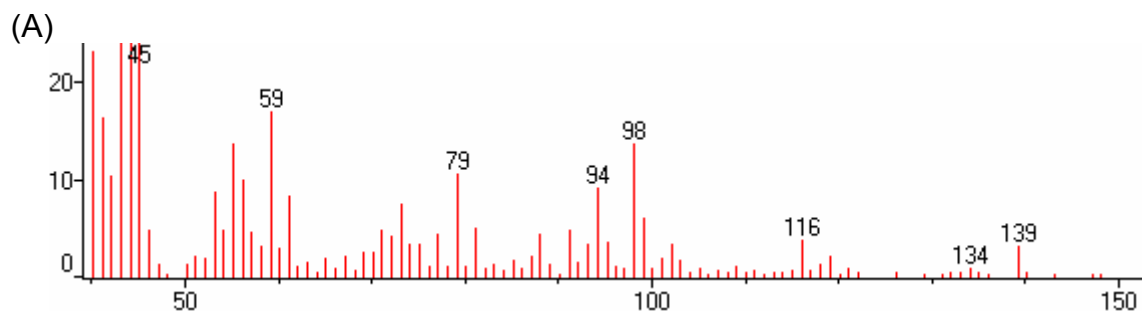
(E)



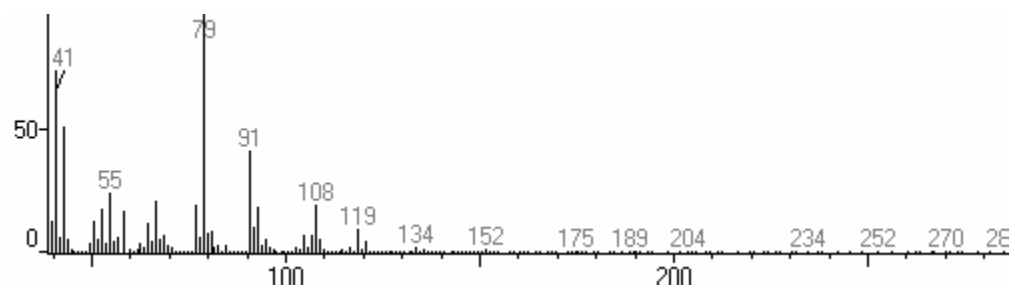
(F)



ANEXO 10: Cromatogramas produtos de biotransformação obtidos com cultura de células de *C. echinulata* em reação de biotransformação utilizando (S)-(-)- β -pineno como substrato, sendo (A) produto 1 (Menta-1,5-dien-8-ol), (B) produto 2 (Não identificado), (C) produto 3 (Terpinen-4-ol), (D) produto 4 (Terpineol) e (E) produto 5 (Mirtenol).



(E)



9. BIOGRAFIA

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2001 - 2006 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Amélia Terezinha Henriques
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1998 - 2000 Mestrado em Síntese Orgânica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil
Título: Adição de Nucleófilos de Carbono a Íons Imínio e N-acilimínio Cíclicos Promovida por Tricloreto de Índio, Ano de obtenção: 2001
Orientador: Dennis Russowsky
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1992 - 1998 Graduação em Química Industrial.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Vínculo institucional
1993 - 1995 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime : Parcial
1998 - 2001 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime : Dedicção Exclusiva
2001 - 2005 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorado , Carga horária: 40, Regime : Dedicção Exclusiva
2005 - Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Desenvolvimnto Tecnológico Industrial , Carga horária: 40, Regime : Integral

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LIMBERGER, R. P., FERREIRA, L., CASTILHOS, T., ALEIXO, A., PETERSEN, R. Z., GERMANI, J., ZUANAZZI, J. A. S., FETT-NETTO, A. G., HENRIQUES, A. T
The Ability of Bipolaris sorokiniana to modify geraniol and (-) alpha-bisabolol as exogenous substrates. *Applied Microbiology Biotechnology.* , 2003.
2. RUSSOWSKY, D., PETERSEN, R. Z., GODOI, M., PILLI, R. A.
Addition of Silylated carbon nucleophiles to iminium and cyclic N-acyliminium ions promoted by InCl₃. *Tetrahedron Letters.* , v.41, p.9939 - 9942, 2000.

Artigos em jornal de notícias

1. PETERSEN, R. Z., LIMBERGER, R. P., CATTANI, V. B., RUSSOWSKY, D., ALEIXO, A., FETT-NETTO, A. G., ZUANAZZI, J. A. S., HENRIQUES, A. T.
Biotransformación se (-)-alfa-pineno por *Catharanthus roseus*, *Psychotria brachyceras* y *Rauvolfia sellowii*. *Noticias técnicas del laboratorio.* , p.10 - 12, 2004.