

BIOTRANSFORMAÇÃO DO LIMONENO

Cátia Liranne Dias Albuquerque¹; Alexandre de Freitas Espeleta² e Angélica Maria Lucchese³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Ciências Biológica, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: catialirannealbuquerque@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: espeleta8@gmail.com
3. Co-orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Biocatálise; α -terpineol; compostos aromáticos.

INTRODUÇÃO

De acordo com a resolução de No. 22 de 1977 da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), aromatizante “é a substância ou mistura de substâncias possuidoras de propriedades odoríferas ou sápidas, capaz de conferir ou intensificar o aroma dos alimentos, inclusive as bebidas”. Substâncias aromatizantes estão presentes em diversos produtos, desde cosméticos até alimentos e podem ser obtidos química ou naturalmente. Porém, devido a uma crescente exigência dos consumidores, há uma maior necessidade de obter compostos aromáticos por vias naturais, de origem biológica (Janssens *et al.* 1992; Berger, 1995). Uma dessas possibilidades é o uso de micro-organismos através da biotransformação (Medeiros, 2006).

O uso de micro-organismos para obtenção de diversos compostos já é conhecido em vários setores da indústria (Canhos, 2003) e os fungos se demonstraram os micro-organismos mais eficientes na produção de compostos de aromas, e são inúmeros os estudos com diferentes espécies que apontam isso (Asakawa *et al.* 1991; Bushman & Berger, 1994; Van Rensburg *et al.* 1997). Em meios de cultura ideais, os fungos convertem os substratos em compostos de aroma de forma mais eficiente quando comparadas a outros processos, nos quais as etapas de conversão podem ser múltiplas (Kempler, 1983).

Substratos como os terpenos são abundantes na natureza e são muito utilizados na indústria como aroma e fragrâncias (Schrader & Berger, 2001). Os terpenos e seus derivados são os principais componentes responsáveis pelo odor característico dos óleos essenciais. O limoneno é um monoterpeneo que está presente em frutas cítricas. O limoneno é um resíduo industrial da fabricação de suco de laranja amplamente produzido (Rezzadori & Beneditti, 2009) que é precursor de diversas substâncias com potencial econômico (Tan, Day & Cadwallader, 1998). Tendo em vista o potencial industrial/econômico do limoneno, este trabalho tem como alvo investigar o uso de limoneno na obtenção de derivados oxigenados de maior valor comercial, principalmente o α -terpineol, a partir do uso de potenciais micro-organismos biocatalisadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado, como substrato, *R*-limoneno de procedência Sigma-Aldrich. Os fungos avaliados foram o *Periconia byssoides* (82/06), *Periconia hispidula* (42/07), *Beltrania copaifera* (80/07), *Beltrania rhombica* (35/06), *Beltraniella portoricensis* (17/11) e *Beltraniella botryospora* (375/12), que estão preservados no laboratório pelo método de Castellani (água estéril a temperatura ambiente) e foram cedidos pelo Laboratório de Micologia da UEFs. Os fungos foram reativados em placas contendo meio ágar batata-dextrose (BDA) e postos numa estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), na temperatura de 30°C durante oito dias para que houvesse crescimento de hifas. Após esse período, cinco discos de 5 mm de diâmetro de cada fungo foram transferidos para frascos reagentes (250 mL), contendo 100 mL do meio caldo batata-dextrose (BD), que foram

postos em uma câmara incubadora com agitação orbital, a 29 °C e sob 150 rpm, durante 96 h, para crescimento de micélio. Após esse tempo, 50 µL de limoneno 95% foram adicionados em cada frasco, exceto nos controles. O experimento foi feito em triplicata + 01 controle para cada fungo. No controle, apenas o limoneno não foi adicionado, dessa forma, os compostos gerados pela inserção do limoneno no meio puderam ser diferenciados. A coleta foi feita 24 h após a adição do limoneno e, foram transferidos 5 mL de cada frasco reagente para frascos de amostra (15 mL). Após isso, para realização de extração parcial, foram adicionados 5 mL de acetato de etila à parcela transferida. A mistura foi agitada por 5 minutos e, após repouso de outros 15 minutos, a fração sobrenadante foi extraída com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após extração do meio líquido com acetato de etila, foi feita a identificação dos produtos formados utilizando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010. A temperatura inicial foi de 60 °C, com elevação de 6 °C/minuto até alcançar os 220 °C. Foram injetados 0,2 µL de cada amostra no CG-MS. A identificação dos constituintes foi realizada pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento, fontes da literatura (Adams, 2007) e injeções de padrões. A quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi calculada com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes (método da normalização) em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama.

Os biocatalisadores selecionados na etapa anterior foram submetidos ao processo de otimização. Os fungos que converteram o limoneno no produto de maior interesse, que no caso é o α -terpineol, foram cultivados em dois tratamentos diferentes: (1) um contendo meio BDA puro e (2) o outro meio contendo BDA com 0,1% de Limoneno. Neste último, foram adicionados, ao volume do meio BDA que seria utilizado, 0,1% de limoneno (i.e. para cada 250 mL de meio BDA foram acrescentados 250 µL de limoneno). Após o desenvolvimento de hifas, cinco discos de 5 mm de diâmetro de cada fungo foram transferidos para frascos reagentes (250 mL) contendo 100 mL do meio caldo batata-dextrose (BD). Estes frascos reagentes foram postos em uma câmara incubadora com agitação orbital, a 29 °C e sob 150 rpm, durante 96 h, para crescimento de micélio. Após o tempo, 50 µL de limoneno 95% foram adicionados em cada frasco, exceto nos controles. O experimento foi feito em triplicata + 01 controle para cada fungo. Foram realizadas coletas com 6h e 24h após a adição do limoneno. A coleta, extração e análises cromatográficas foram realizadas da mesma forma como foi citado anteriormente.

Para construção da curva de calibração, é necessária a obtenção de α -terpineol puro. Ele foi obtido seguindo a metodologia de Baptistella *et. al* (2008). Em um balão de duas bocas de 100 mL, conectado a um funil de adição e a uma rolha esmerilhada, foram colocados o (+)-limoneno (2,0 g) e o diclorometano (10 mL). À parte, foi preparada uma solução de ácido tricloroacético (2,9g, 17,7 mmol, 1,2 eq) em diclorometano (5 mL), que foi transferida para o funil de adição com a ajuda de um funil de haste longa. O funil de adição foi fechado com tubo secante contendo cloreto de cálcio, iniciando-se a seguir um gotejamento lento (cerca de 30 min) da solução ácida sobre a solução do limoneno, mantida à temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Após a adição, a mistura foi agitada por um tempo adicional de 30 min. Então, a solução de reação foi transferida para um funil de separação, extraindo-a com solução aquosa de bicarbonato de sódio 5% (2 x 10 mL) e, em seguida, lavando-a com solução aquosa de cloreto de sódio (1 x 10 mL). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrando-a e removendo o solvente em um evaporador rotativo. O material bruto foi colhido para a próxima etapa. Em um balão de duas bocas de 100 mL, conectado a um funil de adição e a uma rolha esmerilhada, o tricloroacetato de terpineol bruto obtido na etapa anterior foi dissolvido em metanol (10 mL). À parte, uma solução aquosa de NaOH 4,5 mol/L (10 mL) foi transferida para o funil de adição e foi adicionado, sob agitação constante à temperatura ambiente, gota à gota da solução metanólica.

Após a adição (cerca de 30 min), a agitação magnética foi mantida por 30 minutos adicionais, com acompanhamento da reação por CCD (hexano:acetato de etila 20%). Foi adicionado, então, uma solução aquosa de HCl 20% (v/v) gota a gota, até atingir pH 8-9, e após alguns minutos, por pressão reduzida, a mistura de reação foi evaporada. Foi extraído o resíduo com 30 mL de uma solução de hexano:acetato de etila 20% e, em seguida, a fase líquida foi transferida para um erlenmeyer e foi seca sobre sulfato de sódio anidro. Após a filtração e transferência para um balão tarado, um evaporador rotativo foi utilizado para evaporar o solvente. O terpineol bruto foi então purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (1:60). A primeira coleta foi feita utilizando 150 mL de hexano, mudando em seguida para a solução hexano:acetato de etila 5%, e fazendo coletas do gotejamento com o auxílio frascos 15 mL, separando assim o terpeno de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a reativação dos fungos, a cepa 17/11 do fungo *Beltraniella portoricensis* não cresceu em placa. Tentou-se a reativação do fungo nos meios YM (*yeast mold and broth*), CMA (cenoura) e no AA (ágar-água), mas ele não cresceu em nenhum desses outros três meios. Na triagem inicial da atividade catalítica os fungos *B. botryospora* e *B. rhombica* converteram limoneno apenas em α -terpineol. Já *B. copaiifera* produziu, além do α -terpineol, o limoneno-1,2-epóxido. Essa última substância também foi produzida pelo *P. byssoides*. No fungo *P. hispidula*, não houve conversão do substrato. Como esse trabalho visa o α -terpineol como o produto de maior interesse, os três fungos (*B. rhombica*, *B. copaiifera* e *B. botryospora*) que biotransformaram o limoneno em α -terpineol passaram pelo experimento de otimização, em dois meios (BDA e BDA-limoneno). O resultado obtido através das análises cromatográficas mostraram diferenças temporais na conversão do substrato (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Médias e desvio padrão (DP) da porcentagem de conversão dos produtos encontrados na extração dos fungos cultivados no meio BDA. Letras iguais representam médias que se sobrepõem.

Fungos	Produto obtido	Tempo 6h		Tempo 24h	
		Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)
<i>B. rhombica</i>	α -Terpineol	36 ^a	7,4	100 ^d	0
<i>B. botryospora</i>	α -Terpineol	0*	0	100 ^d	0
<i>B. copaiifera</i>	α -Terpineol	0*	0	47,4 ^b	18,5
	Limoneno-1,2-epóxido	0*	0	31,4 ^a	16,3

*Não houve conversão de produtos.

Tabela 2. Médias e desvio padrão (DP) da porcentagem de conversão dos produtos encontrados na extração dos fungos cultivados no meio BDA+limoneno. Letras iguais representam médias que se sobrepõem.

Fungos	Produto obtido	Tempo 6h		Tempo 24 h	
		Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)
<i>B. rhombica</i>	α -Terpineol	21,5 ^{ab}	17,5	93,3 ^{cd}	11,7
<i>B. botryospora</i>	α -Terpineol	0*	0	96,7 ^d	5,7
	α -Terpineol	0*	0	78,2 ^c	8
<i>B. copaiifera</i>	Limoneno-1,2-epóxido	0*	0	10,4 ^b	3,8

*Não houve conversão de produtos.

O fungo *B. rhombica* (35/06), por exemplo, foi o único que demonstrou uma taxa de conversão do limoneno em α -terpineol já nas extrações feitas seis horas após adição do

substrato. Quando cultivados em meios diferentes, apenas o fungo *B. copaifera* mostrou diferença, convertendo mais limoneno em α -terpineol quando cultivado no meio BDA com 0,1% limoneno. Para os outros fungos, não houve diferença na conversão de limoneno em α -terpineol quando meios diferentes foram usados. Após ter conhecimento dos fungos que são mais eficientes na conversão do limoneno em um produto de interesse (no caso, o α -terpineol), o próximo passo foi sintetizar o α -terpineol quimicamente, obtido com 21% de rendimento, com pureza cromatográfica superior a 99%. Com o α -terpineol purificado, a curva de calibração poderá ser construída para determinação dos rendimentos cromatográficos durante as etapas posteriores de otimização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se, a partir desse trabalho, que o fungo *P. hispidula* não é biotransformador do limoneno. Três dos seis fungos iniciais converteram limoneno no produto de maior interesse – o α -terpineol. Sendo assim, dar continuidade a esse trabalho é vital, para determinação do rendimento cromatográfico de α -terpineol, a partir do limoneno, e também para estabelecer o melhor tempo para coleta e extração total dos compostos, de forma que todo o substrato de limoneno seja convertido, mas que o produto – α -terpineol – não seja metabolizado pelo fungo, maximizando sua produção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. 2007: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4 ed. Allured Publishing Corporation, Illinois-USA.
- ASAKAWA, Y., TAKAHASHI, H., TOYOTA, M. & NOMA, Y. 1991: Biotransformation of monoterpenoids, (-)-and (+)-menthols, terpinene and carvotanacetone by *Aspergillus* species. *Phytochemistry* 30, 3981-3987.
- BAPTISTELLA, L.H.B., INAMURA, P.M., DE MELO, L.V. & CASTELLO, C. 2008: Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. *Química Nova* 32, 1069-1071.
- BERGER, R. G. 1995: *Aroma biotechnology*. Springer, Berlin.
- BUSHMANN, D. & BERGER, R.G. 1994: Conversion of mircene by submerged cultured basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 27, 39-43.
- CANHOS, V.P. & MANFIO, G.P. Recursos microbiológicos para biotecnologia. Homepage: https://www.faecpr.edu.br/site/documentos/recursos_microbiologicos_biotecnologia.pdf.
- JANSSENS, L., DE POOTHER, H. L., SCHAMP, N. M., VANDAMME, E. J. 1992: Production of flavours by microorganisms. *Process in Biochemistry* 27, 195-215.
- KEMPLER, G. M. 1983: Production of flavor compounds by microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 29, 29-51.
- MEDEIROS, A. B. P. 2006: Produção e Recuperação de aromas obtidos biotecnologicamente. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- REZZADORI, K. & BENEDITTI, S. 2009: Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. Homepage: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sexsoes/6a/4/K.%20Rezzadori%20-%20Resumo%20Exp%20-%20206A-4.pdf>.
- SCHRADER, J. & BERGER, R. G. 2001: Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: REHM, H.-J., REED, G. (2nd Ed), *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VHC, 373-422.
- TAN, Q., DAY, D. F., CADWALLADER, K. R. 1998: Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry* 33, 29-31.
- VAN RENSBURG, E., MOLELEKI, N., VAN DER WALT, J. P., BOTES, P. J. & VAN