



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 122012032034-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 20/11/2002

**(45) Data de Concessão:** 12/07/2016



---

**(54) Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENONA A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO POR RUBIÁCEAS

**(51) Int.Cl.:** C07C 35/00; C07C 49/543

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** ARTHUR GERMANO FETT NETO, AMÉLIA TERESINHA HENRIQUES, ADRIANA MENDES ALEIXO, RENATA PEREIRA LIMBERGER

## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENONA A PARTIR DE ALFA-PINENO POR  
BIOTRANSFORMAÇÃO POR RUBIÁCEAS

5 **Dividido do Pedido de Patente de Invenção Nº PI0205431-0,  
depositado em 20/11/2002**

### **Campo da Invenção**

A presente invenção diz respeito a um processo de obtenção de verbenona a partir de alfa-pineno por biotransformação. Mais especificamente, a presente invenção diz respeito ao processo de  
10 obtenção de verbenona por biotransformação, com rendimentos de conversão elevados, em presença de células de rubiáceas (*Rauvolfia selowii* e *Psychotria brachyceras*) como biocatalisadores.

### **Estado da Técnica**

Biotransformação pode ser definida como todo e qualquer  
15 processo químico efetuado por um biocatalisador, este sendo entendido como qualquer material biológico que exiba atividade enzimática, incluindo, desde enzimas isoladas até células metabolicamente viáveis. O biocatalisador promove mudanças químicas de produtos de origem natural ou sintéticos que não são seus substratos naturais, ou seja, não  
20 nutritivos ao organismo, denominados xenobióticos. Distingue-se da biossíntese, a qual é definida como a capacidade natural de síntese de sistemas biológicos em ambiente normal.

A aplicação da biocatálise começou a ser evidenciada no século XIX, quando Pasteur utilizou o fungo *Penicillium glaucum* para obter L-  
25 tartarato de amônio a partir de uma mistura racêmica dos isômeros D e L. Estes estudos preliminares geraram uma cascata de outros trabalhos, tendo como principal obstáculo, na ocasião, a dificuldade de obtenção de culturas puras. A partir de então, o aumento do número de trabalhos

utilizando reações de biotransformação foi baseado, inicialmente, em reações catalisadas por *Saccharomyces cerevisiae*, como a produção microbiológica de acetona, glicerol e butanol durante a Primeira Guerra Mundial. Posteriormente, com o uso de leveduras contaminadas por

5 bactérias, ficou caracterizado o potencial biocatalítico destes microorganismos.

Em se tratando de metabólitos secundários e seus intermediários, o primeiro exemplo de reações de biotransformação conhecido pode ser considerado como a condensação estereoseletiva de benzaldeído com

10 piruvato endógeno, mediada por *S. cerevisiae*, levando à formação de (*R*)-1-hidroxi-1-fenil-propan-2-ona, a qual é facilmente convertida em (1*R*,2*S*)-efedrina, alcalóide com propriedades adrenérgicas, utilizado no tratamento de asma, hipotensão e congestão nasal.

Outras aplicações industriais desenvolvidas na mesma década

15 foram a síntese da Vitamina C (1934) e a redução de androstenediona para testosterona, ambas utilizando *S. cerevisiae* (1937). Esta última caracterizou uma das maiores aplicações industriais das reações de biotransformação, a produção de hormônios sexuais.

Apesar de culturas de células vegetais serem biocatalisadores

20 altamente viáveis, devido a sua capacidade de produzir uma vasta gama de micromoléculas, além de constituírem uma ferramenta importante na regulação da produção de metabólitos de interesse, somente em 1964, foram publicados estudos relacionados à habilidade destes sistemas em transformar substratos exógenos, visando à obtenção de metabólitos

25 secundários. Assim, o artigo de Sthols, S. J.; e Staba, E. J. "Production of Cardiac glycosides by plant tissue culture. IV. Biotransformation of digitoxigenin and related substances". *Journal of Pharmaceutical Science*, v.54, p.56-64, 1964, relata a suplementação de culturas de células de *Digitalis lanata* com o cardenólido digitoxigenina com

isolamento, após 7 dias, de um produto, posteriormente denominado 3-desidrodigitoxigenina.

Desde então, centenas de espécies vegetais têm sido cultivadas *in vitro*, e o número de substâncias passíveis de serem bioconvertidas por culturas de células é praticamente ilimitado. Estes estudos vêm sendo realizados, não só visando à síntese assimétrica de substâncias biologicamente ativas ou de seus intermediários, mas também à resolução de muitas misturas racêmicas, à degradação de praguicidas e, mais recentemente, à avaliação do metabolismo de fármacos, imprescindível para a avaliação clínica dos mesmos, possibilitando maior segurança na introdução de novos produtos no mercado.

Comparativamente com outras classes de metabólitos secundários, mono e sesquiterpenóides têm sido intensivamente investigados visando à obtenção de produtos naturais específicos de relevância industrial ou de seus equivalentes (*natural identicals*), principalmente quando associados à tendência de substituição de flavorizantes sintéticos por seus equivalentes naturais (NACs: *natural aroma chemicals*), produzidos por processos biocatalíticos e não químicos, os quais podem ser incluídos em alimentos e perfumes sem serem considerados aditivos. De acordo com o FDA (Food and Drug Administration), NACs devem ser obtidos de fontes naturais ou produzidos de um material de partida natural, sendo o produto final idêntico a algum produto já existente na natureza, conforme citado por Demyttenaere, J. C. R. e Kimpe, N. – “Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.265-270, 2001.

Um exemplo de bioconversão de monoterpênóides é a hidroxilação de alfa-pineno em verbenol em presença de *Aspergillus niger* descrita por Agrawal, R.; Deepika, N. U. A.; Joseph, R. – “Strain improvement of

*Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* by induced mutation for biotransformation of alpha-pinene to verbenol.” *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, n.2, p. 249-252, 1999.

5 Apesar de secular, o interesse na aplicação de enzimas como biocatalisadores tem aumentado muito nas últimas décadas, principalmente devido a sua alta versatilidade, às condições brandas de temperatura e pH em que são efetuadas as reações, à alta seletividade aos substratos, incluindo quimio-, régio- e enantio-especificidade e à ausência de solventes e aditivos reacionais que poderiam deixar  
10 resíduos inconvenientes. Atualmente, cerca de 35% dos fármacos enantiomericamente puros produzidos e comercializados envolvem etapas biocatalíticas e pode-se inferir que, num futuro próximo, este número ascenda a 70%.

15 Quanto à escolha do sistema biocatalítico, são inúmeros os fatores que podem determinar o sucesso de uma reação de biotransformação, como a escolha do processo a ser utilizado, tipo de substrato e de reação (enzima), variações no meio reacional, necessidade de cofatores e a escala na qual a biotransformação será conduzida.

20 Algumas diretrizes devem ser seguidas para a definição da metodologia mais apropriada. Por exemplo, a utilização de enzimas isoladas pode ser vantajosa quando estas dispensam a presença de cofatores, como hidrolases, isomerases e liases, uma vez que estes produtos representam um custo bastante expressivo em processos industriais.

25 Além disto, apesar de existirem numerosas enzimas que se ligam estritamente a determinado substrato, um número considerável delas possui uma alta tolerância por xenobióticos, conservando suas peculiaridades catalisadoras com relação às seletividades químicas, régio- e enantiomérica. Neste contexto, podemos destacar aquelas que

envolvem a introdução de grupamentos oxigenados, principalmente em carbonos não reativos, considerando-se que a maioria das moléculas biologicamente ativas apresentam grupos hidroxílicos, carbonílicos e epóxidos.

5 As enzimas capazes de introduzir um átomo de oxigênio em um substrato, as monooxigenases, podem catalisar várias reações assimétricas sinteticamente úteis como hidroxilação de alifáticos, epoxidação de alquenos, sulfoxidação de tioésteres e oxidação de cetonas do tipo Bayer-Villiger. Entretanto, a maioria destas reações deve  
10 ser efetuada com sistemas de células íntegras e não com enzimas isoladas, uma vez que elas requerem a presença de cofatores como íons metálicos ou coenzimas.

Ainda, a aplicação eficaz de enzimas isoladas tem sido limitada, devido a uma série de restrições, particularmente quanto à sua  
15 estabilidade funcional, instabilidade fora do ambiente celular, podendo ser desativadas por mudança de conformação e ao fato de sua atividade e estrutura estáveis serem mantidas em meio aquoso, enquanto muitos substratos e seus produtos são instáveis ou pouco solúveis em água.

Para contornar esses problemas, algumas estratégias têm sido  
20 investigadas. A mais antiga é a via sintética que utiliza técnicas da química orgânica buscando a síntese de catalisadores com atividades semelhantes às de enzimas. Mas, em se tratando de reações de oxidação, as técnicas biocatalíticas fornecem processos com eficiência sem paralelo nos métodos químicos. Um exemplo clássico é a  
25 hidroxilação regioseletiva de esteróides, realizada rotineiramente em escala industrial, como a hidroxilação da progesterona na posição 11 $\alpha$ , efetuada por *Rhizopus arrhizus* ou *Aspergillus niger*, conforme o artigo por Peterson, D. H., Murray, H. C., e Eppstein, S. H., "Microbiological

transformations of steroids.1. Introduction of carbon-11 of progesterone.” *Journal of American Chemical Society*, v.74, n.23, 5933-5936, 1952, a técnica descrita permitindo eliminar cerca da metade das 37 etapas de síntese do esteróide, resultando em considerável redução dos custos de produção.

A utilização de procedimentos para a imobilização das enzimas ou células íntegras e a utilização de meios reacionais aquo-restritos têm tido outras abordagens utilizadas no intuito de viabilizar as técnicas biocatalíticas.

As técnicas de imobilização por fixação do biocatalisador em um suporte sólido promovem a utilização mais eficiente de biofermentadores, mas, por outro lado, a menor flexibilidade espacial para as enzimas resulta em decréscimo de atividade e dificuldades na permeabilização do substrato ou produto através da membrana plasmática.

A catálise enzimática em meio orgânico (meio aquo-restrito) possui uma enorme potencialidade para aplicação em síntese orgânica, principalmente quando envolve lipases, esterases e desidrogenases, como na separação de álcoois ou ácidos racêmicos, síntese de peptídeos, síntese de aspartame e intraesterificação regioseletiva de óleos e gorduras, podendo ser considerada uma forma direta para contornar problemas de solubilidade e estabilidade dos substratos, diminuir o volume reacional, possibilidade de trabalhar em condições de temperatura muito mais drásticas que as usuais em meio aquoso e facilidade nos procedimentos de separação. Apesar do reconhecimento destes benefícios, o número de trabalhos utilizando enzimas em meio orgânico é, ainda, bastante recente e limitado, quando comparado com a profusão de trabalhos realizados em meio aquoso, principalmente devido ao fato de solventes orgânicos apresentarem maior risco à saúde do analista (por serem tóxicos, inflamáveis e/ou explosivos), além de

poderem acarretar problemas ambientais, especialmente evidenciados quando operacionalizados em escala industrial. Outro fator limitante da aplicação de enzimas em meio não-aquoso é relativo ao pH. Todas as reações enzimáticas são fortemente dependentes do pH visto que o estado de ionização da enzima é essencial para a catálise. Questões como a protonação e desprotonação da enzima, que raramente ocorrem de maneira perceptível em meio orgânico, e como a enzima reconhece o pH em solventes orgânicos anidros, ainda não têm soluções adequadas. Muitos autores consideram que a enzima “recorda-se” do pH da última solução aquosa ao qual foi exposta, o que tem sido chamado de “memória de pH”.

Assim, considerando que células de organismos vivos constituem-se em pequenos reservatórios contendo todos os suprimentos (reagentes e catalisadores) necessários para que os processos metabólicos ocorram, em muitos casos, o uso de células íntegras em meio aquoso torna-se vantajoso, por ser mais viável do que o uso de enzimas isoladas e meios aquo-restritos. Dentre os sistemas que utilizam células íntegras, os mais difundidos são os microorganismos e as células vegetais.

Os microorganismos são organismos mais primitivos, geralmente unicelulares, estruturalmente simples e pequenos, com parede celular mais simples e de crescimento mais rápido, já que possuem uma razão maior de área superficial, facilitando a assimilação de nutrientes, acelerando o crescimento e, conseqüentemente, as reações de biotransformação.

Em contrapartida, apesar de os microorganismos aceitarem transformar uma maior gama de substratos e em menor tempo, algumas reações são mais prováveis em células de 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 é capaz, como àquelas envolvendo ligações C-C, glicosilação, esterificação e hidroxilação. Essas reações, quando catalisadas por microorganismos, geralmente fornecem produtos secundários e com baixa taxa de conversão, sobretudo as glicosilações, já que glicosídeos não são reconhecidos como metabólitos secundários de microorganismos.

Além disto, considerando que o sistema enzimático de células íntegras é extremamente complexo, podendo haver uma variedade muito grande de enzimas competindo pelo mesmo substrato, o perfil de especificidade química varia de organismo a organismo, sendo que determinados sistemas podem oferecer conversões maiores e mais rápidas, mas com menor formação do produto desejado, seja em termos de rendimento ou de quiralidade.

Conforme relatado por Rech, S. B.; Batista, C. V. F.; Schripsema, J.; Verpoorte, R.; Henriques, A. T. "Cell cultures of *Rauvolfia sellowii*: growth and alkaloid production." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.54, p.61-63, 1998, culturas de calos de *R. sellowii* (jasmim-grado) foram estabelecidas a partir da utilização de explantes de folhas desta espécie, de modo a desenvolver culturas de células em suspensão e demonstrar a manutenção da capacidade biossintética das culturas na produção dos principais metabólitos secundários originalmente produzidos nas folhas deste vegetal.

Apesar de não ser conhecido o potencial de bioconversão das células em suspensão de *R. sellowii*, culturas de outra espécie do mesmo gênero, *Rauvolfia serpentina*, conforme o artigo por Warzecha, H.; Obitz, P.; Stöckigt, J. Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-*O*- $\beta$ -glucosidase from cell cultures

of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry*, v.50, n.7, p.1099-1109, 1999, são caracterizadas pela presença de glicosiltransferases, enzimas responsáveis pela hidrólise – glicosidases - e glicosilação –glicosilases - de metabólitos secundários o que é de grande interesse, não só por estas enzimas estarem envolvidas na degradação da celulose, em reações de defesa vegetal e ativação de fitormônios, mas porque os processos de glicosilação de substâncias químicas conferem melhor solubilidade e estabilidade química.

A literatura de patentes ilustra igualmente exemplos de oxidação química de terpenos como alfa-pineno. Assim as patentes US 2767215 e US 2911442 ensinam a síntese de cis-3-pinen-2-ol a partir de alfa pineno com cerca de 15% de rendimento, o isômero trans sendo obtido com 1% de rendimento.

Mais recentemente, a patente US 6111118 descreve a obtenção de derivados de alfa pineno como verbenol e verbenona por oxidação em presença de ácido periódico e hidroperóxido de alquila.

Verifica-se que a oxidação química produz em geral baixos rendimentos , em torno de 16 e 20%, com produção de uma ampla gama de produtos secundários de separação lenta e onerosa, e em alguns casos, com custo elevado do catalisador.

É interessante citar a patente US 4190675, que discute as aplicações terapêuticas da verbenona. São apresentados testes em animais sobre a atividade dessa substância, que se revela não tóxica a seres vivos e apresenta atividade em doenças como broncopneumonias e atividade similar à da aspirina. Assim, processos mais aperfeiçoados para a obtenção de verbenona terão certamente um grande apelo para diversos ramos da indústria.

Também a patente US 5411992 ensina composições à base de derivados oxigenados de terpenos, como álcoois, aldeídos, cetonas ou

ésteres, úteis no controle de piolhos de cabelo e pele humanos e animais. As composições contêm de preferência entre 0,01 e 10% em peso dos derivados terpênicos.

Uma outra aplicação importante é derivada do fato de que tanto a  
5 verbenona como o verbenol são feromônios de agregação e anti-  
agregação, respectivamente, de diversas espécies de besouros dos  
gêneros *Tomicus* (Hylesininae), *Ips* e *Dendroctonus* (Scolytinae). Estas  
substâncias são amplamente utilizadas como bioinseticidas,  
principalmente no Sul dos Estados Unidos, no controle de infestações de  
10 florestas de *Pinus*. O verbenol é colocado em armadilhas para atrair os  
insetos e a verbenona, pulverizada sobre as plantações, para repelí-los,  
conforme a patente FR 2377156-A.

Embora a literatura científica também apresente documentos que  
tratam da biotransformação de alfa-pineno em verbenona, como  
15 Bhattacharya, P.K., Nature 187: 689-690, 1960; Wright S.J., et al. Applied  
Microbiology and Biotechnology 23: 224-227, 1986; Hirata et al.,  
Phytochemistry 37: 401-403, 1994; Van Dik, M.S. et al, Biotech. Lett. 20:  
431-436, 1998; Zhu, W. et al., Fitoterapia 71: 501-506, 2000; Agrawal, R.  
and Joseph, R. Journal of Food Science and Technology-Mysore 37:  
20 430-432, 2000, o melhor rendimento relatado é de 16,5%.

Torna-se evidente, portanto, que a técnica ainda necessita  
de aperfeiçoamento no que toca à obtenção, com rendimentos de 80%  
(% de produto formado em relação ao substrato fornecido) ou mais, de  
produtos de alto valor agregado como a verbenona, derivados de  
25 terpenos, utilizando como sistemas biocatalíticos culturas de células em  
suspensão de *Rauvolfia sellowii* e *Psychotria brachyceras*, tal  
aperfeiçoamento sendo descrito e reivindicado no presente pedido.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo geral, a presente invenção refere-se a um processo de obtenção de verbenona, derivada de alfa-pineno, utilizando como sistemas biocatalíticos culturas de células de *Rauvolfia sellowii* e *Psychotria brachyceras*.

5 O presente processo compreende prover uma cultura de células de rubiáceas em meio de crescimento, sob condições de temperatura entre 20-35 °C e pH entre 4 e 8, deixar a dita cultura de células em suspensão atingir a fase de crescimento exponencial, adicionar alfa-pineno ao meio de cultura que atingiu o crescimento exponencial em quantidades tais  
10 que seja atingido o equilíbrio entre o consumo de alfa-pineno, crescimento e metabolismo de modo a proporcionar rendimento máximo em verbenona desejada, deixar reagir o meio reacional constituído de células, meio de cultura, e produtos sob condições de biotransformação com temperatura entre 20 e 35°C e pH entre 4 e 8, e após o período  
15 necessário para atingir os produtos desejados, terminar a reação; e separar a verbenona de outros produtos.

Alternativamente, e conforme é conhecido na técnica para sistemas análogos, pode-se também utilizar células após a fase de crescimento, as células nesta condição podendo ser muito ativas no que  
20 se refere ao metabolismo secundário.

A presente invenção provê, portanto, um processo de obtenção de verbenona por biotransformação em presença de culturas de células em suspensão de *Rauvolfia sellowii* e culturas de células em suspensão de *Psychotria brachyceras*.

25 A presente invenção provê ainda um processo de obtenção de verbenona por biotransformação com baixo grau de contaminação por sub produtos da biotransformação.

## **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A FIGURA 1 anexa ilustra o (1S, 5R)(+)pineno e o (1R, 5S)(-)pineno, substrato da reação de biotransformação da invenção.

A FIGURA 2 anexa ilustra os produtos comerciais atualmente obtidos a partir do substrato da Figura 1, com destaque para canfeno e tricloeno, importantes intermediários químicos.

A FIGURA 3 anexa ilustra esquematicamente a bioconversão de alfa-pineno.

A FIGURA 4 anexa ilustra a curva de crescimento de células em suspensão de *R. sellowii* em meio reacional, com o crescimento celular em porcentagem no eixo das ordenadas e o tempo em dias nas abscissas.

A FIGURA 5 anexa ilustra a curva de crescimento de células em suspensão de *P. brachyceras* em meio reacional, com o crescimento celular em porcentagem no eixo das ordenadas e o tempo em dias nas abscissas.

A FIGURA 6 anexa ilustra a cinética de biotransformação de (-)-alfa-pineno por *R. sellowii*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas dos produtos durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação, em dias.

A FIGURA 7 anexa ilustra uma comparação entre a cinética de formação de (-)-verbenona por degradação do (-)-alfa-pineno pelo meio reacional (branco) e por biocatálise com *R. sellowii*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas de verbenona durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação em dias.

A FIGURA 8 anexa ilustra a cinética de biotransformação de (-)-alfa-pineno por *P. brachyceras*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas dos produtos durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação, em dias.

A FIGURA 9 anexa ilustra uma comparação entre a cinética de formação de (-)-verbenona por degradação do (-)-alfa-pineno pelo meio reacional (branco) e por biocatálise com *P. brachyceras*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas de verbenona durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação, em dias.

A FIGURA 10 anexa ilustra a cinética de biotransformação de (+)-alfa-pineno por *R. sellowii*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas dos produtos durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação, em dias

A FIGURA 11 anexa ilustra uma aplicação farmacêutica importante da verbenona, a saber a síntese de paclitaxel a partir de (+) –verbenona.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção compreende, pois, um processo de biotransformação de alfa-pineno para produzir verbenona em rendimento de até 80% e com poucos subprodutos. O principal subproduto é o verbenol, em proporções de 50% ou mais, também de grande interesse industrial.

O processo de acordo com a invenção compreende colocar em contato, sob condições de biotransformação, alfa-pineno e culturas de células de certas rubiáceas selecionadas dentre *Rauvolfia sellowii* e *P. brachyceras*.

A seguir, serão descritos detalhadamente os substratos, biocatalisadores e procedimentos envolvidos no processo inventivo.

#### **• Alfa-pineno**

Conforme a invenção, os substratos escolhidos para serem bioconvertidos foram (-) e (+) alfa-pineno, produtos comerciais fornecidos pela Merck e Sigma.

Embora não tenham sido explicitamente tratados no presente pedido, a Requerente acredita que outras estruturas terpênicas contendo uma ligação alílica possam ser oxidadas pelos biocatalisadores da invenção.

5 Alfa-pineno é um monoterpeneo bicíclico de núcleo pinano, amplamente distribuído no reino vegetal e um dos monoterpeneos mais amplamente utilizados, encontrando aplicações desde produtos domi-  
sanitários até as indústrias química e farmacêutica. A estrutura dos enantiômeros (1*S*,5*R*)-(-)-alfa-pineno e (1*R*,5*S*)-(+)-alfa-pineno está  
10 ilustrada na Figura 1.

A nomenclatura IUPAC do alfa-pineno é 2,6,6-trimetil biciclo [3.1.1]-hept-2-eno.

O alfa-pineno é o principal componente do óleo de terebentina, obtido por destilação de resinas de pinheiros (*Pinus sp.*) e de outras  
15 coníferas, além de estar presente em uma grande variedade de óleos voláteis de diversas outras espécies vegetais. Os Estados Unidos produzem anualmente cerca de 13 mil toneladas/ano de óleo de terebentina, principalmente como sub produto da indústria do papel. Deste total, 25% é utilizado na indústria de sabores e fragrâncias, o  
20 restante sendo dirigido para aplicações como solvente odorífero, aerossóis, desinfetantes, inseticidas, indústria de tintas e esmaltes e para mascarar odores.

Na indústria química, há uma diversidade de produtos que vêm sendo obtidos em escala comercial utilizando alfa-pineno como material  
25 de partida, tais como canfeno e triciclono, importantes intermediários químicos de diversos produtos comerciais como cânfora, borneol e terpineol e acetato de terpenila e isomerização deste para beta-pineno, com subsequente conversão para linalol, geraniol e nerol, produtos

largamente utilizados em síntese e em perfumaria. Outra aplicação relevante do alfa-pineno, que tem recebido considerável atenção, é a oxidação ao ar, levando à formação de óxido de alfa-pineno, pinonal, pinocarveol, verbenol, verbenona, carveol, canfolenal, sobrerol, mirtenol e mirtenal. Mas, a multiplicidade de produtos, associada à baixa especificidade, dificultam a aplicação industrial dos métodos atuais. A Figura 2 ilustra a diversidade de produtos derivados de alfa-pineno.

- **Culturas celulares**

- ***Rauvolfia sellowii***

10 Conforme metodologia desenvolvida por Rech, S. B.; Batista, C. V. F.; Schripsema, J.; Verpoorte, R.; Henriques, A. T. Cell cultures of *Rauvolfia sellowii*: growth and alkaloid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.54, p.61-63, 1998, culturas de células em suspensão de *R. sellowii* foram implantadas, e são mantidas no Laboratório de  
15 Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Farmácia da Requerente, em Erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio líquido B5 conforme o artigo de Gamborg, O, L.; Shlylyk, J. P. *Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures*. In: *Plant tissue culture*, Academic Press, 1981. O meio B5 é suplementado com 0,2 mg/ml de cinetina, 1 mg/ml de  
20 ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) e 40 g/l de sacarose.

As culturas iniciais foram obtidas a partir de segmentos foliares esterilizados superficialmente (expostos a etanol 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio 1,5% (v/v) agregado de algumas gotas de detergente neutro, sob agitação, por 20 minutos e subseqüentemente  
25 lavados 3 a 4 vezes em água destilada estéril. Os segmentos foliares foram incubados em meio sólido (ágar grau microbiológico 0,8% p/v) de igual composição ao meio líquido acima descrito, sob temperatura de



25±2°C, luminosidade residual de 1 a 3  $\mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas.

As suspensões foram mantidas sob agitação contínua (100 rpm), temperatura de 25±2°C, luminosidade residual de 1 a 3  $\mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas, sendo as diluições (subculturas), efetuadas quinzenalmente, por decantação do meio de cultura utilizado e distribuição de quantidade equivalente de massa celular em outros 2 Erlenmeyers contendo meio fresco.

- ***Psychotria brachyceras***

10 Culturas de células de *P. brachyceras* foram produzidas conforme metodologia descrita por Fett-Neto, A. G.; Fett, J.; Paranhos, J. T.; Gregiani, T. S.; Van De Santos, L.; Goulart, L. W. V.; Henriques, A. T. “Cultivo *in vitro* de *Psychotria* spp. produtoras de alcalóides bioativos”. 51º Congresso Nacional de Botânica, Brasília, DF., p.51, 2000.

15 As culturas são mantidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da Requerente, em frascos de 200 ml, contendo 50 ml de meio sólido MS conforme descrito por Murashige, T.; Skoog, F. “A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.” *Physiol. Plant.*, v.5, p.473, 1962 adicionado de 10 g/l de polivinilpirrolidona (PVP), 1 mg/l de cinetina, 10 mg/l de ácido naftalenoacético (NAA), 30 g/l de sacarose e 7,5 g/l de agar. As culturas foram mantidas a temperatura de 25±2°C, no escuro, e com subculturas mensais.

25 Os explantes usados para dar início às culturas foram obtidos de segmentos de caule de *P. brachyceras* desenvolvidos em sala de crescimento, em cultivo hidropônico (meio de Murashige e Skoog diluído a 0,1 x a força original) ou de segmentos de hipocótilo de plântulas cultivadas *in vitro* oriundas de sementes assépticas (também em meio

Murashige e Skoog diluído a 0,1 x a força original, agregado de agente solidificador, ágar a 0,8% p/v). A assepsia dos explantes foi feita conforme descrito para *R. sellowii*.

• **Caracterização do ciclo de crescimento das suspensões celulares**

5

Para que se possa determinar os períodos adequados para a adição dos substratos ao meio de cultura, é necessária a aferição do ciclo de crescimento das células em suspensão, nas condições de reação.

10 Para tanto, foram investigados 12 pontos da curva de crescimento, incluindo o dia de inoculação, sendo três frascos de suspensão analisados separadamente, como triplicata, para cada ponto.

Para a preparação do inóculo da curva de crescimento, foram utilizadas células em suspensão (de *R. sellowii*) ou calos (de *P. brachyceras*) com 14 dias de cultivo, nos respectivos meios de manutenção. Em câmara de fluxo laminar, as células foram reunidas em frasco Erlenmeyer de 1000 ml, filtradas sob vácuo, com auxílio de funil de vidro sinterizado, em condições assépticas. Cerca de 6,0 g de células exatamente pesadas foram inoculadas em cada frasco Erlenmeyer de 15  
20 125 ml com 25 ml de meio líquido MS, contendo 2 mg/L de 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 3% de sacarose (meio reacional), tampado com rolha silicone T32.

As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação contínua (100 rpm), temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , luminosidade residual de 1 a 3  $\mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas. 25

Para cada frasco coletado, foi realizada a filtração da suspensão, sob vácuo, sobre funil de vidro sinterizado e a lavagem das células, com

água destilada, as quais foram novamente filtradas, e pesadas, para a determinação do peso fresco.

- **Reações de Biotransformação**

- ***Rauvolfia sellowii***

5 A metodologia empregada para os estudos de biotransformação com suspensões de células vegetais foi adaptada de Hamada, H.; Yasumune, H.; Fuchikami, Y.; Hirata, T.; Sattler, I.; Williams, H.; Scott, A. I. "Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*". *Phytochemistry*, v.44, 10 n.4, p.615-621, 1997, em ensaio utilizando geraniol como substrato exógeno em sistema de culturas celulares de *Catharanthus roseus*.

Células em suspensões de *R. sellowii*, adaptadas ao meio reacional por uma semana, foram filtradas em capela de fluxo laminar e alíquotas de 30 g de células foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 15 250 mL com 40 mL de meio reacional novo (meio líquido MS, contendo 2 mg/L de 2,4 D-ácido 2,4-diclorofenoxiacético- e 3% de sacarose), tampados com rolha silicone T32. Além disso, 60 mg de alfa-pineno foram adicionadas aos frascos reacionais, e alíquotas passaram a ser removidas periodicamente a fim de determinar os produtos formados.

20 As suspensões foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente no presente relatório. As culturas foram suplementadas, com substrato, no início da fase exponencial de crescimento. As bioconversões foram monitoradas através da extração periódica de todo o conteúdo dos frascos, com n-hexano e analisadas por cromatografia 25 gasosa (CG/DIC e CG/EM).

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, repetidos e acompanhados de brancos, constituídos de frascos contendo apenas

células e meio, sem a presença de substrato e outros frascos contendo apenas meio e substrato, sem a presença de células.

Conforme ilustrado na Figura 4, a curva de crescimento das células em suspensão de *R. sellowii* em meio reacional apresentou período de adaptação de aproximadamente 5 dias. Após este período, observou-se o início da fase de crescimento exponencial que se estendeu até aproximadamente 30 dias.

- ***Psychotria brachyceras***

Calos friáveis de *P. brachyceras* foram transferidos para meio líquido MS em capela de fluxo laminar e mantidas nas mesmas condições descritas acima relativas às culturas de células de *R. sellowii*. As culturas foram suplementadas, com substrato, no início da fase exponencial de crescimento. As bioconversões foram monitoradas através da extração periódica de todo o conteúdo dos frascos, com n-hexano e analisadas por cromatografia gasosa (CG/DIC e CG/EM).

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, repetidos e acompanhados de brancos, constituídos de frascos contendo apenas células e meio, sem a presença de substrato e outros frascos contendo apenas meio e substrato, sem a presença de células.

Em termos de condições reacionais adequadas para efetuar o processo da invenção, todos os experimentos de biotransformação e a manutenção das culturas de células podem ser conduzidos em temperaturas na faixa de 10 a 35 graus centígrados, com alterações na velocidade de catálise e de crescimento, porém com resultados qualitativos similares. Da mesma forma, o pH dos meios de cultura e meios reacionais podem também variar em uma faixa de 4 a 8 sem perda significativa de resultados qualitativos.

Conforme a Figura 5, a curva de crescimento das células em suspensão de *P. brachyceras* em meio reacional apresentou período de adaptação de aproximadamente 5 dias. Após este período, observou-se o início da fase de crescimento exponencial que se estendeu até  
5 aproximadamente 22 dias. Com base nos dados da referida curva de crescimento, ficou estabelecida a adição do substrato ao meio de cultura após 7 dias, tempo necessário para que as células alcancem o período de crescimento exponencial, fase em que se encontram em condições ótimas de crescimento, dividindo-se repetidamente e atingindo equilíbrio  
10 entre o consumo de substrato, crescimento e metabolismo.

As reações de biotransformação empregaram 50 mg de substrato alfa-pineno e 10 g do biocatalisador. Em outros casos foram empregados 60 mg de substrato e 30 g de biocatalisador. No entanto, outras proporções substrato/biocatalisador são possíveis, a quantidade de  
15 substrato podendo variar dentro de limites amplos, de modo que este aspecto não deve ser considerado crítico para o presente processo. Em geral as reações de biotransformação foram efetuadas na proporção de 0,5% em peso de substrato em relação ao biocatalisador. No entanto, outras proporções podem ser usadas sem prejuízo para os rendimentos  
20 do processo, tal aspecto não sendo limitativo da invenção.

De um modo geral admite-se que faixas razoáveis compreendem desde 0,01% em peso de substrato até 1% em peso. Para proporções próximas a 1% em peso, em que poderia haver uma preocupação com a toxidez do alfa-pineno, recomenda-se reduzir o tempo de exposição da  
25 cultura ao substrato ou mesmo alterar o overhead gasoso do frasco de reação.

Em todos os casos, a reação de biotransformação é terminada com o próprio solvente de extração (por exemplo, n-hexano) que destrói

as membranas celulares e inativa as enzimas oxidativas, provavelmente responsáveis pela reação (e.g. citocromo P450 mono-oxigenases).

Um modo alternativo é o uso de extração por fluido supercrítico, onde a mudança da composição gasosa do meio tem efeito similar, inibindo o metabolismo oxidativo.

- **Caracterização dos substratos e de seus metabólitos**

Para caracterização, as amostras foram submetidas à cromatografia gasosa capilar com detector de ionização de chama (CG/DIC) para análise quantitativa e à cromatografia gasosa com detector de massas (CG/EM), para a análise qualitativa.

Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo gasoso GC-17A (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a detector de ionização de chamas (DIC) ou detector de massas (EM) GC/MS - QP5000. A ionização foi obtida pela técnica de impacto eletrônico. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 ml por minuto. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares à chama do DIC, na razão de 1:1:10, respectivamente.

Os módulos de separação utilizados foram coluna Durabond-DB5 (30mx0,25mmx0,25 µm), preenchida com polidimetildifenilsiloxano e coluna Supelco B-CDEX120 (30mx0,25mmx0,25µm), preenchida com beta-ciclodextrina. A quantificação foi obtida por integração eletrônica, pela técnica de normalização.

A identificação dos produtos foi baseada no índice de Kováts e nos respectivos espectros de massa, por comparação destes com amostras autênticas, dados retirados da literatura, espectrotecas, ou ainda, por RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, no Instituto de Química da UFRGS, sendo a identificação baseada em dados da literatura ou por comparação com amostras provenientes de métodos químicos sintéticos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e aqueles com técnicas especiais (DEPT, COSY e HETCOR) foram obtidos nos espectrômetros Bruker AC-300/P, Gemini 300 BB utilizando 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75,5 MHz para  $^{13}\text{C}$  e Varian XL 200 utilizando 200 MHz par  $^1\text{H}$  e 50 MHz para  $^{13}\text{C}$ . O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) usando  $\text{CHCl}_3$  como referência. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz.

Os valores de rotação ótica ( $[\alpha]_D$ ) foram medidos em aparelho Perkin Elmer lâmpada de sódio e temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . O comprimento de cela utilizado foi de 0,1 dm.

- **Isolamento dos substratos ou de seus metabólitos**

O isolamento dos substratos ou de seus metabólitos foi realizado por cromatografia sólido-líquido (CSL) segundo o método de Kirchner, que consiste na eluição da amostra com quantidades crescentes de acetato de etila em n-hexano. Os terpenos não oxigenados apresentam maior afinidade pelo n-hexano sendo rapidamente eluídos, enquanto os terpenos oxigenados formam pontes de hidrogênio com a sílica, ficando mais adsorvidos, tendo sua eluição retardada. A ordem de eluição dos constituintes oxigenados com o aumento do gradiente de acetato de etila em n-hexano é a seguinte: óxidos, ésteres, cetonas e álcoois.

Como suporte foi utilizada coluna de 30 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro interno, e como fase estacionária, sílica 70-230 mesh. Foram coletadas frações de 10 ml, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando gel de sílica 60 GF<sub>254</sub> como fase estacionária, n-hexano e acetato de etila (80:20) como sistema eluente e anisaldeído sulfúrico para detecção.

As frações contendo os analitos são reagrupadas, após a análise dos cromatogramas, reavaliadas por CG/EM e, se necessário, analisadas por RMN.

5 Quanto à separação dos produtos, esta é tradicionalmente feita por destilação fracionada a vapor, destilação a vácuo e por extração com diferentes solventes.

Alternativamente pode ser efetuado fracionamento adicional após destilação a vapor em fração ácida (extraída de pentano contendo os voláteis de plantas por meio de solução aquosa 5% de carbonato de sódio), básica (extraída de pentano contendo os voláteis de plantas por meio de solução aquosa 5% de ácido clorídrico) e neutra (solução residual de pentano) (Píry, J; Príbela, A.; Durcanska, J.; Farkas, P. Fractionation of volatiles from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) by different extractive methods. *Food Chemistry* 54 (1995) 73-77).

15 Um processo muito empregado é cromatografia em coluna de sílica gel para separar os componentes hidrocarbonados dos oxigenados, que pode ser adaptado para uso industrial com colunas bulk preparativas, obtendo-se verbenona.

Ainda outros processos mencionam a separação de terpenos componentes de aromas por adsorção diferencial em colunas de poliestireno-divinilbenzeno (Gehrke, M.; Krings, U.; Berger, R.G. Selective recovery of flavour components using reversed phase polystyrene adsorbents. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 108-114, 2000).

25 Há também vários relatos de separação de aromas terpênicos vegetais por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> (Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997) 1-37). Este método parece ser vantajoso e mais barato que os métodos convencionais, além de permitir



ótima separação de componentes. O uso de CO<sub>2</sub> como solvente supercrítico permite trabalhar com pressões relativamente baixas e temperatura próxima da ambiente. Resultados encorajadores, embora ainda necessitando confirmação em escala de produção, foram relatados para fracionamento de monoterpenos hidrocarbonados e componentes de aroma oxigenados de casca de laranja (Budich, M.; Brunner, G. Vapour-liquid equilibrium data and flooding point measurements of the mixture carbon dioxide + orange peel. Fluid Phase Equilibria (1999) vol. 158-160, p. 759-773). Aparentemente, extração por fluido supercrítico será uma técnica importante para extração de terpenos e aromas no futuro próximo.

- **Biotransformação de alfa-pineno**

Conforme a Figura 3, as principais reações observadas na bioconversão do alfa-pineno foram hidroxilação, formando verbenol, seguida de posterior oxidação alílica, levando a verbenona, com rendimentos máximos que variaram de 32,2% a 80,9%, em tempos de incubação de 5 a 10 dias.

Os resultados obtidos com cada um dos biocatalisadores estão apresentados a seguir, ordenados de acordo com as formas enantioméricas do alfa-pineno.

- **Biotransformação de (1S,5R)-(-)-alfa-pineno**

Os resultados experimentais obtidos indicam que os dois sistemas testados apresentaram potencial biocatalítico na conversão do (-)-alfa-pineno, com perfil oxidativo semelhante, diferindo apenas na cinética de formação dos produtos.

Nos experimentos conduzidos como branco, constituídos de frascos contendo apenas células e meio, sem presença de substrato, não houve detecção de substâncias relacionadas aos metabólitos em

questão. Em contrapartida, nos frascos constituídos apenas de substrato e meio, houve rápida conversão de (-)-alfa-pineno a *trans*-verbenol e inúmeros outros produtos de oxidação.

A TABELA 1 abaixo ilustra os produtos obtidos na degradação de (-)-alfa-pineno (50 mg) em meio reacional (50 ml). Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em experimentos individuais realizados em duplicata com cada um dos meios utilizados com os diferentes sistemas biocatalíticos (água destilada, água milliq, tampão fosfato de potássio pH7,0, meio MS preparado com água milliq e meio MS preparado com água destilada), com o desvio padrão calculado através do conjunto dos resultados obtidos nestes diferentes meios reacionais, demonstrando que não houve diferença significativa entre eles, o que pode ser verificado pelos baixos valores de desvio-padrão obtidos em cada ponto.

15

TABELA 1

	3 horas	d1	d3	d5	d7	d10	d15
<b>(-)-alfa-pineno</b>	<b>2,2±1,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
Canfolenal	7,2±2,5	3,2±0,9	2,0±0,9	1,5±0,6	0,8±0,2	1,6±0,4	0,2±0,1
<i>Trans</i> -pinocarveol	10,9±3,7	6,5±2,7	5,6±2,3	4,4±0,8	3,1±1,7	3,0±1,4	1,0±0,3
<i>cis</i> -verbenol	2,1±0,5	2,3±1,3	3,1±0,8	2,7±1,0	2,0±1,4	2,9±0,4	2,7±0,1
<b><i>Trans</i>-verbenol</b>	<b>62,5±3,5</b>	<b>64,6±6,0</b>	<b>67,5±2,9</b>	<b>67,6±2,4</b>	<b>64,6±2,4</b>	<b>59,4±2</b>	<b>60,0±2,4</b>
Mirtenol	6,7±2,5	6,1±1,2	6,6±0,5	6,5±0,6	6,0±0,5	6,5±0,5	6,9±0,4
(-)-verbenona	7,6±0,8	8,1±1,3	10,9±0,8	12,9±0,7	17,6±2,2	19,6±1,3	23,8±0,3
Mirtanol	2,3±1,5	1,7±0,9	2,1±0,3	2,2±0,4	2,7±0,6	2,6±0,2	2,7±0,3

De acordo com os dados expostos acima, o consumo total de (-)-pineno ocorre em cerca de 3 horas de reação, sendo *trans*-verbenol o principal produto formado, em proporções superiores a 50%. Bem como nos experimentos contendo células, ao longo do período de incubação nos experimentos “branco”, *trans*-verbenol vai sendo convertido em

20

verbenona, porém com uma cinética bastante lenta quando comparado com os biocatalisadores objetos do presente pedido. Outro fator a ser considerado é que nestes experimentos “branco” ocorre a formação de inúmeros outros produtos paralelos à formação de verbenona.

5 A significância da biocatálise na obtenção de verbenona é discutida a seguir, com cada um dos sistemas biocatalíticos aplicados.

- ***Rauvolfia sellowii***

Os resultados obtidos nos ensaios de biotransformação de (-)-alfa-pineno por *R. sellowii* estão apresentados na TABELA 2 a seguir. A bioconversão de (-)-alfa-pineno (60mg) envolveu 30g de *R. sellowii* em meio reacional. Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em 2 experimentos independentes, realizados em triplicatas, com os respectivos valores de desvio-padrão.

**TABELA 2**

	d1	d3	d5	d7	D10	d15
<b>(-)-alfa-pineno</b>	<b>11,9±1,3</b>	<b>6,1±1,4</b>	<b>2,0±2,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<i>Trans</i> -pinocarveol	10,4±4,4	6,4±2,4	6,2±3,1	11,0±1,4	10,5±0,6	13,5±2,4
<i>Trans</i> -verbenol	50,6±7,0	56,9±4,3	46,4±3,5	41,4±2,5	40,2±5,1	38,4±0,8
Pinanona	0,0	0,7±1,6	0,5±1,2	5,6±1,3	7,5±1,7	8,6±1,8
Mirtenol	5,3±0,9	4,2±1,9	4,3±2,4	6,5±0,6	7,0±0,4	6,4±1,2
(-)-verbenona	16,7±1,1	24,6±3,0	36,6±6,9	37,6±1,8	33,9±4,3	28,9±3,4

15

O consumo total (-)-alfa-pineno foi observado com um período de incubação de 7 dias, ponto em que se alcança, também, a maior produção de verbenona. A cinética da reação, ao longo de todo o período de incubação, está apresentada na Figura 6.

20

Conforme a Figura 7, uma comparação entre o conteúdo de verbenona obtido pela degradação do pineno em água e o obtido por

bioconversão por *R. sellowii* permite verificar maior formação de verbenona durante todo o período de incubação.

- ***Psychotria brachyceras***

Os resultados obtidos nos ensaios de biotransformação de (-)-alfa-pineno por *P. brachyceras* estão apresentados na TABELA 3 abaixo. A bioconversão de (-)-alfa-pineno (60mg) envolveu 30g de *P. brachyceras* em meio reacional. Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em dois experimentos independentes, realizados em triplicatas, com os respectivos valores de desvio-padrão.

10

TABELA 3

	d1	d3	d5	d7	D10	d15
<b>(-)-alfa-pineno</b>	<b>1,0±0,9</b>	<b>0,5±0,4</b>	<b>0,7±0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<i>Trans</i> -pinocarveol	3,3±0,6	2,1±0,5	2,7±0,6	1,9±0,6	0,0	2,6±1,5
<i>Trans</i> -verbenol	73,7±4,8	63,8±1,3	59,1±3,6	37,1±6,8	15,7±3,8	17,2±2,2
Mirtenol	9,5±3,6	9,6±0,7	8,3±1,1	3,5±1,3	1,8±3,6	2,1±2,0
(-)-verbenona	10,7±1,9	19,5±4,2	22,0±3,6	48,4±5,9	80,9±2,9	76,3±1,5

15

Conforme a Figura 8, de acordo com os dados expostos na TABELA 3 acima, é possível verificar a formação inicial de *trans*-verbenol com alta conversão em (-)-verbenona, atingindo conteúdo máximo com 10 dias de incubação.

Conforme a Figura 8, assim como com o outro sistema biocatalítico testado, ocorre rápida formação de *trans*-verbenol o qual é convertido em (-)-verbenona, porém, em proporções muito maiores.

20

Conforme a Figura 9, comparando os conteúdos de verbenona obtidos pela degradação do (-)-alfa-pineno em ensaios branco e por biocatalisador, é possível constatar a eficiência de culturas de células em suspensão de *P. brachyceras* na obtenção de (-)-verbenona e sua promissora aplicação.

Comparando os dados obtidos neste estudo com dados da bibliografia, onde os melhores rendimentos em (-)-verbenona (10-50%) foram obtidos pela bioconversão de (-)-alfa-pineno em culturas de *Hansenula polymorpha*, cuja metodologia foi patenteada por DORRE e colaboradores (1988), fica caracterizada a potencialidade dos resultados obtidos.

- **Biotransformação de (1R,5S)-(+)-alfa-pineno**

Dos dois sistemas biocatalíticos testados, somente *R. sellowii* apresentou habilidade biocatalítica frente ao (+)-alfa-pineno.

10 As principais reações observadas para este sistema foram as mesmas obtidas com o outro enantiômero, (-)-alfa-pineno, porém levando à formação do enantiômero (1R,5R)-(+)-verbenona.

No outro sistema, bem como nos experimentos conduzidos como branco, constituídos apenas de substrato e meio, constatou-se o consumo total de (+)-alfa-pineno em menos de 24 horas, sendo detectados apenas traços de pinonaldeído e canfolenealdeído.

15 Assim, é possível constatar que nos experimentos utilizando *P. brachyceras* a cinética de degradação do (+)-alfa-pineno foi mais rápida que a de biocatálise. Com isto, fica caracterizada a estereoseletividade (ou especificidade) deste sistema em favorecimento do (-)-alfa-pineno, enquanto *R. sellowii* demonstrou habilidade de bioconverter ambas formas enantioméricas.

Os resultados obtidos com *R. sellowii* estão apresentados a seguir.

- ***Rauvolfia sellowii***

25 Os resultados obtidos nos ensaios de biotransformação de (+)-alfa-pineno (0,2%) por *R. sellowii* estão apresentados na TABELA 4. A bioconversão de (+)-alfa-pineno (60mg) envolveu 30g de *R. sellowii* em meio reacional. Os valores apresentados representam as médias das

concentrações obtidas em 2 experimentos independentes, realizados em triplicatas, com os respectivos valores de desvio-padrão.

TABELA 4

	d1	d3	d5	d7	d10	d15
<b>(+)-alfa-pineno</b>	<b>25,9±8,3</b>	<b>3,7±2,2</b>	<b>3,2±1,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<i>Trans</i> -pinocarveol	7,3±0,5	8,5±2,8	7,0±3,2	7,5±5,5	7,8±2,9	12,2±1,9
<i>Trans</i> -verbenol	54,5±6,9	68,5±3,0	61,7±4,3	59,1±4,4	48,0±2,0	39,1±1,5
Mirtenol	2,3±0,7	3,2±1,7	4,6±1,9	3,8±2,5	2,2±0,8	2,9±0,8
Não identificado*	2,2±1,2	4,7±3,1	4,8±2,7	3,1±4,2	3,4±1,1	4,3±3,0
<b>(+)-verbenona</b>	<b>7,4±1,2</b>	<b>10,4±2,0</b>	<b>17,9±3,2</b>	<b>24,0±2,1</b>	<b>32,2±0,7</b>	<b>31,9±3,1</b>

\* m/z= 95(100); 41(47,1); 93(25,2); 43(21,5); 55(17,4); 79(14,1); 67(13,9); 91(13,7); 121(13,4); 105(12,5); 53(11,6); 77(10,7); 81(7,8); 110(7,8); 139(6,5); 136(4,6); 154(2,8).

A cinética da reação com biocatalisador frente à oxidação no ar (“branco”) está ilustrada na Figura 10.

A aplicação industrial do presente processo pode ser avaliada se for considerado que (-)-verbenona apresenta grande demanda na indústria alimentícia por ser o principal constituinte dos sabores de morango, framboesa, endro, alecrim e menta, conferindo notas canforadas e mentoladas aos produtos alimentícios e nutracêuticos. Segundo a cotação comercial recente, um quilo de verbenona custa em torno 3 mil dólares (US \$3000) e é geralmente obtido dos óleos de *Pinus*, *Verbena* e *Eucalyptus*, em quantidades inferiores a 20%. Assim, sistemas que possibilitem a bioconversão de alfa-pineno, o qual custa cerca de US \$ 0.0075/kg em verbenona, podem ser considerados de promissora aplicação industrial.

Como citado acima, verbenol e verbenona são feromônios de agregação e anti-agregação, respectivamente, de diversas espécies de besouros dos gêneros *Tomicus* (Hylesininae), *Ips* e *Dendroctonus* (Scolytinae) e encontram aplicação como bioinseticidas.

Portanto, inúmeras são as aplicações dos produtos obtidos com as reações de biotransformação de alfa-pineno com base no processo inventivo, destacando-se o uso de (+)-verbenona na preparação do paclitaxel (Taxol®), uma vez que possui a estereoquímica absoluta completa necessária para a elaboração estrutural do anel A da molécula, conforme ilustrado na Figura 11 anexa.

Os resultados obtidos pela aplicação do presente processo são de relevante significado, considerando que, de acordo com a bibliografia, os maiores rendimentos obtidos na biotransformação de (+)-alfa-pineno em (+)-verbenona (16,5%) foram aqueles do artigo citado acima, por Agrawal e Joseph (2000), utilizando células de *Aspergillus niger*.

Os sistemas estudados convertem o alfa-pineno (de baixo custo) em verbenona de alto valor agregado de modo enantiômero específico, sem modificação do centro estereogênico, e com alto rendimento em comparação com métodos disponíveis na literatura e em bases de dados de patentes. Destaca-se ainda a grande versatilidade de manutenção dos sistemas desenvolvidos e o baixo acúmulo de produtos contaminantes dos enantiômeros da verbenona.

### **Reivindicações**

1. Processo de obtenção de verbenona a partir de alfa-pineno pela biotransformação por *Rauvolfia sellowii* e *Psychotria brachyceras*, **caracterizado** por:

a) prover uma cultura de células de *Rauvolfia sellowii* ou *Psychotria brachyceras* em meio de crescimento, sob condições de temperatura entre 20 a 35 °C e pH entre 4 e 8;

b) deixar a dita cultura de células em suspensão atingir uma densidade de células entre 0,5 e 1g/mL de meio reacional para consumir alfa-pineno em um período entre 3 e 10 dias;

c) adicionar alfa-pineno ao meio de cultura com células nas densidades acima para que seja atingido o equilíbrio entre o consumo de alfa-pineno, crescimento e metabolismo de modo a proporcionar rendimento máximo em verbenona desejada;

d) deixar reagir o meio reacional constituído de células, meio de cultura, e produtos sob condições de biotransformação com temperatura entre 20 e 35°C e pH entre 4 e 8;

e) terminar a reação entre 3 e 10 dias para obter os produtos desejados ; e

f) separar a verbenona em alto rendimento de outros produtos.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela cultura de células ser uma cultura de células em suspensão de *R. sellowii*.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo alfa-pineno ser (-)-alfa-pineno e (+)alfa-pineno.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela cultura de células ser uma cultura de células de *P. brachyceras*.

5. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** pelo alfa-pineno ser (-)-alfa-pineno.



6. Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 4, **caracterizado** pela proporção de alfa-pineno para o biocatalisador estar entre 0,01 e 1% (p/p).
7. Processo de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela proporção de alfa-pineno para as células de biocatalisador ser de 0,5% (p/p).
8. Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 4, **caracterizado** pelo período necessário para atingir uma densidade de células entre 0,5 e 1g/mL de meio reacional para consumir alfa-pineno em um período entre 3 e 10 dias;
9. Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 4, **caracterizado** pela adição do alfa-pineno ao meio de cultura contendo os biocatalisadores ser determinado com base na aferição do ciclo de crescimento das culturas de células, nas condições de reação.
10. Processo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo período adequado para adição do alfa-pineno ao meio de cultura ser o necessário para atingir uma densidade de células entre 0,5 e 1g/mL de meio reacional.
11. Processo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** alternativamente pelo período adequado para adição do alfa-pineno ao meio de cultura ser o período após a fase de crescimento, entre 20 e 30 dias, com as células ativas para o metabolismo secundário.
12. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pela preparação do inóculo da curva de crescimento utilizar células em suspensão de *R. sellowii* com 14 dias de cultivo, no meio de manutenção adequado, as células sendo reunidas em um frasco, filtradas sob vácuo e em condições assépticas.
13. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** pela preparação do inóculo da curva de crescimento utilizar calos de *P.*

*brachyceras* com 14 dias de cultivo, no meio de manutenção adequado, as células sendo reunidas em um frasco, filtradas sob vácuo e em condições assépticas.

14. Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 4, **caracterizado** por adicionalmente compreender inocular 6,0 g de células exatamente pesadas em cada frasco reacional com 25 ml de meio líquido MS, contendo 2 mg/L de 2,4 D e 3% de sacarose como meio reacional, o frasco reacional sendo mantido tampado, as suspensões obtidas sendo agitadas de modo contínuo, a temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , luminosidade de 1 a  $3\ \mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas.

15. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelas culturas iniciais de *R. sellowii* serem obtidas de segmentos foliares esterilizados superficialmente e incubados em meio sólido ágar grau microbiológico 0,8% (p/v), sob temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , luminosidade residual de 1 a  $3\ \mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas.

16. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelas culturas de células em suspensão de *R. sellowii* serem mantidas em frascos com 50 ml de meio líquido B5, suplementado com 0,2 mg/ml de cinetina, 1 mg/ml de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) e 40 g/l de sacarose.

17. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelas suspensões de células de *R. sellowii* previamente preparadas serem filtradas e transferidas para meio líquido MS, sendo mantidas em frascos de 250 ml de capacidade com 50 ml de meio líquido B5 suplementado com 0,2 mg/ml de cinetina, 1 mg/ml de ácido 2,4 D e 40 g/l de sacarose, sob agitação contínua, temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , luminosidade residual de 1 a  $3\ \mu\text{móis/s.m}^2$  e fotoperíodo de 12 horas.

18. Processo de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** por adicionalmente serem efetuadas diluições (subculturas) quinzenalmente, por decantação do meio de cultura utilizado e distribuição de quantidade equivalente de massa celular em outros dois frascos contendo meio fresco.

19. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** pelos explantes usados na obtenção das culturas iniciais serem obtidos de segmentos de caule de *P. brachyceras* desenvolvidos em sala de crescimento, em cultivo hidropônico envolvendo meio de Murashige e Skoog (MS) diluído a 0,1 x a força original, os explantes sendo esterilizados superficialmente.

20. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** por alternativamente os explantes usados na obtenção das culturas iniciais serem obtidos de segmentos de hipocótilo de plântulas cultivadas in vitro oriundas de sementes assépticas, também em meio Murashige e Skoog (MS) diluído a 0,1 x a força original, agregado de agente solidificador, ágar a 0,8% p/v, os explantes sendo esterilizados superficialmente.

21. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** pelas culturas de células de *P. brachyceras* serem mantidas em frascos contendo 50 ml de meio sólido MS com 10 g/l de polivinilpolipirrolidona (PVP), 1 mg/l de cinetina, 10 mg/l de ácido naftalenoacético (NAA), 30 g/l de sacarose e 7,5 g/l de ágar, a temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro, e com subculturas mensais.

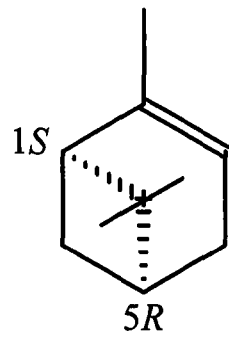
22. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado** pela reação de biotransformação ocorrer em 5 a 10 dias.

23. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela reação de biotransformação ser terminada pela adição de um solvente orgânico.

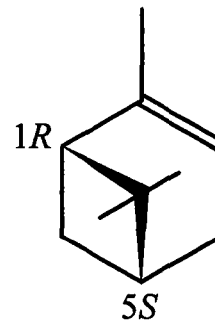
24. Processo de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo solvente orgânico ser um hidrocarboneto alifático como n-hexano.

## FIGURAS

Figura 1

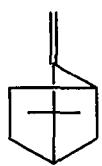


(-)-alfa-pineno

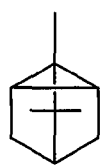


(+)-alfa-pineno

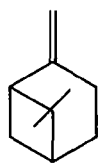
Figura 2



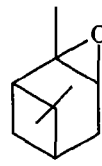
canfeno



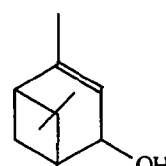
triciclono



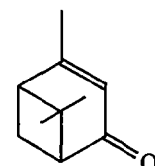
beta-pineno



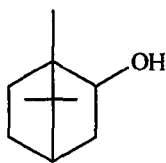
óxido de alfa-pineno



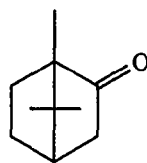
verbenol



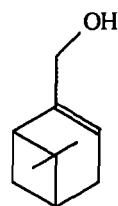
verbenona



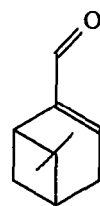
borneol



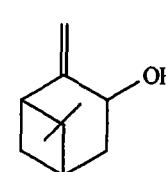
cânfora



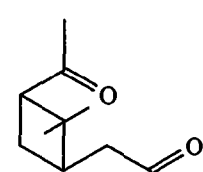
mirtenol



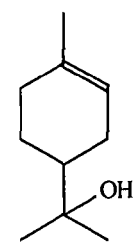
mirtenal



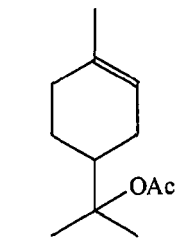
pinocarveol



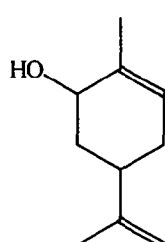
pinonal



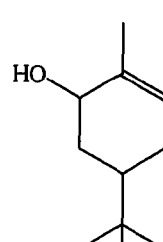
alfa-terpineol



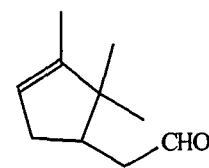
acetato de terpenila



carveol



sobrerol



canfolenal

Figura 3

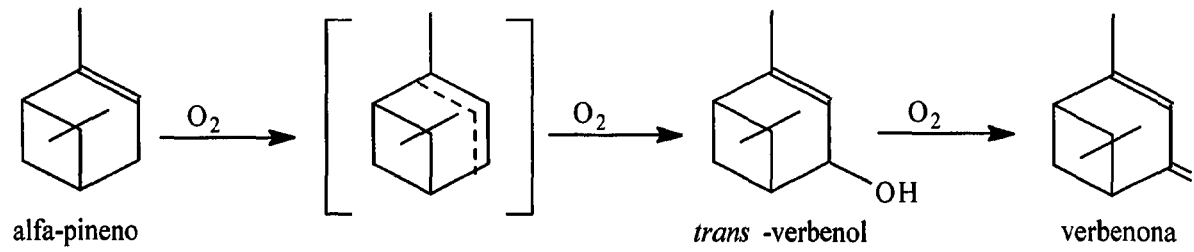


Figura 4

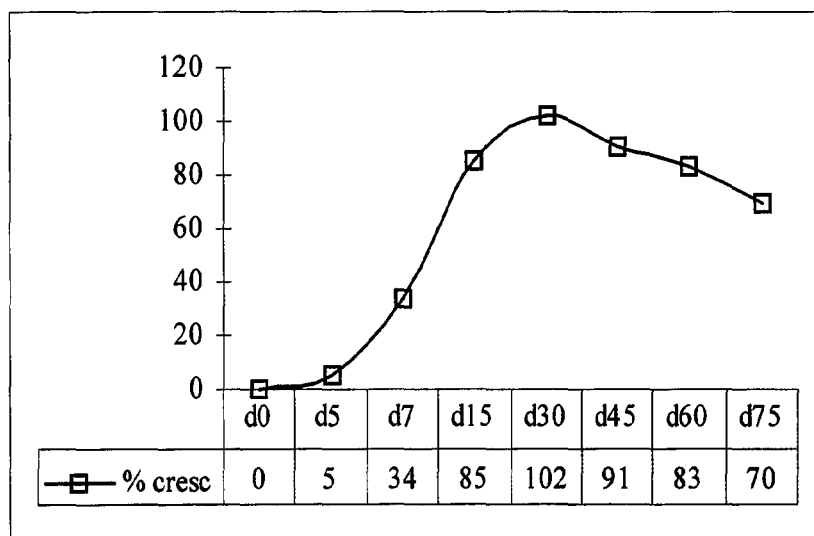


Figura 5

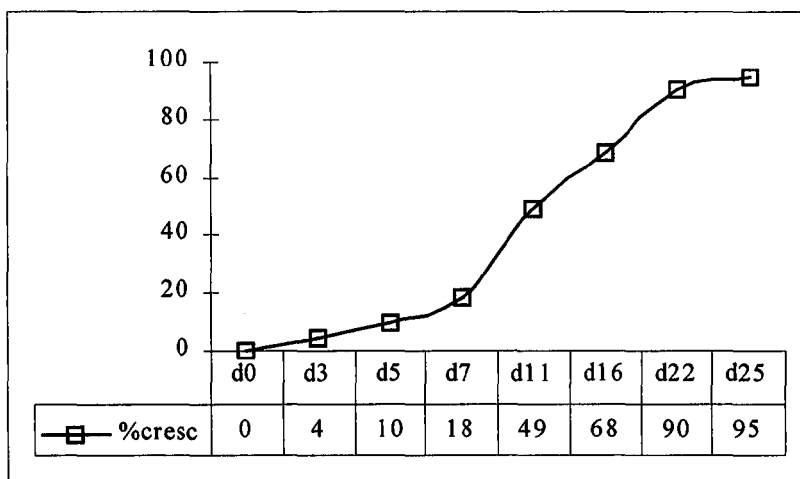


Figura 6

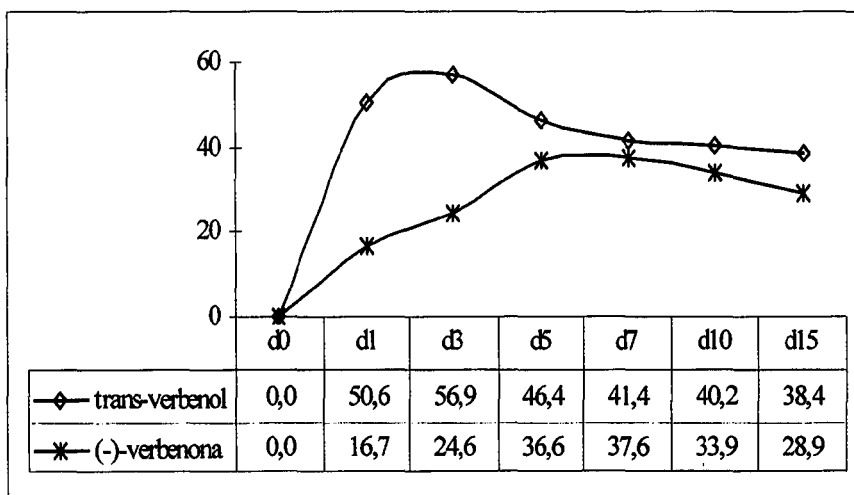


Figura 7

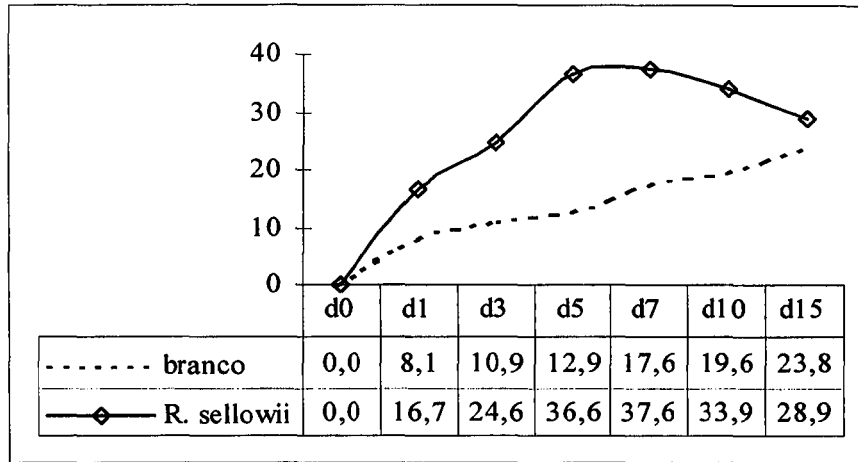


Figura 8

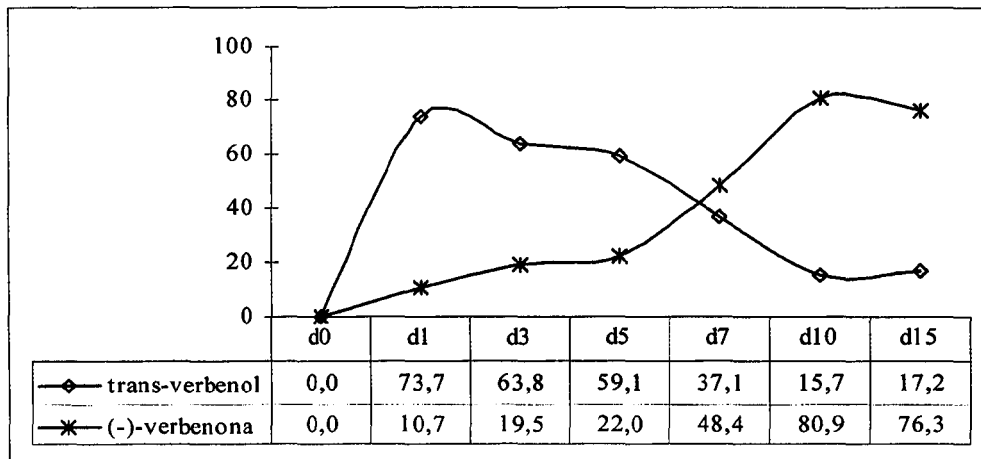




Figura 9

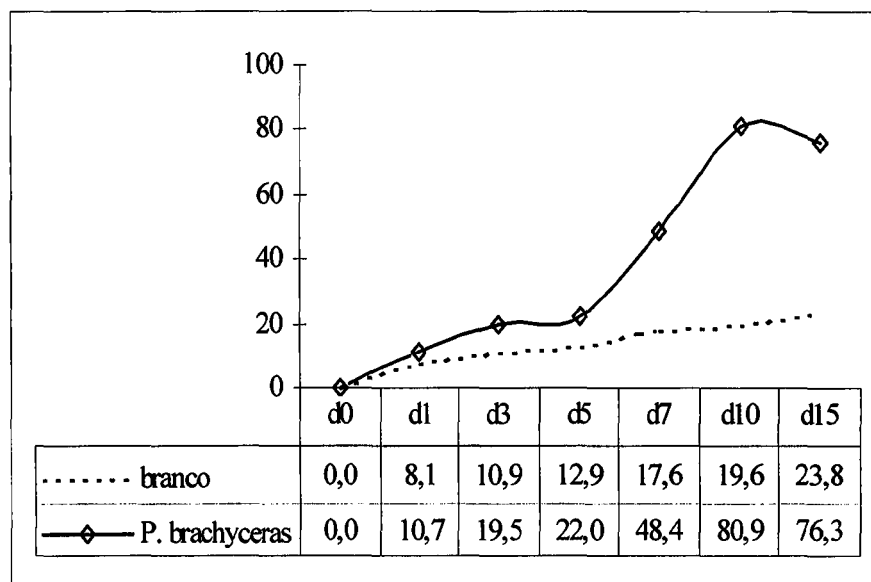


Figura 10

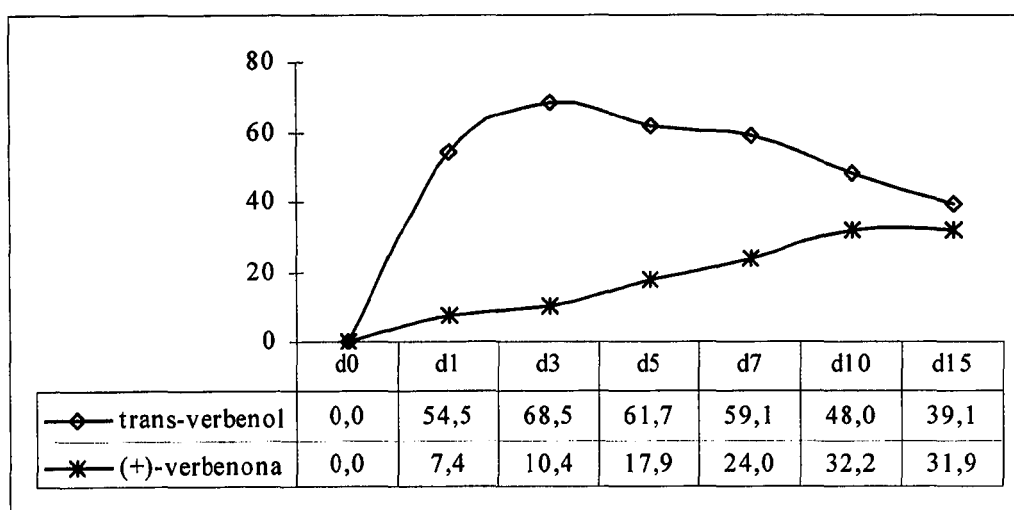
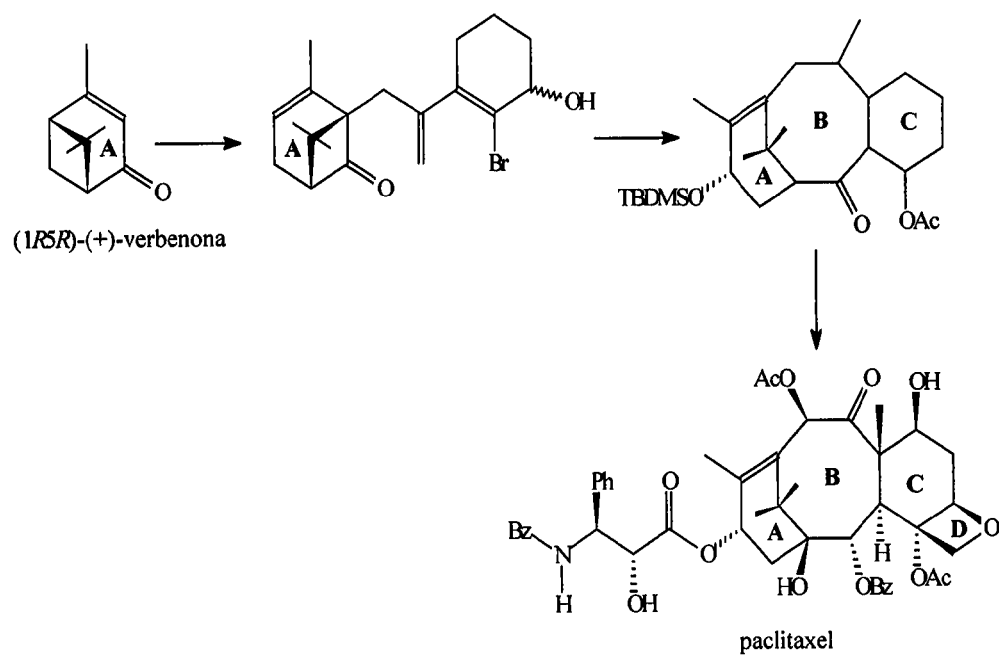


Figura 11



### Resumo

#### PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENONA A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO POR RUBIÁCEAS

5 É descrito um processo de obtenção de verbenona a partir de alfa-  
pineno por biotransformação em presença de biocatalisador  
constituído de células de rubiáceas (*Rauvolfia selowii* e *Psychotria*  
*brachyceras*), com rendimentos de até 80% de conversão em  
verbenona em relação ao substrato e pouca contaminação com  
subprodutos da biotransformação. O processo compreende preparar  
10 culturas do biocatalisador e adicionar o substrato alfa-pineno a um  
número suficiente de células das culturas, a reação de  
biotransformação ocorrendo em períodos entre 5 e 10 dias.