

BIOTRANSFORMAÇÃO DE LIMONENO PARA PRODUÇÃO DE BIOAROMAS UTILIZANDO FUNGOS DO CCMB - UEFS

Enesio Rodrigues Nascimento Neto¹, Heiddy Márquez Alvarez², Angélica Maria Lucchese³, Serly Santiago Machado⁴, Ivan Sergio Colás González^{4*}, Luis Fernando Pascholati Gusmão⁵

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando do Curso de Ciências Farmacêuticas, UEFS, e-mail: rodrigues_enesio@hotmail.com

2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: marquezheiddy@gmail.com

3. Co-orientadora, Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: angélica.lucchese@gmail.com

4. Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sicolas@yahoo.com.br

5. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Igusmao.uefs@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os *flavors* e fragrâncias são utilizados em indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e química, e os processos de obtenção dessas substâncias são relativamente dispendiosos e caros. Os produtos que levam em sua composição os *flavors* e fragrâncias têm alto valor agregado, mesmo que sejam utilizadas quantidades pequenas dessas substâncias nos produtos a serem comercializados. Pensando nesses fatores, pode-se considerar que o desenvolvimento e otimização de métodos viáveis e baratos de síntese de *flavor* e fragrâncias são válidos e relevantes, principalmente se esses métodos puderem ser desenvolvidos em larga escala e não somente em escala laboratorial.

Os biocatalisadores conseguem biotransformar compostos polifuncionalizados em condições amenas. De acordo com Oliveira e Mantovani (2009) os termos biocatálise ou biotransformação, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. Muitas enzimas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por processos industriais nas quais não existem alternativas químicas viáveis.

A seleção de microrganismos, plantas ou células animais representam um caminho natural para obtenção de novos produtos biotecnológicos de baixo custo. Os microrganismos, neste caso, são de particular interesse devido à grande diversidade de processos metabólicos e enzimas que podem produzir, bem como o número ilimitado de microrganismos na natureza que podem ser testados. Eles modificam e degradam uma grande variedade de compostos orgânicos complexos (ROTTAVA *et al.*, 2010). Atualmente, os procedimentos químicos clássicos são ainda os principais métodos para a obtenção de monoterpenos. Embora em alguns métodos introduzem-se oxidantes ou catalisadores, esses procedimentos têm provado ser geralmente de baixa regio, e quimiosseletividade (HOJIN *et al.*, 2006).

O limoneno é um monoterpeno monocíclico faz parte da estrutura de mais de 300 vegetais (BURDOCK 1995). Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como *Mentha spp*, enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, sendo a prevenção da desidratação e inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (DEMYTTENAERE; DE KIMPE, 2001).

O trabalho tem como objetivo principal desenvolver um processo biotecnológico de conversão do limoneno a partir dos microrganismos selecionados, pois estes têm como características principais o curto período de geração, apresentam grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, devendo-se salientar que há um número ilimitado de microrganismos na natureza que podem ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Eles modificam e degradam uma variedade de moléculas orgânicas complexas e, então, é de se esperar que pelo menos um deles catalise uma dada reação de interesse (DE CONTI *et al.*, 2001). Destaca-se neste panorama, o acervo das coleções de

culturas de microrganismos como a Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), lotada Universidade Estadual de Feira de Santana, que é de grande importância uma vez que é composta de linhagens microbianas isoladas do semi-árido brasileiro, região ainda pouco explorada quanto à sua riqueza microbiana (UETANABARO; GÓES NETO, 2007), e que devido às condições adversas do meio ambiente poderá agir na seleção de microrganismos que produzam enzimas diferenciadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Screening dos fungos *Betrania* e *Idriella* (HOMANN, et al., (2004) de placas de multi-poços)

Na busca de novos micro-organismos que realize esta biotransformação foram avaliadas mais 55 espécies pertencentes aos diversos gêneros de fungos do semiárido entre eles: *Acremonium*, *Acrogenosporo*, *Alternaria*, *Ascomycota*, *Aspergillus*, *Beltraniella*, *Chloridium*, *Cocleopu*, *Gonytrichum*, *Idriella*, *Memnoniella*, *Periconia*, *Picnídeo*, *Pithomyces*, *Pseudobotrytis*, *Sarcopodium*, *Speiroopsis*, *Thozetella*, *Volutella*, *Beltrania*, *Chloridium*, *Gonytrichum*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Dictyochaeta*, *Dictyosporium*, *Memnoniella*, *Curvularia*, *Stachybotrys*, *Speiroopsis*, *Thozetella*, *Volutella* oriundos da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) coletados nos municípios pertencentes ao semiárido brasileiro, de materiais vegetais em decomposição. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da UEFS (Lapron).

Para triagem utilizou-se a metodologia de Homann *et al.*, (2004), com modificações preparou-se o meio YM (Yeast Mold and Broth) suplementado com minerais constituídos de 3,0 g extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte; 5,0 g de peptona; 5,0g dextrose; 0,6g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,05g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 1L água destilada, sendo transferido 5,0 mL para os frascos (10 mL) e esterilizados. Após, esfriar acrescentou uma alíquota de 10 μL de uma solução limoneno:etanol a 50% (v/v) resultando numa concentração final de 0,1% (v/v) e 01 disco de micro-organismos, com circunferência de 6mm. Os frascos foram incubados em repouso na câmara de incubação BOD a 30°C por 5 dias (120h). Finalizado o tempo de reação, se adiciona à mistura 2,0 mL de acetato de etila para realizar o processo de extração dos componentes orgânicos presente na mesma. Para a manutenção da viabilidade destes fungos usou-se o método de preservação de Castellani (1967).

Análise cromatográfica

Após este período de cultivo foi acrescentado 2,0 mL de acetato de etila, para realizar a extração do produto biotransformado. As amostras foram analisadas por CG em equipamento Varian CP-3380 com detector de ionização de chama DIC, com coluna quiral CYDEX-B. (25m×0,22m×0,22 μm). A análise quantitativa foi obtida pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC) para determinação da conversão.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes desenvolvidos mostraram que o limoneno não é biotransformado pelos dois fungos testados. Outro experimento foi realizado como quinze novos isolados de fungos (07/06, 35/06, 82/06, 101/06, 98/06, 12/07, 26/07, 35/07, 42/07, 1M5, 2M2, 2M3, 4Ag6, 4Ag7 e 4Ag12). Modificando algumas condições de cultivo: exclusão dos cofatores do meio, incubação dos micro-organismos por 96h antes do acréscimo do substrato e nas condições da reação: agitação a 200 rpm a 30°C durante a reação. Não foi detectado conversão dos limoneno em produto biotransformado. Mas os fungos 82/06, 42/07, 12/07 e 4Ag12, tiveram o substrato consumido.

Continuou os testes com os fungos *Periconia byssoides* (82/06), *Periconia hispidula* (42/07), *Myrothecium leucotrichum* (12/07) e *Paecilomyces* sp. (4Ag12). Para determinação do tempo de reação em volume maior de meio: 5 discos do micélio foram inoculados em 100 mL do caldo YM, em frascos reagentes de 250 mL e incubado a 30°C. Adicionou-se após 96 h uma alíquota de 100 µL da solução limoneno/EtOH solução 1:1. Para controle do produto biotransformado coletou-se 2 mL do caldo fermentado a cada 24 h durante. Foram realizados experimentos de controle positivo e o controle negativo.

Na tabela 1, se apresentam os melhores resultados obtidos na biotransformação do (+) limoneno.

TABELA 1. Percentagem de conversão do screening da biorredução do (+)limoneno por fungos conidiais do semiárido brasileiro em meio agar batata.

Código	Espécie	Conversão (%)	Seletividade (%)				
			1	2	3	4	5
003/06	<i>Dictyochaeta simplex</i>	21	100	-	-	-	-
003/10	<i>Myrothecium roridum</i>	100	46	-	54	-	-
025/13	<i>Sporoschisma saccardoii</i>	87	45	-	-	-	42
054/06	<i>Não identificado</i>	93	25	68	-	-	-
069/13	<i>Aeroaquatico 2</i>	100	49	-	51	-	-
58/12	<i>Sarcopodium circinosetiferum</i>	84	100	-	-	-	-
080/07	<i>Beltrania copaifera</i>	100	13	-	56	31	-
95/12	<i>Beltrania rhombica</i>	99	6	-	80	13	-
101/13	<i>Beltraniella portoricensis</i>	99	6	-	80	13	-
129/08	<i>Chloridium virescens var. virescens</i>	84	16	-	58	10	-
141/12	<i>Dictyosporium tetraseriale</i>	23	100	-	-	-	-
249/12	<i>Sporoschisma saccardoii</i>	52	24	-	-	-	28

284/12	<i>Parasymphodiella laxa</i>	77	35	-	-	-	55
375/12	<i>Beltraniella botryospora</i>	94	32	-	48	14	-

O resultado negativo encontrado para a bioconversão do limoneno pelos fungos *Acremonium*, *Acrogenosporo*, *Alternria*, *Ascomycota*, *Aspergillus*, *Beltraniella*, *Chloridium*, *Cocleopu*, *Gonytrichum*, *Idriella*, *Memnoniella*, *Periconia*, *Picnídeo*, *Pithomyces*, *Pseudobotrytis*, *Sarcopodium*, *Speiropsis*, *Thozetella*, *Volutella*, *Beltrania*, *Chloridium Gonytrichum*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Dictyochaeta*, *Dictyosporium*, *Memnoniella*, *Curvularia*, *Stachybotrys* mostra que o substrato pode ser tóxico para esses micro-organismos. Dos 55 fungos testados, somente 14 bioconverteram o (+) limoneno. Até a presente data foi identificado o produto correspondente ao 4-isopropenil-1-metil-1,2-ciclohexanodiol. Os fungos *Periconia byssoides*, *Periconia hispidula*, *Myrothecium leucotrichum* e *Paecilomyces* sp., *Myrothecium roridum*, *Aeroaquatico 2*, *Beltrania copaifera*, *Beltrania rhombica*, *Beltraniella portoricensis*, *Beltraniella botryospora*, consumiram tudo o (+)-limoneno, produzindo monoterpenos oxigenados, ainda não identificados com seletividade variada.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos até o momento demonstram que ainda são necessário testar mais micro-organismos na busca daquele com potencial enzimático para biotransformação do limoneno em aroma de potencial comercial, e com a confirmação (identificação) do produto biotransformado do isolado 82/06 em aroma partir otimizar as etapas das condições de cultivo para produção de aroma. Verifica-se que a seletividade de alguns fungos para a biotransformação do (+)-limoneno é variada, mas talvez esse problema possa ser resolvido modificando-se algumas variáveis do processo, como por exemplo, suplementação do meio de crescimento e pH do mesmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n.3, São Paulo, Jul./Sep., p.563-567, 2007.
- BURDOCK, G.A. **Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients**, ed. 3, CRC: Boca Raton, 1995, p. 20-45.
- CASTELLANI, A. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p.181-184, 1967.
- CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55, 541-546. 2001.
- DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi: study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 11, 265-270. 2001.
- HOMANN, M. J. et al. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. **Tetrahedron**. v. 60, n. 3, p.789-797, out. 2004.