



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS MACAÉ



**AMANDA APARECIDA AGUIAR BALDUCE**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO TERPINOLENO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE *STACHYTARPHETA SCHOTTIANA* SCHAUER.**

**MACAÉ-RJ  
2021**

AMANDA APARECIDA AGUIAR BALDUCE

BIOTRANSFORMAÇÃO DO TERPINOLENO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE *STACHYTARPHETA SCHOTTIANA* SCHAUER.

Trabalho de conclusão de curso (TCC)  
apresentado ao Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Campus Macaé, como requisito para obtenção  
do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barth

Coorientador: Prof. Dr. Shaft Corrêa Pinto

MACAÉ-RJ  
2021

## CIP - Catalogação na Publicação

A639b      Aparecida Aguiar Balduce, Amanda  
              BIOTRANSFORMAÇÃO DO TERPINOLENO POR FUNGOS  
              ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE STACHYTARPHETA SCHOTTIANA  
              SCHAUER. / Amanda Aparecida Aguiar Balduce. --  
              Rio de Janeiro, 2021.  
              62 f.

Orientador: Thiago Barth.

Coorientador: Shaft Correa Pinto.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus  
Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em  
Farmácia, 2021.

1. Biotransformação. 2. Fungos endofíticos. 3.  
Cromatografia gasosa, espectrometria de massas. 4.  
Terpenos. 5. Terpinoleno. I. Barth, Thiago, orient.  
II. Correa Pinto, Shaft, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me sustentado, dado forças e ter sido meu abrigo durante toda minha trajetória de vida.

A minha família, principalmente minha mãe, Rosângela, que é a mulher mais forte que eu conheço. Sem ela, sem a força que sempre me deu, nada disso seria possível. Agradeço meu irmão, Thiago, por ter sido minha companhia por todos esses anos e ser meu melhor amigo.

Ao meu orientador Thiago Barth, que é, além de um professor e orientador excelente, é um ser humano incrível. Ele sempre esteve ali, pronto para responder todas minhas dúvidas e me ajudar em tudo que eu pedisse. Não há palavras pra expressar toda minha gratidão por ter sido aluna de iniciação científica de um dos melhores professores que já conheci durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu coorientador Shaft por ter me auxiliado durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Durante meu tempo de laboratório, ele sempre esteve pronto pra me ajudar em qualquer dúvida ou até mesmo na realização de experimentos. Tenho certeza que sou uma aluna sortuda por ter comigo um orientador tão solícito e paciente.

Ao Marcos, por ter analisado tantas amostras e ter tido tanta paciência comigo em tantos momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro bolsa Pibic possibilitado a realização dos meus experimentos.

Aos meus amigos de vida, Tata e Igor, que são os melhores amigos que eu poderia ter tido na vida. Eu amo vocês e os levarei para toda vida.

Aos meus amigos de faculdade, em especial, à Elo, que se tornou uma amiga maravilhosa e foi minha conselheira em vários momentos.

A minha amiga Vanessa, que foi minha companheira durante essa trajetória, escutou alguns desabafos e meu deu forças para continuar.

Aos meus colegas de turma, Natalie, Evelynn, Juliana, Daiana, Gabi, Bruna, Pedro, Larissa, Renato, Rômulo, Ruan e Pevi, por ter me dado tanta força e ter estado comigo em tantos momentos difíceis.

Ao meu amigo Gabriel, que se tornou minha estrelinha e tornou minha vida mais leve em diversos momentos. Obrigada por ter sido um grande amigo e por tudo que passamos juntos. Eu levarei você no meu coração até a eternidade.

Aos meus amigos de laboratório, Bianca, Taís, John, Stella, Maryna por terem me ouvido chorar algumas vezes, pois meus fungos não cresciam.

Aos professores que tive contato ao longo da minha vida acadêmica. Em especial, aqueles que me auxiliaram no laboratório, Denise, Willian. Estiveram comigo, escutando meus dramas e encheram de ensinamentos que levarei pra vida.

Agradeço a todos os momentos e todos os envolvidos que possibilitaram a minha formação. Eu serei eternamente grata.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biotransformação da desidroepiandrosterona para testosterona, utilizando os microrganismos <i>Corynebacterium</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
Figura 2 - Biotransformação da desoxicorticosterona para corticosterona, utilizando microrganismos.....	8
Figura 3 - Biotransformação da progesterona para 11 $\alpha$ -hidróxiprogesterona, utilizando o fungo <i>Rhizopus arrhizus</i> .....	8
Figura 4 - Estruturas do taxol (1), vincristina (2) e podofilotoxina (3).....	12
Figura 5 - Espécie vegetal <i>Conium maculatum</i> .....	13
Figura 6 - Espécie vegetal <i>Paubrasilia echinata</i> .....	14
Figura 7 - Biossíntese de IPP (difosfato de isopentenila) através de duas rotas sintéticas. À esquerda, a via do ácido mevalônico (MVA). À direita, a via do fosfato de metileritritol (MEP). <b>IPP</b> : difosfato de isopentenila; <b>DMAPP</b> : difosfato dimetilalilo; <b>GPP</b> : difosfato de geranila; <b>FPP</b> : difosfato de farnesila; <b>GGPP</b> , difosfato de geranylgeraniol; <b>GFPP</b> : geranylgeranyl difosfato; <b>PTs</b> : preniltransferases; <b>PYS</b> : fitoeno sintase; <b>SQS</b> : sesquiterpenos.....	18
Figura 8 - Estrutura química dos monoterpenos mentol e limoneno.....	19
Figura 9 - Monoterpenos mirceno (1), lavandulol (2), carvona (3), eucaliptol (4) e linalol (5).....	20
Figura 10 - Estrutura química do terpinoleno.....	20
Figura 11 - Esquema de um cromatógrafo gasoso CG-EM. (1) fonte do gás de arraste; (2) controlador da vazão e regulador de pressão; (3) sistema de injeção da amostra; (4) coluna cromatográfica; (5) sistema de detecção; (6) sistema de registro e tratamento dos dados.....	22
Figura 12 - Componentes presentes em um espectrômetro de massas (EM).....	23
Figura 13 - Fungos selecionados: (1) <i>Aspergillus sclerotiorum</i> , (2) SSR2 e (3) SSR3.....	29
Figura 14 - Espécie vegetal <i>Stachytarpheta schottiana</i> .....	30
Figura 15 - Tubos Falcon de 50 mL contendo os fungos mais o meio malte disposto no <i>shaker</i> a 120 rpm a 30 °C.....	31
Figura 16 - Esquema geral do ensaio de biotransformação.....	31
Figura 17 - Cromatogramas representativos da análise de evaporação do terpinoleno ao longo dos dias 1, 2 e 3: (A) Dia 1, (B) Dia 2 (C) Dia 3. As amostras consistem de	

terpinoleno na concentração de 200 mg/L dissolvidos em meio CZAPEK-Dox e submetidas as condições de biotransformação.....	36
Figura 18 - Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR2: (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle do meio de cultura (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200 mg/L. Pico 1: terpinoleno e pico 2 (produto de biotransformação).....	37
Figura 19 - Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR2: (A) Dia 2 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle do meio (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200mg/L. Pico 1: terpinoleno e pico 2 (produto de biotransformação) .....	37
Figura 20 - Espectro de massas do terpinoleno obtido pela técnica de ionização eletrônica (70 eV).....	38
Figura 21 - Proposta de fragmentação do terpinoleno. Adaptado de (SARJONO, et. al., 2019).....	39
Figura 22 - Espectros de massa do PB1, com tempo de retenção igual a 7,85 minutos.....	39
Figura 23 - Proposta de fragmentação do limoneno. Adaptado de BABY & RANGANATHAN, 2016.....	40
Figura 24 - Produtos de biotransformação do terpinoleno obtidos através do uso de microrganismos de espécies diferentes. <b>1:</b> terpinoleno-4,8-diol; <b>2:</b> terpinoleno-1,2- <i>trans</i> -diol; <b>3:</b> (1 <i>R</i> )-1,8-di-hidroxi-3- <i>p</i> - menten-2-ona; <b>4:</b> (1 <i>R</i> )-8-hidroxi-3- <i>p</i> -menten-2-ona; <b>5:</b> terpinoleno-9-ol; <b>6:</b> terpinoleno-10-ol; <b>7:</b> 5β-hidróxifenchol; <b>8:</b> ácido terpinoleno-7-óico; <b>9:</b> ácido cumínico. Fonte: Adaptado de NOMA; ASAKAWA, 2010.....	42
Figura 25 - Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR3: (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle meio (dia 2) e solução de terpinoleno 200 mg/L.....	43
Figura 26 - Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico <i>Aspergillus sclerotiorum</i> : (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle meio (dia 2) e solução de terpinoleno 200 mg/L.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição meio Batata Dextrose Ágar Enriquecido.....	28
Tabela 2 - Composição meio malte (BARTH, et al., 2013).....	28
Tabela 3 - Composição meio Czapek-Dox (ALVIANO et al., 1992).....	29
Tabela 4 - Análise da solubilidade do terpinoleno em etanol.....	32



## RESUMO

Os terpenos englobam uma diversificada classe de produtos naturais, com diversas funções. Neste aspecto, o terpinoleno, um monoterpene, está presente em óleos essenciais de espécies vegetais, como *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca trichostachya*, *Manilla elemi*, *Nectranda elaiophora*, e *Dacrydium colensoi*. As rotas de produção química de terpenos têm como principal desvantagem a reduzida regioseletividade, produzindo misturas racêmicas que alteram a percepção do aroma. No intuito de contornar essa deficiência, pode-se utilizar processos biotecnológicos, através de biotransformações realizadas por microrganismos que são capazes de reconhecer o substrato com alta especificidade e realizar reações químicas de forma régio e estereosseletiva. Os fungos endofíticos colonizam diversos órgãos vegetais e vivem em simbiose com as plantas, sem causar prejuízos aos hospedeiros. Além disso, seu uso em processos biocatalíticos para a produção de aromas pode agregar valor ao produto, uma vez que estes podem ser rotulados como “naturais”. O presente trabalho avaliou o potencial biocatalítico dos fungos SSR2, SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum*, isolados a partir da raiz da espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana*, em biotransformar o terpinoleno. Inicialmente, foi realizado o processo de crescimento dos fungos *A. sclerotiorum*, SSR2 e SSR3 em meio batata dextrose ágar. Em seguida, fez-se o processo de biotransformação, o qual foi realizado em duas etapas: (1) na primeira etapa, chamada de pré-cultivo, os fungos foram adicionados a um meio pré-fermentativo malte durante 5 dias; (2) na segunda etapa foi coletada a massa micelial resultante da primeira etapa e inoculada com o terpinoleno em meio Czapek-DOX. O meio de cultivo foi coletado para análise nos tempos 0, 24h e 48h. A extração dos prováveis produtos de biotransformação foi realizada através de extração líquido-líquido, utilizando 1,5 mL acetato de etila e 1,5 mL do meio de cultivo. Os extratos de acetato de etila resultantes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para tanto, foi empregado um equipamento da marca Shimadzu modelo GCMS-QP 2010, operando em modo de ionização eletrônica (70 eV), equipado com coluna capilar DB-5MS (5% difenildimetilsiloxano) e tendo Hélio ( $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) como gás de arraste. Após análise por CG-EM foi observado no D2 na amostra do fungo SSR2 a presença do limoneno com 96% de similaridade, quando comparado biblioteca espectral do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), e de outro provável produto de biotransformação sem correspondência na biblioteca. Não foi observado a presença de nenhum produto de biotransformação nas amostras dos fungos SSR3 e *A. sclerotiorum*. Portanto, de acordo com os resultados, pode-se inferir que o fungo SSR2 foi capaz de biotransformar o terpinoleno em limoneno e em um outro metabólito não-identificado. Como perspectivas, tem-se a identificação do fungo SSR2 e a realização de novos experimentos de biotransformação.

**Palavras-chave:** Biotransformação, Fungos endofíticos, cromatografia gasosa, espectrometria de massas, Terpenos, Terpinoleno.

## ABSTRACT

Terpenes comprise a diverse class of natural products with different functions. In this aspect, terpinolene, a monoterpene, is present in essential oils from plant species, such as *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca trichostachya*, *Manilla elemi*, *Nectandra elaiophora*, and *Dacrydium colensoi*. The main disadvantage of chemical production routes for terpenes is their reduced regioselectivity, producing racemic mixtures that alter the perception of aroma. In order to overcome this deficiency, biotechnological processes can be used, through biotransformations performed by endophytic fungi that are able to recognize the substrate with high specificity and perform chemical reactions in a regio- and stereoselective way. Endophytic fungi colonize several plant organs and live in symbiosis with plants, without harming their hosts. Furthermore, its use in biocatalytic processes for the production of aromas can add value to the product, as these can be labeled as "natural". The present work will evaluate the biocatalytic potential of the fungi SSR2, SSR3 and *Aspergillus sclerotiorum*, isolated from the root of the plant species *Stachytarpheta schottiana*, in the biotransformation of terpinolene. Initially, the growth process of the fungi *A. sclerotiorum*, SSR2 and SSR3 was carried out on medium potato dextrose agar. Then, the biotransformation process was carried out in two stages: (1) in the first stage, called pre-cultivation, the fungi were added to a seed medium malt for 5 days; (2) in the second step, the mycelial mass resulting from the first step was collected and inoculated with terpinolene in Czapek-DOX medium. The culture medium was collected for analysis on 0h, 24h and 48h. The extraction of possible biotransformation products was performed through liquid-liquid extraction, using 1.5 mL of ethyl acetate and 1.5 mL of the culture medium. The resulting ethyl acetate extracts were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). For this purpose, Shimadzu brand equipment, model GCMS-QP 2010, operating in electronic ionization mode (70 eV), equipped with a DB-5MS capillary column (5% diphenyldimethylsiloxane) and He (1.0 mL.min<sup>-1</sup>), used 1) as carrier gas. After analysis by GC-EMCG-EM, it was observed in D2 from the SSR2 fungus sample the presence of limonene with 96% of similarity, when compared to the National Institute of Standards and Technology (NIST) spectral library, and another probable biotransformation product without correspondence in the library. The presence of any biotransformation product was not observed in the samples of fungi SSR3 and *A. sclerotiorum*. Therefore, according to the results, it can be inferred that the SSR2 fungus was able to biotransform terpinolene into limonene and another unidentified metabolite. As perspectives, there is the identification of the SSR2 fungus and the performance of new biotransformation experiments.

**Keywords:** Biotransformation, Endophytic fungi, gas chromatography, mass spectrometry, Terpenes, Terpinolene.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Biotransformação e biocatálise .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Fungos .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Fungos endofíticos .....	10
<b>1.3 Breve histórico dos produtos naturais .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Óleos essenciais .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Terpenos .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Monoterpenos .....	19
<b>1.6 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) ..</b>	<b>21</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	26
3.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Biotransformação do terpinoleno por fungos endofíticos .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Materiais .....	27
4.1.2 Meios de cultivo .....	27
4.1.3 Fungos selecionados .....	29
<b>4.2 Métodos .....</b>	<b>30</b>
4.2.1 Cultivo dos fungos .....	30
4.2.2 Biotransformação do terpinoleno empregando fungos endofíticos ...	30
4.2.3 Análise da solubilidade do terpinoleno em etanol.....	32
4.2.4 Concentração de terpinoleno utilizada nos experimentos de biotransformação .....	32
4.2.5 Avaliação da evaporação do terpinoleno nas condições de biotransformação .....	33
<b>4.3 Extração e análise da biotransformação do terpinoleno por fungos     endofíticos.....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Extração líquido-líquido .....	33
4.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG- EM).....	33

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Análise de solubilidade do terpinoleno em etanol.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Avaliação da evaporação do terpinoleno nas condições de     biotransformação.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Biotransformação do terpinoleno por fungos endofíticos.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3.1 Biotransformação do terpinoleno pelo fungo SSR2.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3.2 Biotransformação do terpinoleno pelos fungos SSR3 e <i>Aspergillus         sclerotiorum</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7.1.1 Duração do experimento .....</b>	<b>46</b>
<b>7.1.2 Concentração do terpinoleno .....</b>	<b>46</b>
<b>7.1.3 Velocidade de agitação .....</b>	<b>46</b>
<b>7.1.4 Temperatura de incubação .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Biotransformação e biocatálise

As biotransformações podem ser conceituadas como reações químicas que são catalisadas por microrganismos, sob forma de células inteiras. A biocatálise, por sua vez, faz uso de enzimas isoladas de fontes vegetais, animais e microrganismos a fim de induzir modificações estruturais em uma substância orgânica precursora, conhecida como substrato. As enzimas podem estar purificadas ou como parte de um lisado celular (GHISALBA et al., 2010). Nas biotransformações, através da modulação da concentração de nutrientes do meio de cultura, os microrganismos selecionados são capazes de seguir rotas sintéticas específicas levando a síntese de substâncias químicas de interesse econômico e farmacêutico (VESPERMANN et al., 2017). O passo inicial para o aumento do uso de enzimas e células inteiras na síntese orgânica foi motivado pelas descobertas sobre a utilização de microrganismos para modificar núcleos esteroidais. A partir do uso de microrganismos *Corynebacterium* e levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Mamoli & Vercellone (1937) prepararam testosterona a partir de desidroepiandrosterona (Figura 1). Os microrganismos realizaram em reações de oxidação para formar a androstenediona, oxidando o álcool a cetona e em seguida, reduziram o grupamento cetônico, formando a testosterona. Esse trabalho viabilizou o desenvolvimento da produção de hormônios sintéticos (STOUDT, 1960; CAVAION, 2012).

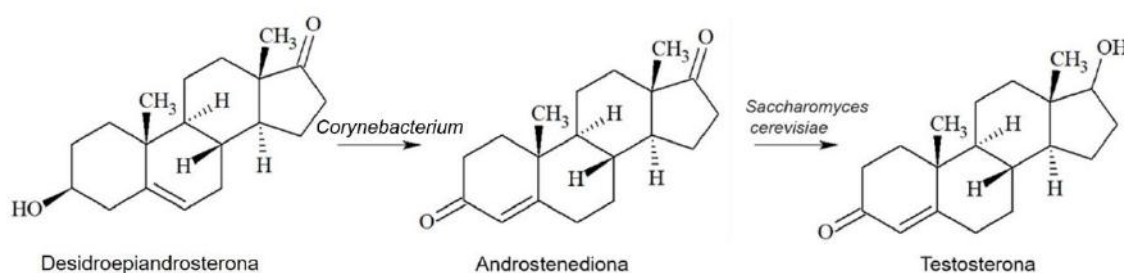


Figura 1 – Biotransformação da desidroepiandrosterona para testosterona, utilizando os microrganismos *Corynebacterium* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: (STOUDT, 1960).

Em 1949, Hench e colaboradores demonstraram a produção de corticosterona a partir da desóxicorticosterona através do uso de microrganismos (Figura 2). Essa reação tornou o carbono 11 mais acessível para funcionalização do

que a proposta por síntese orgânica, adicionando um grupamento alcóolico, formando a corticosterona (CAVAION, 2012).

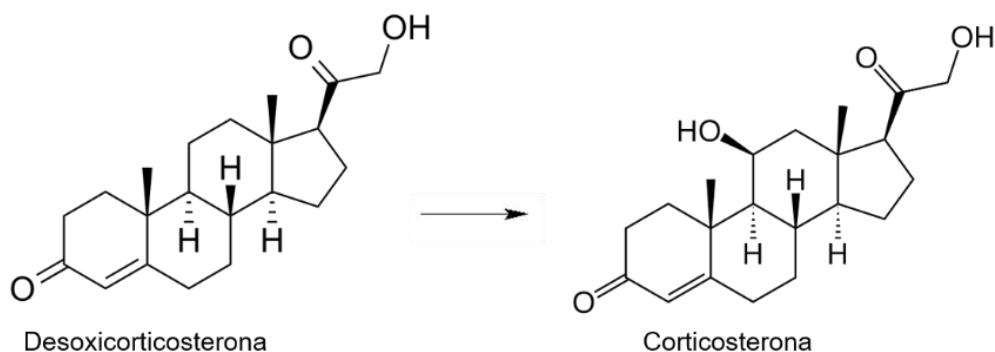


Figura 2 – Biotransformação da desoxicorticosterona para corticosterona, utilizando microrganismos.

Fonte: (HENCH et al., 1949).

Peterson e Murray, em 1952, mostraram que o fungo *Rhizopus arrhizus* era capaz de realizar a hidroxilação da ligação C-H ativada da progesterona, formando a 11  $\alpha$ -hidróxiprogesterona (**Figura 3**).

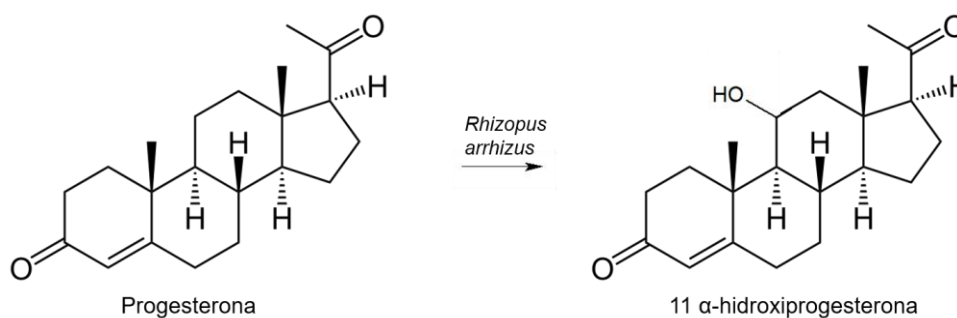


Figura 3 – Biotransformação da progesterona para 11  $\alpha$ -hidróxiprogesterona, utilizando o fungo *Rhizopus arrhizus*.

Fonte: (PETERSON; MURRAY, 1952).

Além dos esteroides, outras substâncias, como os terpenos, por serem também lipofílicas são dissolvidas nos sistemas de membranas das células fúngicas. Estas substâncias, juntamente com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alcanos e fenóis são capazes de induzir alterações nas propriedades das membranas, promovendo efeitos tóxicos. Os fungos, por sua vez, respondem transformando estas substâncias lipofílicas em hidrofílicas, utilizando glicose como fonte de carbono. Este sistema de detoxificação fúngica é semelhante aos processos vistos nas células eucarióticas. De início, as mono-oxigenases do citocromo P450, promovem reações de modo a tornarem a molécula mais reativa para a segunda etapa, através de reações de oxidação, redução e hidrólise. Em seguida, através de

reações de conjugação, são formados produtos mais solúveis em água que, geralmente, são excretados para o meio de cultura (ONKEN; BERGER, 1999; MARÓSTICA JUNIOR, 2018). No campo industrial, o emprego de métodos químicos clássicos para a síntese de substâncias, leva, muitas vezes, a uma série de etapas adicionais ao fim do experimento, as quais englobam desde a separação e purificação do produto final até o tratamento dos efluentes químicos utilizados durante o procedimento reacional. Quando se pensa em biocatálise, os biocatalisadores são muito mais eficientes, pois são altamente seletivos a níveis de substrato, sítios de ligação e grupos funcionais, reduzindo o número de etapas envolvidas durante a reação. Além disso, diferentemente da química convencional, durante as reações de biocatálise, em geral, não há uso de solventes orgânicos, onde o solvente mais utilizado é a água. Consequentemente, não há produção de resíduos de solventes orgânicos, permitindo a obtenção de produtos mais seguros. Da mesma forma, demonstram diversas vantagens, tais como, atuação de pH próximo a faixa da neutralidade e são processados a temperatura e pressão ambientes (TATHE et al., 2011; PAUL et al, 2019). Os biocatalisadores, além de apresentarem alta estereoseletividade e regioseletividade, são aptos para realizarem as reações químicas em condições reacionais mais brandas, permitindo a proteção da funcionalidade da molécula utilizada como substrato. Assim como não necessitam de etapas de proteção e desproteção realizadas em sínteses orgânicas com o intuito de proteger os grupamentos funcionais que serão mantidos, reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis. Outra vantagem da utilização desta técnica se concentra no uso de enzimas, as quais são provenientes de fontes renováveis e economicamente viáveis, são biodegradáveis e se encaixam nos princípios da Química Verde (TRUPPO, 2017; GRAEDEL, 2002).

Além disso, os fungos possuem um papel fundamental, uma vez que são capazes de realizar processos de biotransformação com o seu maquinário multienzimático e são considerados modelos do metabolismo hepático de mamíferos. Por isso, possuem aplicações práticas na síntese de medicamentos e são considerados uma importante fonte de substâncias ativas com efeito antibacteriano, antiviral e antifúngico. Dessa forma, modelos microbiológicos são considerados uma tecnologia competitiva e de baixo custo na procura de novas rotas de produção de produtos farmacêuticos, químicos e de compostos agroquímicos (GIRI et al., 2001; CHANDRA, 2012; FONTES, 2013).

## 1.2 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, produtores de esporos, que podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (fungos filamentosos) (BORGES, 2008). Estes organismos pertencem ao Reino Fungi (Domínio Eukarya), possuindo membrana e parede celular. São classificados como organismos heterotróficos, ou seja, alimentam-se através da absorção de carboidratos, lipídeos e proteínas (TORTORA, et. al., 2005; ELIAS, 2015).

### 1.2.1 Fungos endofíticos

As plantas podem servir de abrigo para diversos microrganismos. Os fungos, por sua vez, podem ser um destes organismos, podendo colonizar folhas, ramos, raízes, habitando em vasos condutores, apoplastos e até no interior de células vegetais. Por isso, são ditos endofíticos (*endo*=dentro e *fítico*=planta). Estes microrganismos vivem em simbiose com as plantas, sem causar prejuízos aos hospedeiros (PEIXOTO NETO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003; MUSSI-DIAS et al., 2012). Essa associação é benéfica para a espécie vegetal, uma vez que os fungos podem atuar na proteção contra pragas e outros patógenos. Além disso, promovem o aumento do crescimento, enraizamento, resistência a estresses, e produzem compostos químicos como enzimas, alcaloides, hormônios e antibióticos (PEIXOTO NETO et al., 2002; MUSSI-DIAS et al., 2012).

Além disso, estes microrganismos podem ser divididos em dois tipos: tipo I e II. Os fungos do tipo I podem ser caracterizados pela ausência de estruturas externas na planta hospedeiras. De forma contrária, os fungos do tipo II são formadores de estruturas externas, como, por exemplo, os fungos micorrízicos (ELIAS, 2015).

Os fungos endofíticos foram descobertos em 1866 por Bary e descritos na espécie *Lolium temulentum*. Inicialmente, foram classificados como assintomáticos, ou seja, não causam nenhum tipo de benefício ou malefício aos hospedeiros vegetais. Nesse contexto, desde então, estes microrganismos vêm sendo isolados



de diferentes espécies de plantas em locais diferentes. Além disso, foi visto que, há, pelo menos, um fungo endofítico em todas as espécies de plantas já estudadas (NISA et al., 2015; FREEMAN, 1904; ELIAS, 2015). A associação entre plantas e fungos já foram identificadas em tecidos fossilizados de folhas e galhos, sugerindo que essa associação poderia ter iniciado desde o surgimento das primeiras plantas superiores no planeta Terra. Acredita-se que estes microrganismos tenham evoluído de duas formas: o modo de transmissão vertical e horizontal. Onde, no modo de transmissão vertical, acredita-se que os fungos tenham sido transmitidos às plantas através da colonização de sementes. Já no modo de transmissão horizontal, essa transmissão teria ocorrido através da transferência assexual e sexual de esporos (REDECKER et al., 2000; SAIKKONEM et al., 2004; ELIAS, 2015).

Fatores ambientais, como luz, temperatura, pH, fonte de carbono e nitrogênio podem influenciar diretamente a produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos. De forma que, esses microrganismos possuem a capacidade de produzir estas substâncias de acordo com as condições ambientes e necessidades específicas do meio que estão inseridos. Nesse contexto, visto que os metabólitos secundários eram considerados como exclusivos de espécies vegetais, sua produção a partir de fungos trouxe informações significativas a respeito de rotas sintéticas, principalmente, em relação a qual organismo era a fonte original. E por isso, chegou-se à conclusão que inúmeros metabólitos secundários que tinham sua origem atribuída às plantas, podem ter sido, na verdade, provenientes de fungos endofíticos (ELIAS, 2015; YU, et. al., 2002).

Durante a evolução dos fungos endofíticos, a adaptação destes microrganismos se deu através de variação genética, ou seja, dada à utilização do DNA vegetal pelas células fúngicas. E por isso, alguns microrganismos são capazes de sintetizar metabólitos secundários que, antes, eram associados somente à espécie vegetal (GERMAINE et al., 2004; STIERLE et al., 2013; ELIAS, 2015).

O taxol (Figura 4), o qual é um antitumoral potente utilizado para o tratamento de câncer de ovário, de mama e de pulmão, é um exemplo disto, que, inicialmente, foi isolado a partir da *Taxus brevifolia*. No entanto, foi visto que a produção de taxol ocorre também através de um fungo endofítico da própria espécie vegetal *Taxus brevifolia*, o *Taxomyces andreanae*. E, posteriormente, viu-se que o taxol é sintetizado por inúmeros fungos endofíticos associados a outros vegetais, tais como o *Pestalotiopsis microspora*, *Alternaria alternata*, *Periconia* sp., *Pithomyces* sp.,

*Monochaetia* sp., *Seimatoantlerium nepalense* e o *Chaetomella raphigera* (STIERLE et al., 2013; WANI et al., 1971; LI et al., 1998; GANGADEVI; MUTHUMARY, 2009; ELIAS, 2015; LEDWITCH et al., 2013).

Outro exemplo é a vincristina (Figura 4), um anticancerígeno isolado, inicialmente, da planta *Catharanthus roseus* e em seguida, foi visto que esta substância também é produzida pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, presente na mesma planta. Além da vincristina, há também podofilotoxina (Figura 4), um anticancerígeno isolado das espécies vegetais do gênero *Podophylum*, e, posteriormente, isolada dos fungos endofíticos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (CHAPLA, et. al., 2013; ELIAS, 2015).

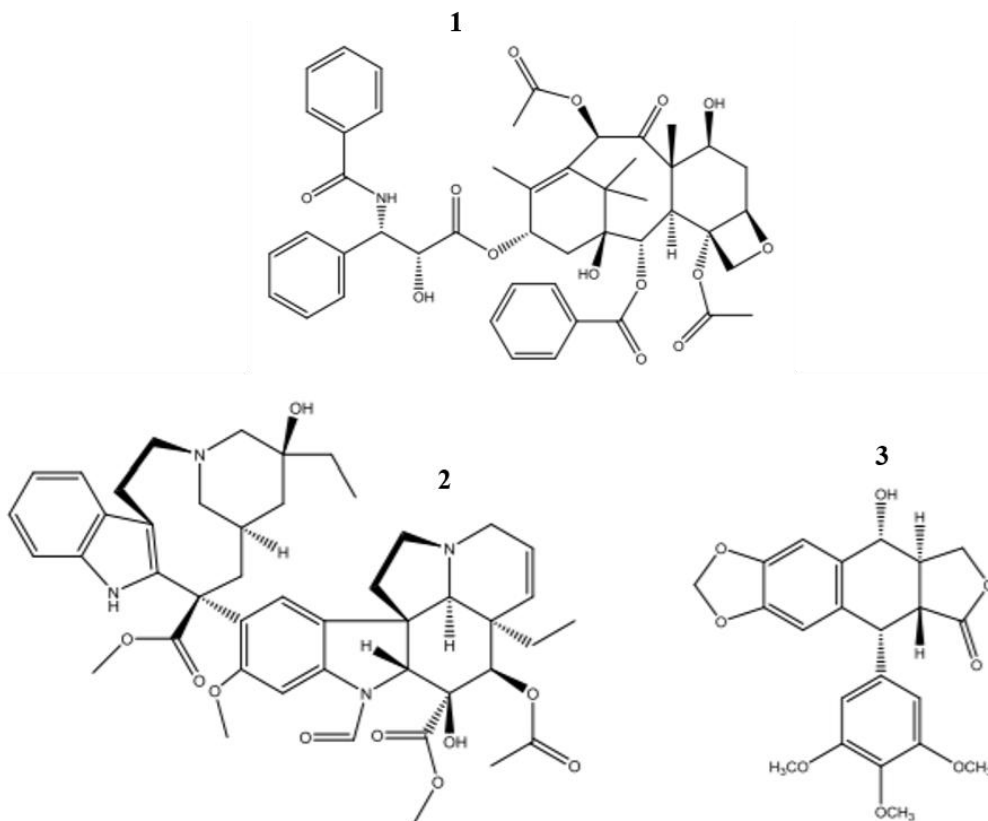


Figura 4 – Estruturas do taxol (1), vincristina (2) e podofilotoxina (3).

Fonte: Adaptado de Elias (2015).

O procedimento que visa o isolamento destes microrganismos possui alguns cuidados que devem ser tomados a fim de evitar que outros seres que vivem na superfície do hospedeiro sejam carreados. O processo mais comum de isolamento se dá pela lavagem das folhas, caules e outros órgãos vegetais em álcool etílico

70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% e por fim, álcool etílico ou água esterilizada (SOUZA, 2004; PIMENTEL et al., 2006). Em seguida, o próximo passo do processo de isolamento é a transferência de fragmentos ou suspensões de células para os meios apropriados, tais como Batata-Dextrose-Ágar e Sabouraud. A esta etapa, deve-se adicionar antibióticos com o objetivo de evitar o crescimento de bactérias. Por fim, os fungos isolados são estocados (AZEVEDO, 1999).

### 1.3 Breve histórico dos produtos naturais

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pela humanidade desde a antiguidade. Seu uso foi visto através do consumo de partes de vegetais com o objetivo de aliviar e curar doenças. Além disso, foram utilizados por várias culturas no controle de pragas, conservação de múmias, mecanismos de defesa, caça e para fins ilícitos. Neste, destaca-se o uso de *Conium maculatum* (Figura 5), mais conhecido como veneno de Hemlock, para execução de prisioneiros na Grécia Antiga (VIEGAS et al., 2006).



Figura 5 – Espécie vegetal *Conium maculatum*.

Fonte: Inaturalist (2021).

No Brasil, a história da colonização, está diretamente relacionada ao uso de produtos naturais e sua comercialização pelos europeus. Uma vez que, somente corantes naturais eram acessíveis, estes eram considerados de grande interesse econômico. Nesse sentido, o pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), o qual já era conhecido para obtenção de corante de coloração vermelha e amplamente utilizado nas Índias desde a Idade Média, tornou-se o principal atrativo para os colonizadores (VIEGAS, et. al., 2006).



Figura 6 – Espécie vegetal *Paubrasilia echinata*.

Fonte: FAPESP (2021).

Portanto, a soma dos conhecimentos adquiridos a respeito da química dos produtos ofertados pela natureza pelos indígenas e povos tradicionais construíram as bases para o descobrimento e diferenciação entre substâncias tóxicas e medicamentos. Além disso, permitiram o desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, melhor conhecimento da relação estrutura química e atividade biológica de fármacos e de relações que envolvem animais e insetos com determinadas plantas (VIEGAS, et. al., 2006).

#### **1.4 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OE) são produtos naturais oriundos do metabolismo secundário de vegetais, compostos por moléculas voláteis lipofílicas presentes nas folhas, caules, frutos, flores, sementes e raízes de vegetais (BURT, 2004). São líquidos, oleosos, voláteis, com odor marcante, geralmente incolor e com densidade menor que da água. Além disso, os óleos essenciais são armazenados em células secretoras, cavidades, canais oleíferos, células epidérmicas ou tricomas glandulares dos órgãos vegetais que os sintetizam (MIGUEL, 2010). De acordo com a ISO (*International Organization for Standardization*), os óleos essenciais são produtos obtidos a partir de matérias-primas naturais através de processos de hidrodestilação e destilação a vapor, pela prensagem do pericarpo de frutas cítricas (processamento mecânico) ou por destilação a seco (SADGROVE; JONES, 2015).

Os OEs podem estar mais concentrados em porções específicas dos vegetais, conseqüentemente, podem apresentar perfis de composição diferentes de acordo com o local que estão presentes, bem como diferentes atividades e natureza química de seus componentes. Além disso, outros fatores como o clima, estação do ano, propriedades genéticas, período de colheita e técnica de destilação podem influenciar diretamente no perfil químico destes compostos (BENETEL, 2018). Os OEs são constituídos, majoritariamente, por duas classes de produtos naturais: os terpenos, os quais englobam os monoterpenos e os sesquiterpenos e os fenilpropanoides. Estes, por sua vez são capazes de conferir características organolépticas ao óleo essencial (BIZZO et al., 2009; CALSAMIGLIA et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007).

Os terpenos constituem o grupo mais numeroso e diversificado de metabólitos secundários presentes nos vegetais. Estas substâncias são derivadas de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e classificados de acordo com o número de unidades de isopreno presentes no esqueleto principal (CALSAMIGLIA et al., 2007). Já os fenilpropanoides, apesar de não ser o óleo essencial mais abundante, estão presentes em quantidades significativas em algumas plantas. São formados a partir da via do ácido chiquímico, os quais formam unidades básicas dos ácidos cinâmicos e p-cumárico. Estes, após reações de oxidação, ciclização e desidratação formam fenilpropanoides (BENETEL, 2018; CALSAMIGLIA et al., 2007).

O processo de extração dos óleos essenciais varia conforme a parte do material vegetal utilizado, sendo a técnica de arraste a vapor a mais utilizada na maioria das vezes (BIZZO et al., 2009). Além disso, para este fim, podem-se utilizar outros métodos, tais como a extração por solvente, maceração, enfleurage, fluidos supercríticos, extração através da hidrodestilação assistida por micro-ondas e técnicas de destilação que não necessitam da adição de água. Conseqüentemente, de acordo com o tipo de técnica de extração utilizada, haverá diferenças na composição qualitativa, quantitativa dos óleos essenciais e no rendimento do processo global (SADGROVE e JONES, 2015; SANTOS et al., 2004).

Os óleos essenciais apresentam ampla aplicabilidade. São empregados em perfumaria, cosméticos, onde são utilizados como matéria-prima para a produção de fragrâncias e aromas, e também como aditivos alimentares e suas aplicações na indústria farmacêutica (BIZZO et al., 2009). Além disso, possuem atividades biológicas bem definidas. Apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória

(HACHIMI et al., 2017), antibacteriana (BOUYAHYA et. Al, 2017), antiviral (ASTANI et al., 2010), citotóxica (PATIL et al., 2009; LEAL et al., 2013), antiprotzoário (LEAL et al., 2013), antifúngica (NAZZARO et al., 2017) e ansiolítica (VIANA et al., 2016).

Uma rota alternativa para obtenção de compostos aromáticos é através da biotecnologia, utilizando a biotransformação como rota de produção. Neste caso, microrganismos são capazes de produzir aromas através de uma via metabólica complexa a partir de nutrientes simples, como açúcar, álcool e outros nutrientes. Além disso, outra vantagem da produção biotecnológica de compostos aromáticos é a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como fontes de substratos. Um exemplo são os resíduos gerados no processamento de frutas e vegetais, os quais são ricos em terpenos (VESPERMANN et al., 2017).

O uso de processos biocatalíticos para a produção de aromas vem se destacando nos últimos anos, visto o aumento da procura de produtos rotulados como “naturais”. Segundo o FDA para que uma substância seja rotulada como “natural”, é necessário que seu preparo se dê através de métodos físicos (através da extração de fontes naturais) ou processos enzimáticos e microbianos (precursores isolados da natureza).

Além disso, o composto produzido deve ser idêntico ao existente na natureza. Isto, somado à procura por aromas naturais em vez de aromas sintéticos levou a ampliação de estudos direcionados a produção biotecnológica de aromas. Estima-se que cerca de 80% dos aromas consumidos ao redor do mundo são de origem sintética. No entanto, em países com maiores taxas de desenvolvimento, em torno de 70% dos aromas são rotulados como naturais (DEMYTTENAERE; DE KIMPE, 2001; SERRA, et. al., 2005; MAROSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007).

O Brasil se destaca como um importante produtor de óleo essencial no cenário global, produzindo cerca de 13,5% da produção total, tornando-se o quarto maior exportador de OE (LOURENÇO, 2012). Além disso, segundo as projeções, este é um mercado em constante expansão, e deve crescer a uma taxa composta de crescimento anual de 7,5% de 2020 a 2027. O crescimento do mercado é impulsionado pelo aumento da demanda de indústrias de alimentos e bebidas, cuidados pessoais, cosméticos e aromaterapia (GVR, 2020).

## 1.5 Terpenos

Os terpenos constituem, dentre as classes de produtos naturais, a maior e a mais complexa, com mais de 55.000 produtos já isolados. Estas substâncias podem ser encontradas em plantas, organismos marinhos, algas, microrganismos e em fungos. Os terpenos são derivados do isopreno, o qual é formado por cinco átomos de carbono e podem ser classificados de acordo com o seu número de unidades isoprênicas em: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2002; HILL; CONNOLLY, 2012). A biossíntese dos terpenos se dá, principalmente, através de duas rotas sintéticas: do ácido mevalônico (MVA) e do metileritritol fosfato (MEP) (Figura 7). A rota do MVA ocorre no citoplasma da célula vegetal, onde duas moléculas de acetil-CoA se condensam para formar o acetoacetil-CoA, que, por sua vez, condensa-se com outro molécula de acetil-CoA, formando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA. Em seguida, é reduzido formando o ácido mevalônico. O MVA é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, produzindo o IPP (difosfato de isopentenila), unidade básica para formação dos terpenos. Ao contrário da rota sintética do MVA, a rota do MEP ocorre nos cloroplastos. Nesta, uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato se condensa com dois átomos de carbono do piruvato, formando o 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato, um intermediário de cinco carbonos, a qual, em seguida, é reduzido a fosfato de metileritritol (MEP). Por fim, o MEP é convertido a DMAPP (difosfato de dimetialila), o qual é um isômero do IPP (difosfato de isopentenila) (HENRY et al., 2018; TAIZ; ZEIGER, 2009).

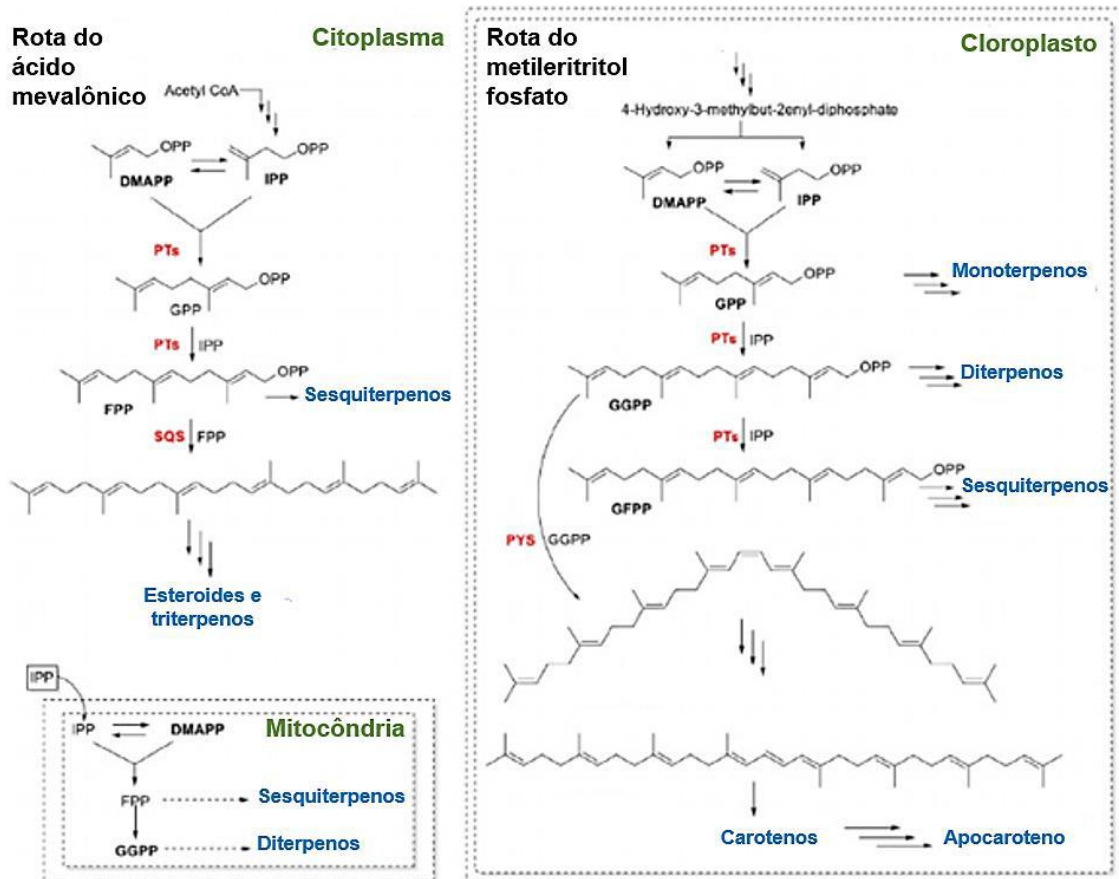


Figura 7 – Biossíntese de IPP (difosfato de isopentenila) através de duas rotas sintéticas. À esquerda, a via do ácido mevalônico (MVA). À direita, a via do fosfato de metileritritol (MEP). **IPP**: difosfato de isopentenila; **DMAPP**: difosfato dimetilalilo; **GPP**: difosfato de geranila; **FPP**: difosfato de farnesila; **GGPP**, difosfato de geranilgeraniol; **GFPP**: geranilfarnesil difosfato; **PTs**: prenilttransferases; **PYS**: fitoeno sintase; **SQS**: sesquiterpenos.

Fonte: HUANG E OSBOURN, 2019.

O IPP e de seu isômero, o DMAPP, são compostos pentacarbonados que atuam como precursores da biossíntese de terpenos. Através de reações de condensação, estes se unem, formando moléculas maiores. O IPP e o DMAPP, na formação de monoterpenos, unem-se para formar o GPP (difosfato de geranila), o qual é composto por 10 átomos de carbono. Em seguida, o GPP tem a opção de se unir com outra molécula de IPP, produzindo o FPP (difosfato de farnesila). O FPP possui 15 átomos de carbono e é a molécula precursora dos sesquiterpenos. Essas reações ocorrem de forma repetida, até a formação de politerpenos (TAIZ E ZEIGER, 2004; GARCÍA; CARRIL, 2009; DEWICK, 2009).



### 1.5.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são compostos que apresentam duas unidades de isopreno. Essas moléculas são encontradas, amplamente, em plantas e contribuem com as propriedades organolépticas que são vistas em especiarias, frutas cítricas, flores e coníferas (DAVIS, 2010). Estas substâncias são os principais constituintes dos óleos essenciais e são capazes de atuar como pesticidas, herbicidas, e como agentes antimicrobianos e anticarcinogênicos (SILVA, 2005). Na indústria, estão comumente envolvidos em cosméticos, conservantes de alimentos e como aromatizantes e flavorizantes (KABIR et al., 2019). Alguns monoterpenos possuem atividades biológicas bem descritas, como o mentol (Figura 8). Esse é utilizado desde a antiguidade como analgésico tópico. Acredita-se que esta ação analgésica esteja ligada ao isômero (-) -mentol (PERGOLIZZI et al., 2018). Outro exemplo é o limoneno (Figura 8), um dos principais componentes dos óleos essenciais provenientes de frutas cítricas. O limoneno mostrou atividade quimio-preventiva contra alguns tipos de tumores malignos, como o câncer gástrico e colorretal (ROZZA et al., 2011).

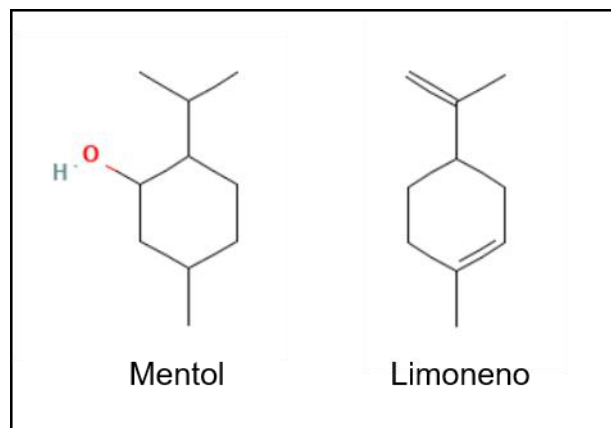


Figura 8 – Estrutura química dos monoterpenos mentol e limoneno.

Fonte: DRUGBANK, 2021.

Além disso, pode-se destacar o mirceno, o qual é utilizado para produção de perfumes; o lavandulol, que constitui o óleo de lavanda, sendo amplamente utilizado na fabricação de fragrâncias masculinas; a carvona, uma substância com atividade antifúngica; o linalol, aromatizante utilizado em chás; e, por fim, o principal componente do óleo de eucalipto, o eucaliptol, que atua reduzindo dores e

processos inflamatórios. Essas substâncias estão representadas abaixo (Figura 9) (SILVA, 2008; MARTINS, 2012).

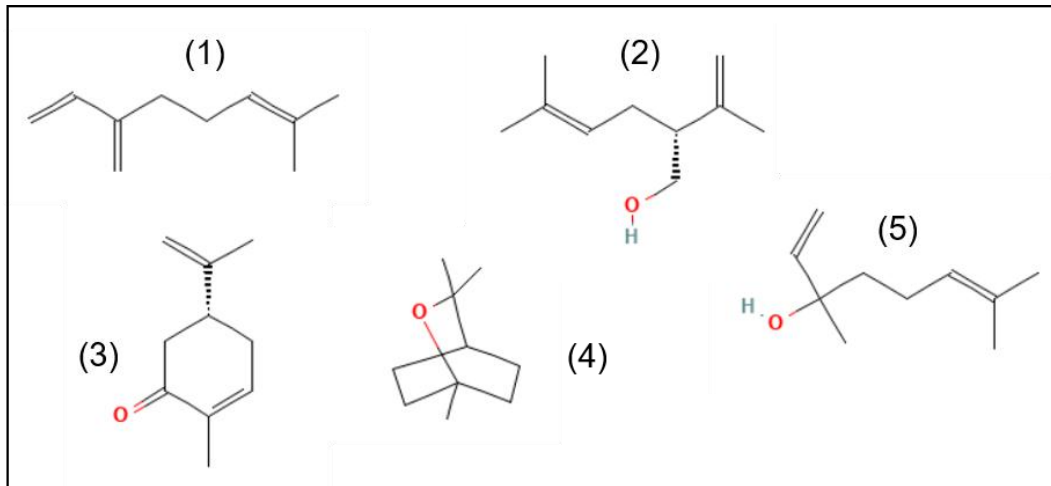


Figura 9 – Monoterpenos mirceno (1), lavandulol (2), carvona (3), eucaliptol (4) e linalol (5).

Adaptado de Silva (2008).

### 1.5.1.1 Terpinoleno

O terpinoleno (1-metil-4-propan-2-ilideneciclohexeno), também chamado  $\delta$ -terpineno (Figura 10) é um monoterpene que pode ser encontrado em diversas regiões do mundo e é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de várias espécies de pinheiros. Esta substância pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, tais como a *Melaleuca alternifolia* C. presente na Austrália (SOUTHWELL; RUSSEL, 2002); a *Pistacia vera* L., na Grécia e no Irã (AHMAD et al., 2010); *Artemisia dracunculus* L., no Irã (KAMIRI et al., 2015); e, *Rosmarinus officinalis* L., a qual pode ser encontrada no Brasil (CLEFF et al., 2012; MACEDO et al., 2016).

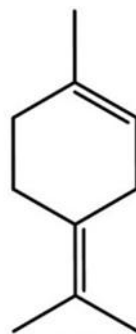


Figura 10 – Estrutura química do terpinoleno.

Fonte: (ITO; ITO, 2013).

Estudos vêm demonstrando algumas atividades biológicas do terpinoleno, como atividade anticâncer (AYDIN et al., 2013), antioxidante (CABRAL et al., 2015), analgésica e anti-inflamatória (MACEDO et al., 2016), e. Também foi observado que o terpinoleno possui efeito sedativo em camundongos, onde a presença das ligações pi no anel e na dupla ligação na cadeia lateral conferem efeitos sedativos significativos em modelos animais, utilizando camundongos (ITO; ITO, 2013).

Além disso, este composto é amplamente aplicado na agricultura, na indústria alimentícia e na produção de perfumes (SEYYEDNEJAD et al., 2010; INTHEMA et al., 2017). No que tange ao seu uso na agricultura, o terpinoleno funciona como um tipo de bioherbicida que pode atuar inibindo o crescimento de fungos, bactérias e células animais, além de possuir ação larvívica (AGUS et al., 2018; SCAVO et al., 2018; SHAFAGHA; SHAFAGHATLONBAR, 2011; AYDIN et al., 2013; PAVELA et al., 2019). Na indústria, é utilizado como aromatizante de alimentos em óleos essenciais artificiais, frutas, frutas cítricas, sorvetes, bebidas não alcoólicas, doces e assados (SOWNDHARARAJAN, et. al., 2015).

## **1.6 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

As substâncias gasosas, voláteis ou volatilizáveis podem ser separadas utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa, onde a separação se baseia na diferença de distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). Esta técnica é utilizada para a separação, quantificação e identificação, quando acoplado a um espectrômetro de massas, de diversas substâncias (COLLINS et al., 2006). A amostra, em sua forma líquida ou gasosa, é introduzida na coluna contendo a fase estacionária através de um sistema de injeção. Através do uso de altas temperaturas no local da injeção e na coluna, a amostra é vaporizada. Em seguida, de acordo com as propriedades das substâncias da amostra e as da fase estacionária, estas podem ficar retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. Ao fim da coluna, um detector é capaz de identificar e quantificar essas substâncias (COLLINS et al., 2006).

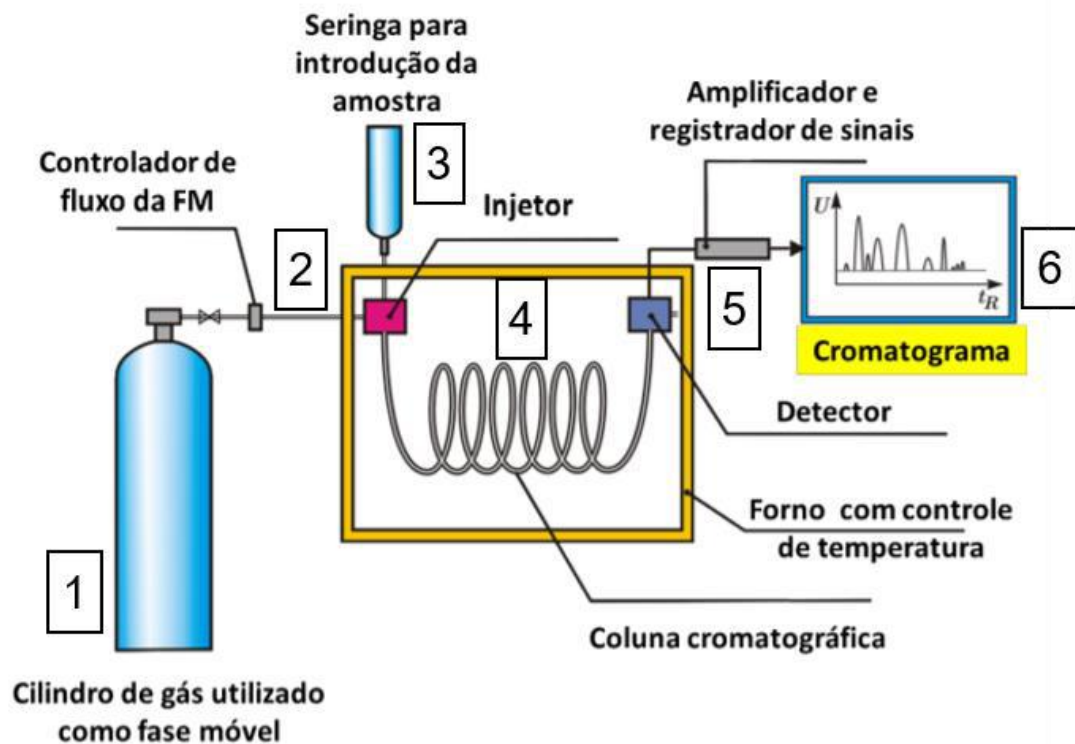


Figura 11 – Esquema de um cromatógrafo gasoso CG-EM. (1) fonte do gás de arraste; (2) controlador da vazão e regulador de pressão; (3) sistema de injeção da amostra; (4) coluna cromatográfica; (5) sistema de detecção; (6) sistema de registro e tratamento dos dados.

Adaptado de Pedrosa (2018).

A cromatografia gasosa é uma técnica com alto poder de resolução, permitindo a análise de inúmeras substâncias dentro de uma mesma amostra. Além disso, outro ponto positivo é devido aos seus baixos limites de detecção, permitindo detectar em amostras, mesmo em analitos em concentrações na ordem de picogramas por mililitro ou até menos. Por isso, são necessárias apenas pequenas quantidades de amostras para a realização de análises (COLLINS et al., 2006; EICEMAN et al., 2002).

Apesar de inúmeros pontos positivos, esta técnica é bastante limitada para um grupo seletivo de amostras, ou seja, só pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis. Caso a substância não se encaixe nestes requisitos, pode-se utilizar técnicas de derivatização a fim de melhorar essas características nas substâncias a serem analisadas (COLLINS et al., 2006).

Com o objetivo de tornar as análises mais assertivas, a cromatografia gasosa pode ser acoplada a um espectrômetro de massas. Essa técnica permite a identificação de centenas de componentes que estão presentes em sistemas

biológicos e naturais. Incluindo esteroides, vitaminas, identificação de contaminantes da água (aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, componentes policíclicos aromáticos). Além disso, podem ser utilizados em diagnósticos médicos e estudo de metabólitos de medicamentos, desde análise da matéria-prima para a produção do medicamento até o controle de qualidade do produto acabado (SKOOG, et. al., 2006).

Basicamente, espectrômetro de massas (EM) possui cinco componentes essenciais: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador (Figura 12). Quando o gás é introduzido no equipamento, este atinge a fonte de ionização (FI). A FI é a região de alto vácuo, onde o analito é ionizado, sendo convertido em íons. Os íons formados são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas (AM). O AM tem como função é separar os íons formados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ).

Em seguida, após a amostra passar pelo AM, um detector é responsável por receber os íons formados e separados pelo analisador, transformando-os em sinais elétricos, os quais são processados e convertidos em sinais através do computador acoplado ao sistema. O EM é um dos detectores mais eficientes em cromatografia gasosa. Este equipamento mede a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons que são formados após a análise da amostra, realizando uma varredura repetida das massas durante a determinação. Ou seja, o EM é o registro das intensidades ou frequência de geração de determinado fragmento (razão  $m/z$ ) (PAVANELLI, 2010; PRESUTTI, 2017).

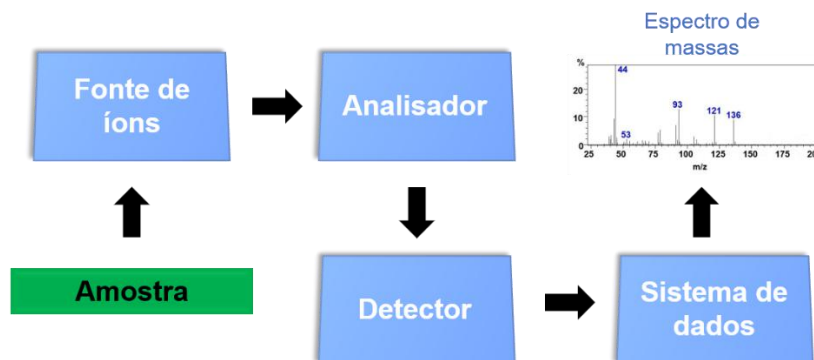


Figura 12 – Componentes presentes em um espectrômetro de massas (EM).

Fonte: Adaptado de PAVANELLI (2010).

O método de ionização mais utilizado em CG-EM é a ionização eletrônica, onde os elétrons de alta energia (70 eV) colidem com as moléculas dos analitos,

formando, inicialmente, íons positivos. Em seguida, através da transferência de energia utilizada para promover a ionização, são formados os fragmentos. Cada molécula possui um perfil de fragmentação e estes foram massivamente estudados nas últimas décadas e é através desses perfis que cada molécula pode ser identificada (PRESUTTI, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

Um processo biotecnológico pode compreender tanto a utilização de microrganismos íntegros, como seus componentes isolados, como as enzimas, para a produção dos mais diversos compostos químicos (desde proteínas – biofármacos a antibióticos), até para a geração de biomassa e despoluição de efluentes (RICO-MARTINEZ et al, 2014). A biotecnologia consiste hoje em um dos campos mais promissores de tecnologias mundiais de ponta, sendo a tecnologia enzimática de grande destaque (CHANDRA, 2012). A biocatálise apresenta-se como excelente ferramenta para a síntese de substâncias de interesse industrial (HASAN et al., 2006) em diferentes áreas como, por exemplo, a indústria química, alimentícia, farmacêutica, têxtil, de detergentes, tratamento de efluentes, dentre outras.

Além disso, o uso de fungos em reações de biotransformações, possuem vantagens, como menores custos de produção e baixa complexidade experimental (GIRI, et. al., 2001; MA et al., 2014). Dentre os fungos que podem ser usados em biocatálise ou em estudos de metabolismo encontram-se os fungos endofíticos que como resultado de sua interação ecológica com as plantas, podem tornar-se fontes alternativas de novas substâncias e enzimas potencialmente importantes para a agricultura e indústria farmacêutica. Os fungos endofíticos selecionados são provenientes da espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana* Schauer. do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, unidade de conservação localizada no litoral Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, corroborando com objetivos fundamentais presentes no plano de preservação da reserva (ICMBio, 2007).

O terpinoleno é um monoterpeneo com diversas atividades biológicas, poucos estudos de biotransformação, nenhum estudo utilizando os fungos deste estudo e de fácil cultivo. Além disso, por ser um produto de partida de baixo custo, há a possibilidade de formação produtos de biotransformação com maiores valores agregados. Bem como, o uso de processos biocatalíticos para a produção de aromas tem ganhado espaço no mercado, uma vez que, estes produtos podem ganhar o rótulo de “natural” o que agrega valor aos aromas obtidos por esta via (DEMYTTENAERE, DE KIMPE, 2001; SERRA, et. al., 2005; MAROSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial biocatalítico dos fungos SSR2, SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum* em biotransformar o terpinoleno.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a solubilidade o terpinoleno em etanol;
- Avaliar a evaporação do terpinoleno nas condições de biotransformação;
- Realizar experimentos de biotransformação do terpinoleno empregando dos fungos SSR2, SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum*;
- Extrair o terpinoleno e eventuais produtos de biotransformação a partir de meio de cultura empregando a extração líquido-líquido;
- Analisar o terpinoleno e eventuais produtos de biotransformação em meio de cultura empregando a CG-EM.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Biotransformação do terpinoleno por fungos endofíticos**

#### **4.1.1 Materiais**

##### **4.1.1.1 Solventes e reagentes**

Os solventes orgânicos utilizados para a extração das amostras coletadas do meio de cultura foram todos graus cromatográficos. O acetato de etila e hexano foram adquiridos da Biograde Chemicals (Durham, NC, EUA). O álcool etílico foi obtido da empresa Neon (Suzano, SP, Brasil). E, por fim, o terpinoleno foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

##### **4.1.1.2 Equipamentos**

Inicialmente, foi utilizado autoclave vertical da marca Primatec, série 9141 (Itu, SP, Brasil) e cabine de segurança biológica de Classe II, modelo FLV, série 506, marca Trox (Butantã, SP, Brasil) foram utilizadas para o processo de esterilização do material e proteção do pesquisador e amostras, respectivamente.

A fase de crescimento dos fungos foi realizada em placas de Petri, utilizando estufa bacteriológica da marca DeLeo (Porto Alegre, RS, Brasil) e na primeira (pré-cultivo) e segunda fases (biotransformação) foi empregado um agitador tipo “*shaker*” modelo SL-223 da marca SOLAB (Piracicaba, SP, Brasil). Na etapa de avaliação da solubilidade foi empregado um agitador do tipo Vórtex mixer, marca Edutec (Curitiba, PR, Brasil). Por fim, para a etapa de extração, utilizou-se agitador do tipo Vórtex mixer e centrífuga modelo 80-2B, marca Edutec (Curitiba, PR, Brasil).

##### **4.1.2 Meios de cultivo**

###### **4.1.2.1 Meio Batata Dextrose Ágar enriquecido**

O meio batata dextrose ágar enriquecido, composto por dextrose, malte, triptona, ágar e extrato de levedura, foi adquirido da Himedia (Mumbai, Índia)

(Tabela 1). Após o preparo, o meio foi autoclavado a 121°C e 1,1 atm por 20 minutos.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade %</b>
Dextrose	15,0
Malte	15,0
Triptona	7,5
Ágar	22,0
Extrato de levedura	6,0
Água destilada	qsp

Tabela 1 – Composição meio Batata Dextrose Ágar enriquecido.

#### 4.1.2.2 Meio malte (pré-fermentativo)

O meio malte é composto por extrato de malte, dextrose, triptona e extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia). O pH foi ajustado para 6,2 com HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Após o preparo, o meio foi autoclavado a 121°C e 1,1 atm por 20 minutos (Barth et al., 2013).

<b>Componente</b>	<b>Quantidade (g/L)</b>
Extrato de malte	10,0
Dextrose	10,0
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Água destilada	qsp

O pH foi ajustado para 6,2 com solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>

Tabela 2 – Composição meio malte (Barth et al., 2013).

#### 4.1.2.3 Meio fermentativo CZAPEK-Dox

Este meio é formado por sacarose, nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), fosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), cloreto de potássio (KCl), sulfato de ferro heptahidratado (FESO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) todos reagentes

adquiridos da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e água destilada. Após o preparo, o meio foi autoclavado a 121°C e 1,1 atm por 20 minutos.

Componente	Quantidade %
Sacarose	3,000
NaNO <sub>3</sub>	0,200
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,050
KCl	0,050
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
Água Destilada	qsp

O pH foi ajustado para 5 com solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>

Tabela 3 – Composição meio Czapek-Dox (ALVIANO et al., 1992).

#### 4.1.3 Fungos selecionados

Os fungos empregados neste trabalho foram os fungos *Aspergillus sclerotiorum*, SSR2 e SSR3 (Figura 13) isolados da espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana* (Figura 14). Os fungos SSR2 e SSR3 ainda não foram identificados.



Figura 13 – Fungos selecionados: (1) *Aspergillus sclerotiorum*, (2) SSR2 e (3) SSR3.

Fonte: Da autora (2021).

A coleta da espécie vegetal foi realizada com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sobre número 62422-11.

Enquanto o acesso ao patrimônio genético Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) foi cadastrado sobre número AAA989F.



Figura 14 – Espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana*.

Fonte: Marcos Vinicius Toledo e Silva (2021)

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cultivo dos fungos

Os fungos *Aspergillus sclerotiorum*, SSR2 e SSR3 foram crescidos em placas de Petri para aquisição dos discos contendo os micélios do fungo. O meio utilizado para o crescimento foi o meio BDA enriquecido. Após a semeadura, as culturas foram incubadas por 7 dias a 30 °C.

### 4.2.2 Biotransformação do terpinoleno empregando fungos endofíticos

O procedimento de biotransformação foi realizado em duas etapas (BORGES et al., 2007). No primeiro estágio, chamado de pré-cultivo, foi utilizado o meio pré-fermentativo malte. Neste momento, retiraram-se 3 discos contendo os micélios do fungo que cresceram na placa de Petri, os quais foram adicionados aos tubos Falcons de 50 mL contendo 15 mL meio pré-fermentativo malte. Os tubos foram mantidos no *shaker* a uma rotação de 120 rpm a 30 °C durante 5 dias (Figura 15). Este primeiro estágio tem como objetivo a obtenção de uma massa micelial do fungo que será utilizado no segundo estágio do ensaio de biotransformação.



Figura 15 – Tubos Falcon de 50 mL contendo os fungos mais o meio malte disposto no *shaker* a 120 rpm a 30 °C.

Na segunda etapa, as massas miceliais obtidas foram adicionadas aos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek-Dox. O passo seguinte foi a adição de 23  $\mu$ L de terpinoleno solubilizados em 60  $\mu$ L de etanol. O esquema geral da metodologia está representado pela figura 16.

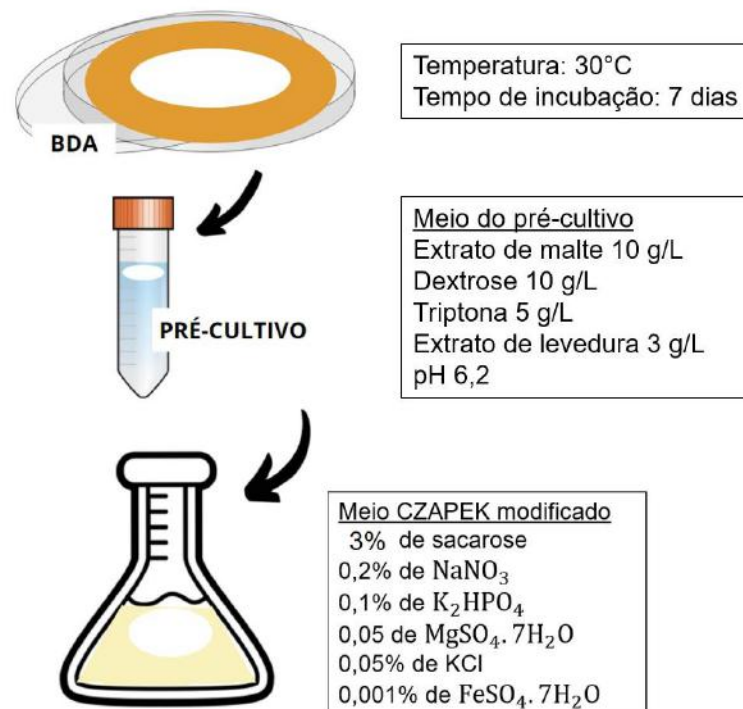


Figura 16 – Esquema geral do ensaio de biotransformação.

Paralelamente aos estudos de biotransformação foram realizados controles contendo: somente o meio de cultura Czapek-Dox e meio de cultura Czapek-Dox na

presença do microrganismo acrescido de 60 µL de etanol. Os erlenmeyers foram mantidos em *shaker* durante 3 dias, em uma temperatura de 30 °C e rotação de 120 rpm. Ao final de cada dia do estudo de biotransformação (D0, D1 e D2) foram coletadas amostras de 5 mL em tubos criogênicos. Os tubos foram rotulados e acondicionados em freezer a -20 °C.

#### 4.2.3 Análise da solubilidade do terpinoleno em etanol

Devido à baixa solubilidade do terpinoleno em água (9,5 mg/L a 25 °C), é necessário o uso de um co-solvente. Para tanto, foi selecionado o etanol, em que o terpinoleno é solúvel (FAO, 2004). Portanto, este foi submetido a testes de solubilidade em etanol a fim de encontrar-se solúvel no meio e estar disponível para as reações realizadas pelos fungos.

	<b>Terpinoleno</b>	<b>Etanol (µL)</b>
<b>Amostra 1</b>	23 µL	30
<b>Amostra 2</b>	23 µL	35
<b>Amostra 3</b>	23 µL	40
<b>Amostra 4</b>	23 µL	50
<b>Amostra 5</b>	23 µL	60

As quantidades descritas na Tabela 4 foram adicionadas em *ependorfs* de 1,5 mL e agitados em vórtex durante 30 segundos.

Tabela 4 – Análise de solubilidade do terpinoleno em etanol

#### 4.2.4 Concentração de terpinoleno utilizada nos experimentos de biotransformação

O terpinoleno exibe efeitos de citotoxicidade em uma concentração superior 200 mg/L (KRINGS et al., 2009). Por isso, a adição deste foi pensada de modo a obter-se uma concentração final de 200 mg/L de terpinoleno em um volume de 100 mL de meio de cultura. Para tanto, utilizou os dados de densidade fornecido na embalagem, conforme é visto a seguir.

$$d_{\text{terpinoleno}} = 0,861 \frac{g}{mL}$$

$$d = \frac{m}{V} \therefore 0,861 = \frac{20 \text{ mg}}{V} \therefore V = 23 \mu\text{L de terpinoleno}$$

Portanto, o volume utilizado de terpinoleno para atingir a concentração não-tóxica para as células fúngicas foi de 23  $\mu\text{L}$ .

#### **4.2.5 Avaliação da evaporação do terpinoleno nas condições de biotransformação**

O terpinoleno é uma substância que apresenta pressão de vapor de 0,74 mm Hg a 25 °C e temperatura de ebulição de 186 °C (PubChem), sendo considerada volátil (OLIVEIRA, 2017). Dessa forma, para verificar a extensão da evaporação do terpinoleno nas condições de biotransformação, 23  $\mu\text{L}$  de terpinoleno solubilizados em 60  $\mu\text{L}$  de etanol foram adicionados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek-Dox. Os erlenmeyers também foram mantidos no *shaker* durante 3 dias a uma temperatura de 30 °C e rotação de 120 rpm. As amostras foram coletadas após 24h de incubação (E1), 48h (E2) e 72h (E3). As amostras coletadas foram extraídas e analisadas conforme descrito na seção 4.3.

### **4.3 Extração e análise da biotransformação do terpinoleno por fungos endofíticos**

#### **4.3.1 Extração líquido-líquido**

Previamente para análise por CG-EM, cada amostra foi extraída com acetato de etila. Em um tubo de vidro, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do meio de cultivo Czapek-Dox mais 1000  $\mu\text{L}$  de acetato de etila. Os tubos foram agitados com o auxílio do vórtex durante 30 segundos. Em seguida, foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação foram coletados 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e estes foram transferidos para *vials* e armazenados em freezer a -20°C até o momento de análise por CG-EM.

#### **4.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)**

As análises foram realizadas por CG-EM da marca Shimadzu (Kioto, Japão), modelo GCMS-QP 2010. Este equipamento fica localizado na Central Analítica do

Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFRJ – Campus Fundão, na cidade do Rio de Janeiro – RJ. As análises foram realizadas pelo farmacêutico Marcos Vinícius Toledo e Silva. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (70 eV). A coluna empregada foi uma coluna capilar de sílica fundida DB – 5M (5% difenildimetilsiloxano) (30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m). Foram injetados 1  $\mu$ L de solução no modo split 1:5 com temperatura de injeção de 140 °C. As análises foram realizadas no modo *Full Scan*, onde o intervalo de massas analisado foi de m/z 35-500, iniciando a aquisição a partir de 3 minutos e adquirindo até 30 minutos. O hélio foi empregado como gás de arraste, a uma vazão de 1,0 mL/min. Ambas temperaturas utilizadas, tanto na fonte de íons como na interface foram de 240 °C. A temperatura inicial de análise foi de 60 °C, sendo mantida constante durante 5 min e foi aumentada a 10 °C/min até atingir 260 °C e mantida por mais 5 min. O tempo total de análise foi de 30 minutos.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análise de solubilidade do terpinoleno em etanol**

Após a adição de diferentes volumes de etanol foi observado que o volume de etanol que solubilizou a quantidade utilizada de terpinoleno (23  $\mu$ L) foi a amostra 5, que corresponde a 60  $\mu$ L, conforme pode ser observado na tabela 4 na seção 4.2.3. Pois somente com este volume, não foi observado a separação de fases entre o terpinoleno e etanol. Isto se encontra de acordo com o descrito na literatura, onde o terpinoleno é descrito como solúvel em etanol (FAO, 2004).

### **5.2 Avaliação da evaporação do terpinoleno nas condições de biotransformação**

A volatilidade de um composto está diretamente relacionada com sua a pressão de vapor. De modo geral, a pressão de vapor é a pressão exercida por um vapor puro que se encontra em equilíbrio com sua fase líquida, a qual é determinada pela natureza do líquido e pela temperatura do sistema, quando em equilíbrio. Geralmente, quando a pressão de vapor de um líquido se iguala à pressão externa exercida sobre o sistema, o líquido entra em ebulição. Por isso, mantém-se uma correlação positiva entre pressão de vapor de uma substância e sua volatilidade (CATALUÑA, 2006; POVH et al., 2006). De acordo com Oliveira (2017), o terpinoleno apresenta alta pressão de vapor em comparação a outros terpenos, como o carvacrol, timol, safrol, isosafrol, entre outros. Isto se dá, pois, uma vez que esta molécula é um hidrocarboneto e não há nenhum átomo que possa realizar ligações de hidrogênio na molécula, as forças intermoleculares existentes são fracas o bastante para permitir a evaporação do líquido. Dessa forma, como visto no cromatograma na figura 17, o terpinoleno estava presente na solução apenas nas primeiras 24h (E1) de experimento. Nos tempos 48h (E2) e 72h (E) não foi detectado a presença deste composto. Portanto, pode-se inferir que todo o terpinoleno volatilizou, após estar submetido por 24 horas às condições de biotransformação e por isso, não foi possível detectá-lo através de CG-EM.

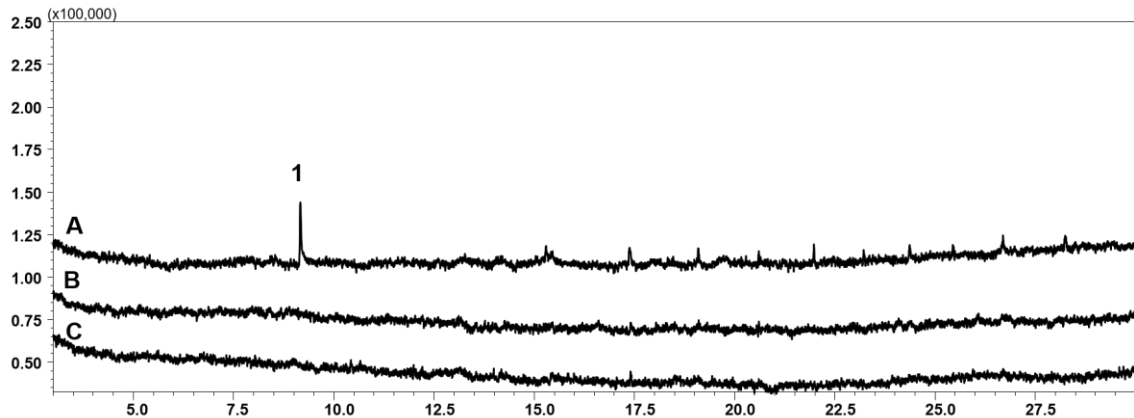


Figura 17 – Cromatogramas representativos da análise de evaporação do terpinoleno ao longo dos dias 1, 2 e 3: (A) E1, (B) E 2 (C) E3. As amostras consistem de terpinoleno na concentração de 200 mg/L dissolvidos em meio CZAPEK-Dox e submetidas as condições de biotransformação.

### 5.3 Biotransformação do terpinoleno por fungos endofíticos

#### 5.3.1 Biotransformação do terpinoleno pelo fungo SSR2

Os monoterpenos, por apresentarem estruturas químicas mais simples, destacam-se em reações de biotransformação uma vez que essa característica facilita reações com culturas celulares e a formação de produtos em poucos dias de experimento (LINDMARK-HENRIKSON et al., 2003).

Inicialmente, após o meio pré-fermentativo (malte), os fungos já possuem massa micelial suficiente para catalisar as reações de biotransformação. Nesta fase, as enzimas utilizadas por esses microrganismos encontram-se em maior concentração. Como visto por Smith e Rosazza (1974), os fungos possuem um sistema enzimático do tipo CYP450 homólogo aos mamíferos que permite que as reações de biotransformação aconteçam (NELSON; STROBEL, 1989). Em seguida, deu-se início as reações de biotransformações, utilizando o terpinoleno como substrato. As amostras provenientes das biotransformações e seus controles foram submetidos a extração e análise, por CG-EM como descrito na seção 4.3.2 a fim de identificar quais produtos foram formados. Com isso, obteve-se os seguintes cromatogramas mostrados nas figuras 18 e 19. A identificação dos produtos de biotransformação do terpinoleno foi realizada através da comparação entre o perfil cromatográfico das amostras controles (representadas pelas linhas B, C e D da figura 18 e 19), que não sofrem biotransformação, e as amostras onde a biotransformação ocorre (linha A).

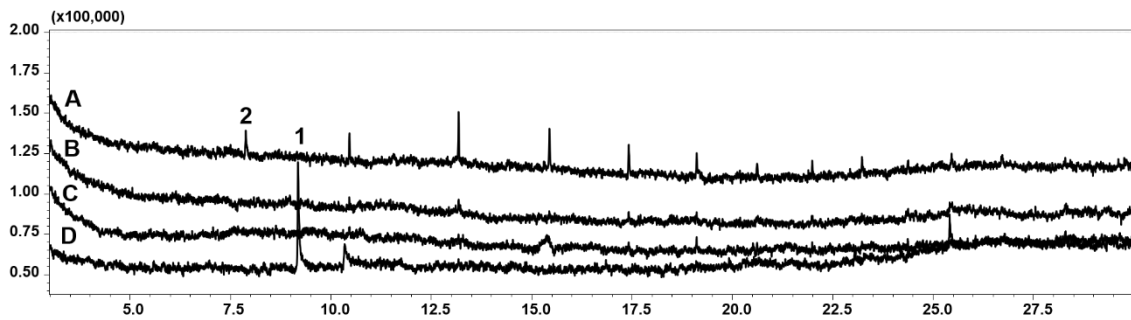


Figura 18 – Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR2: (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle do meio de cultura (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200 mg/L. Pico 1: terpinoleno e pico 2 (produto de biotransformação).

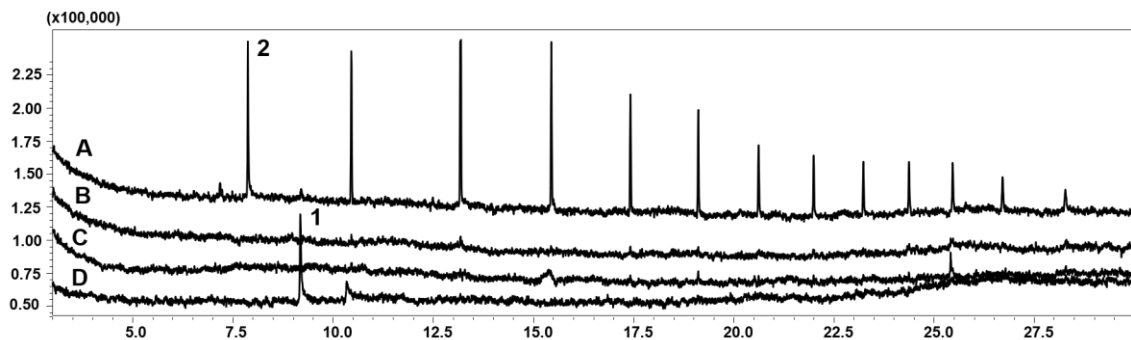


Figura 19 – Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR2: (A) Dia 2 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle do meio (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200mg/L. Pico 1: terpinoleno e pico 2 (produto de biotransformação).

Ao comparar o perfil cromatográfico, notou-se a presença de um pico no cromatograma da amostra onde se espera a biotransformação (linha A) que não foram identificados nas amostras dos controles (Figura 18 B, C e D e 19 B, C e D), identificados como produto de biotransformação 1 (PB 1), referente ao pico 2 presente nos cromatogramas (Figura 18 e 19). Os demais picos presentes nos cromatogramas são contaminações da amostra e, por isso, não serão discutidos.

### 5.3.1.1 Análise estrutural do terpinoleno

Com o objetivo de propor as estruturas do produto formado, faz-se necessário analisar, de forma minuciosa, as características estruturais do terpinoleno. Uma vez que este monoterpene é o substrato, todas as possíveis substâncias formadas serão

seus derivados. O terpinoleno possui massa molecular de 136 g/mol. Através da técnica de CG-EM, obteve-se o seguinte espectro de massas para o terpinoleno, representado na figura 20.

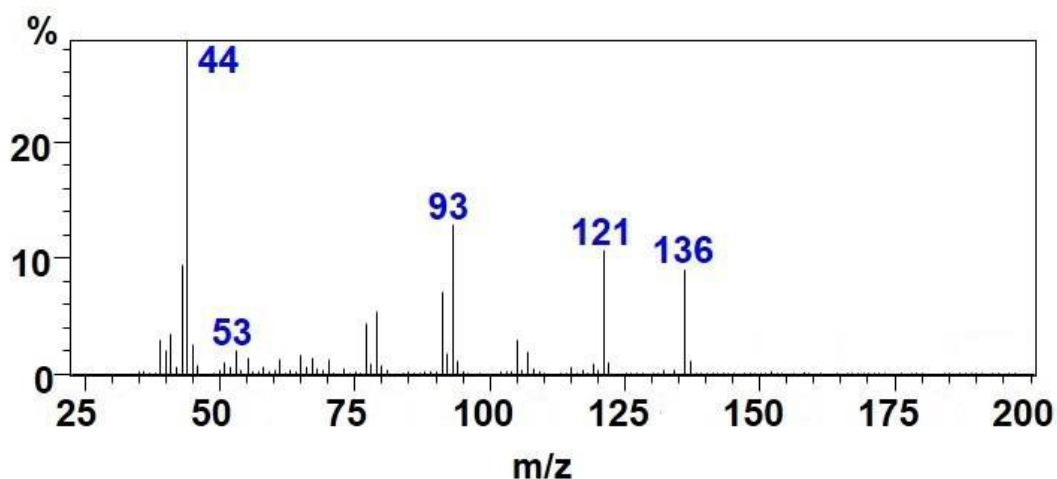


Figura 20 – Espectro de massas do terpinoleno obtido pela técnica de ionização eletrônica (70 eV).

Ao analisar o espectro de massas do terpinoleno, observa-se o pico base em m/z 44, sendo o correto para o terpinoleno o íon com m/z 93 presente no espectro, e o pico do íon molecular em m/z 136. Além disso, o espectro mostra outros íons fragmento com relação m/z 53 e 121. Assim como mostrado na figura 21, do terpinoleno (I), através de uma reação do tipo radicalar, é retirado um grupamento metila ( $\text{CH}_3$ ), formando um íon com relação m/z 121 (Figura 21, V). Ainda, outro íon fragmento observado na figura 16 é o de relação m/z 93, o qual é definido como o  $\text{C}_7\text{H}_9^+$  (Fig, 21, III). Este íon fragmento é proveniente de uma estrutura formada através da isomerização do terpinoleno, levando a uma conjugação, seguida por clivagem alílica, dando origem ao íon de m/z 93 (Fig. 21 III). E, através de uma clivagem adicional, há a formação de outro ion fragmento com relação m/z 53, o qual é devido a formação de um dieno  $\text{C}_4\text{H}_5^+$  (Fig. 21, IV) (SARJONO, et. al., 2019).

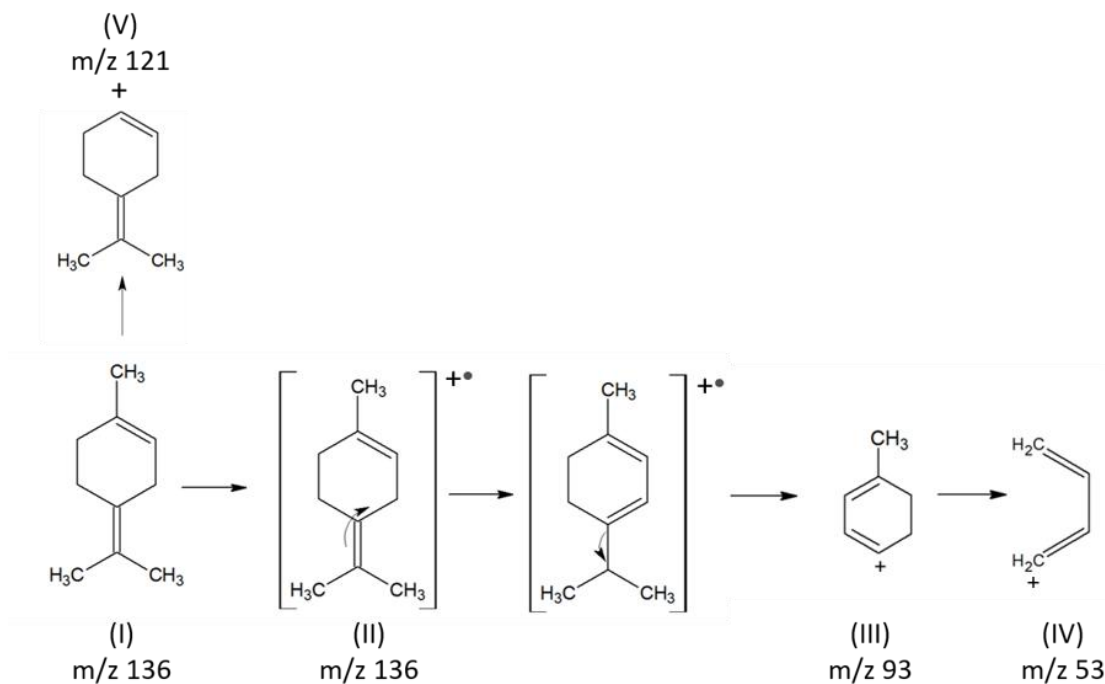


Figura 21 – Proposta de fragmentação do terpinoleno. Adaptado de (SARJONO, et. al., 2019).

### 5.3.1.2 Análise estrutural do produto de biotransformação 1 (PB 1)

O produto de biotransformação 1 foi observado tanto no dia 1, como no dia 2 da biotransformação. Segundo o banco de dados *National Institute of Standards and Technology* (NIST), o PB 1 pode ser o monoterpene limoneno, com 96% de similaridade. Esta molécula apresentou massa molecular igual a 136 g/mol. O tempo de retenção visto foi igual a 7,85 minutos e seu espectro de massas está apresentado na figura 22.

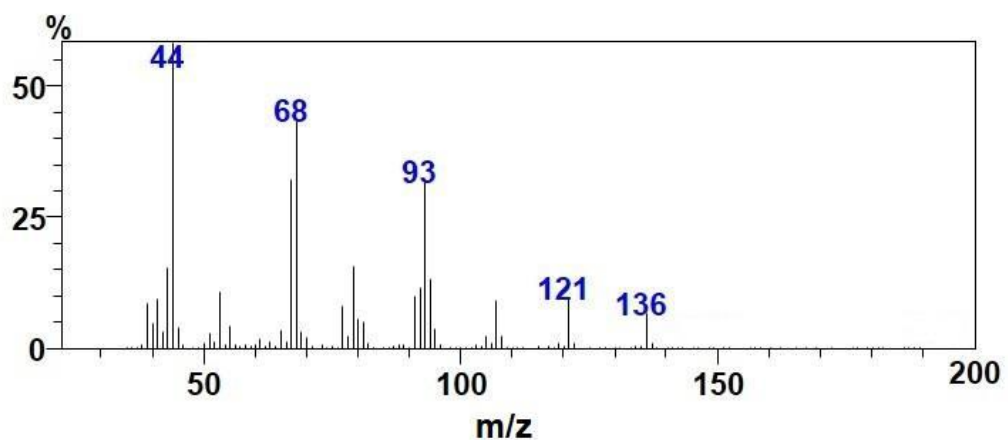


Figura 22 – Espectros de massa do PB1, com tempo de retenção igual a 7,85 minutos.

Com o espectro de massas do PB 1 (limoneno) visto na figura 22, destacam-se os íons fragmentos com relação  $m/z$  68, 93, 121 e o íon molecular 136 em ordem decrescente de intensidade de sinal. Na figura 23, está ilustrado a fragmentação desta substância para a formação destes íons, os quais corroboram para a confirmação de sua identidade.

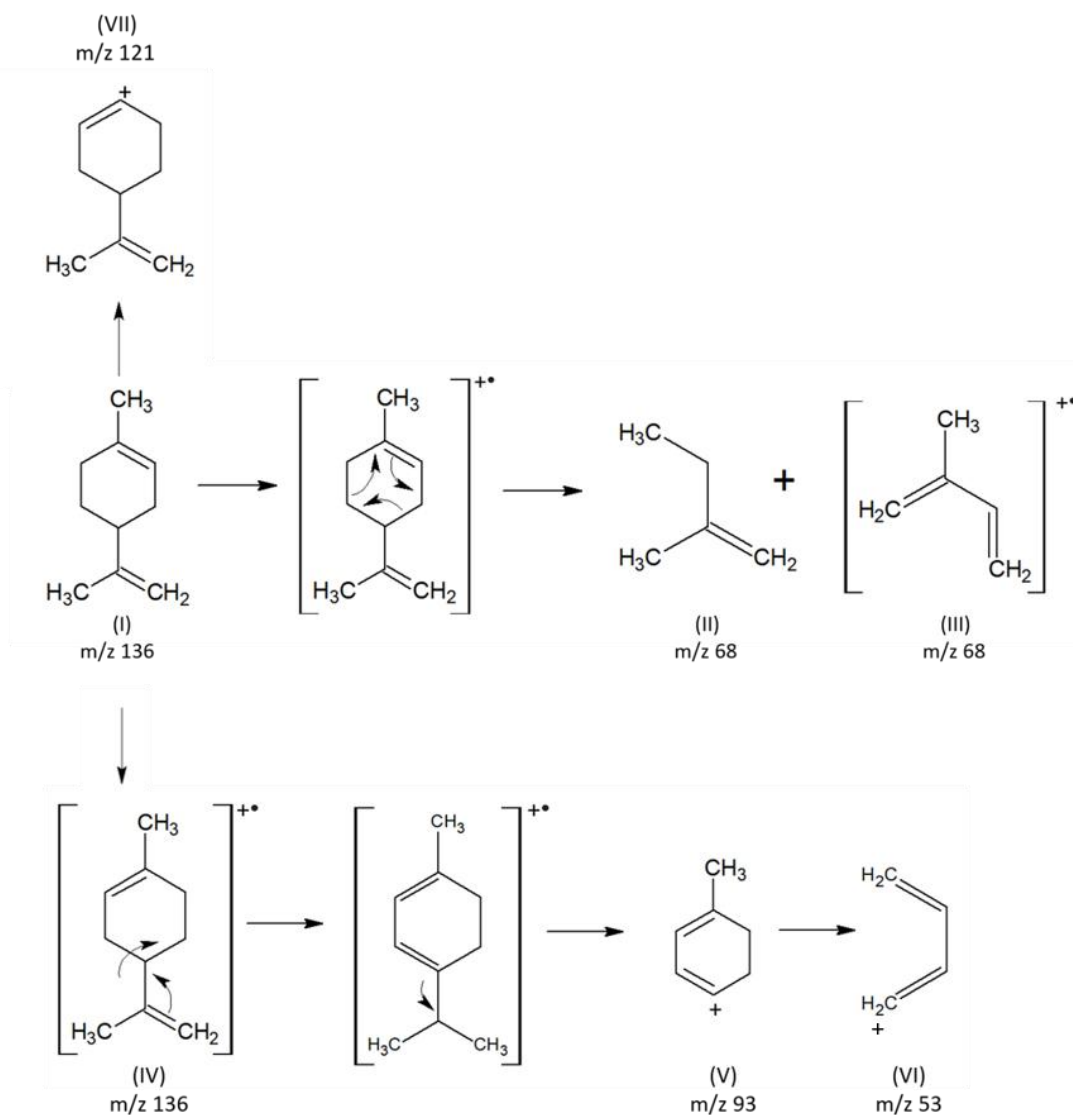


Figura 23 – Proposta de fragmentação do limoneno. Adaptado de BABY & RANGANATHAN, 2016.

O espectro de massa do limoneno exibiu um pico base em  $m/z$  68 e íon molecular em  $m/z$  136 e demais íons fragmento com relação  $m/z$  93 e 121 (Figura 23). Como visto na figura 23-I o limoneno é um alceno cíclico e por isso, possui uma maior tendência em sofrer a reação do tipo retro Diels Alder, levando a formação de um dieno neutro e um cátion radical ( $C_5H_8$ ) com  $m/z$  68 (Figura 23, II e III), o qual foi visto como pico base no espectro de massas. O limoneno, através da eliminação

radicalar de uma metila ( $\text{CH}_3$ ), forma um composto de  $m/z$  121 (Figura 23, VII). Um composto onde a estabilização da carga por conjugação será mais estável, e por isso, observa-se a formação do composto de  $m/z$  121 (SILVERSTEIN et al., 2005). Outro íon fragmento observado na figura 23 é o de relação  $m/z$  igual a 93, o qual é referente ao  $\text{C}_7\text{H}_9^+$  (Figura 23, V). Este fragmento é referente à estrutura formada por isomerização do limoneno, levando a uma conjugação, seguida por uma clivagem alílica, que numa fragmentação adicional, forma um dieno ( $\text{C}_4\text{H}_5^+$ ), o qual possui  $m/z$  53 (Fig. 23, VI) (BABY; RANGANATHAN, 2016).

Moléculas contendo anéis de ciclohexanos possuem a capacidade de se fragmentarem por meio de uma clivagem do tipo retro Diels Alder em análises em espectrometria de massa. Nesse contexto, o terpinoleno, ao ganhar energia do sistema durante a ionização, poderia sofrer uma reação de ionização transformando-se em limoneno, o qual posteriormente seria identificado. No entanto, Vicenti e colaboradores (1988) mostraram que, embora o sistema possua energia suficiente para permitir esta reação, qualquer possibilidade de isomerização de terpinoleno em limoneno não ocorre durante a análise utilizando espectrometria de massas.

Estudos demonstram que o terpinoleno foi biotransformado em diversos metabólitos por inúmeras espécies de microrganismos. Ele foi convertido a (*1R*)-8-hidroxi-3-*p*-menten-2-ona, (*1R*)-1,8-di-hidroxi-3-*p*-menten-2-ona e 5 $\beta$ -hidróxifenchol pelo fungo *Aspergillus niger*. O fungo *C. cassicola* foi capaz de promover a conversão do terpinoleno em terpinoleno-1,2-*trans*-diol e terpinoleno-4,8-diol. Além disso, estudos utilizando *Spodoptera litura* mostram também que este fungo permitiu a biotransformação do terpinoleno em 1-*p*-menteno-4,8-diol, ácido cumínico (29%, um produto principal) e ácido terpinoleno-7-óico. Já em experimentos utilizando coelhos, o terpinoleno foi convertido a terpinoleno-9-ol e terpinoleno-10-ol (NOMA; ASAKAWA, 2010).

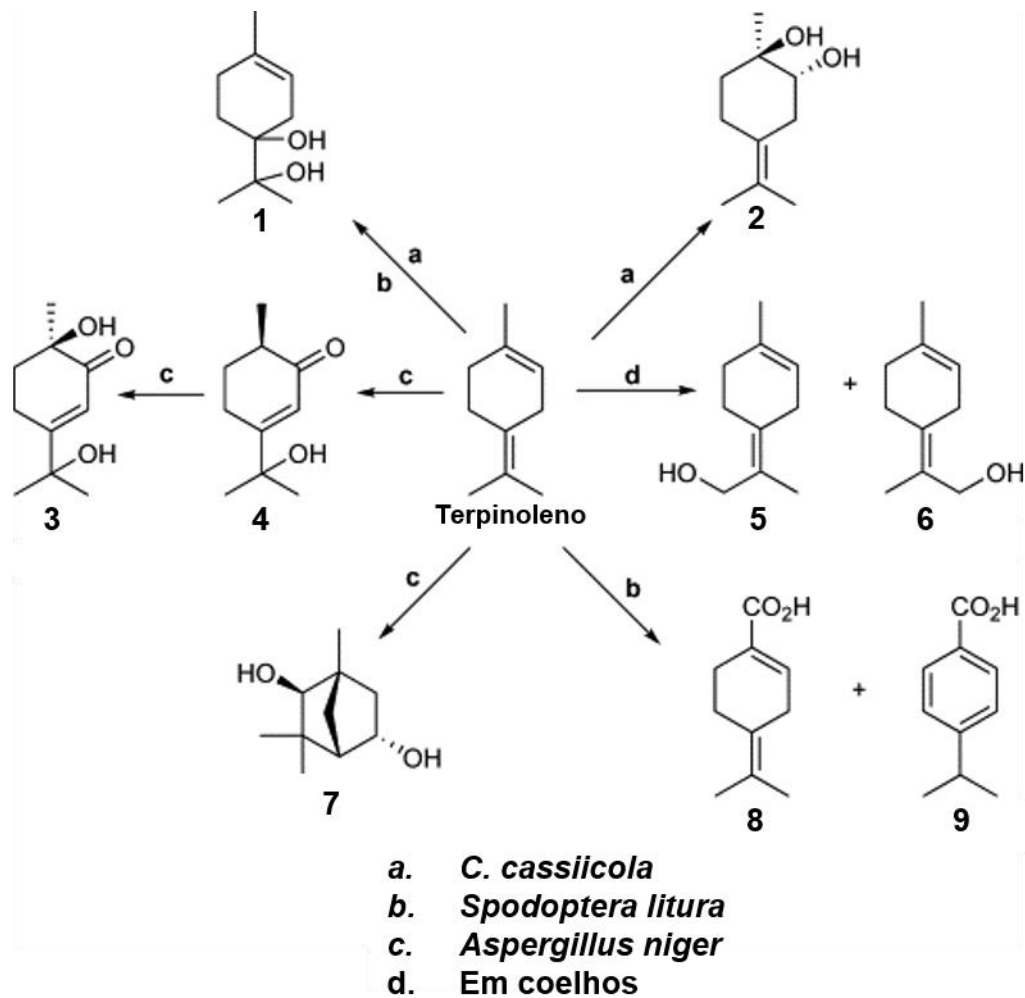


Figura 24 – Produtos de biotransformação do terpinoleno obtidos através do uso de microrganismos de espécies diferentes. **1:** terpinoleno-4,8-diol; **2:** terpinoleno-1,2-*trans*-diol; **3:** (1*R*)-1,8-di-hidroxi-3-*p*-menten-2-ona; **4:** (1*R*)-8-hidroxi-3-*p*-menten-2-ona; **5:** terpinoleno-9-ol; **6:** terpinoleno-10-ol; **7:** 5β-hidróxifenchol; **8:** ácido terpinoleno-7-óico; **9:** ácido cumínico. Fonte: Adaptado de NOMA; ASAKAWA, 2010.

### 5.3.2 Biotransformação do terpinoleno pelos fungos SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum*

A identificação dos produtos de biotransformação se dá através da comparação entre o perfil cromatográfico das amostras controles (são representadas pelas linhas B, C e D nas figuras 25 e 26), que não sofrem biotransformação, e as amostras onde a biotransformação ocorre (linha A). Portanto, de acordo com o visto nos cromatogramas nas figuras 25 e 26, não foi observado a presença de picos na linha A, indicando que não houve formação de produtos de biotransformação com os fungos SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum*.



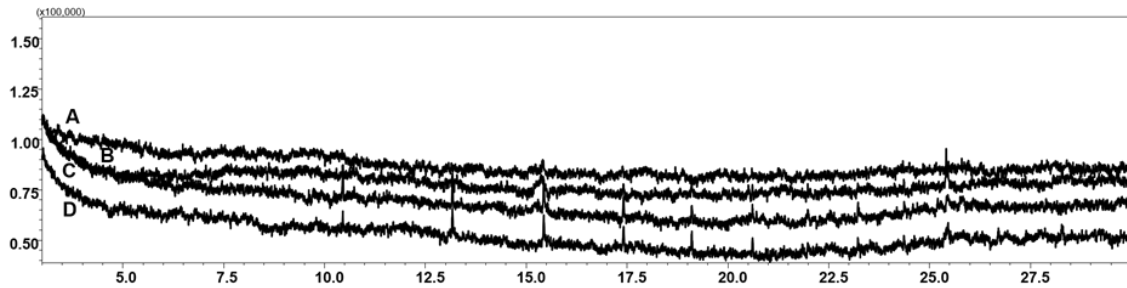


Figura 25 – Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico SSR3: (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle meio (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200 mg/L.

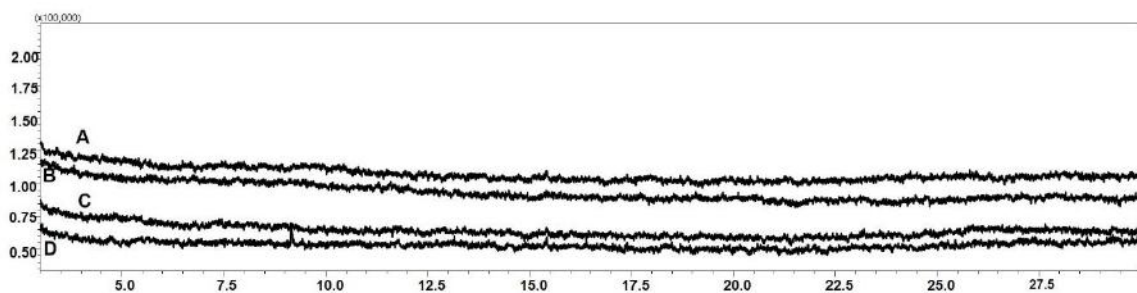


Figura 26 – Cromatogramas representativos da biotransformação do terpinoleno pelo fungo endofítico *Aspergillus sclerotiorum*: (A) Dia 1 da Biotransformação, (B) Controle do fungo com etanol (dia 2), (C) Controle meio (dia 2) e (D) solução de terpinoleno 200 mg/L.

A ausência de produtos de biotransformação pode estar relacionada à atividade antifúngica do terpinoleno. Estudos mostraram que este composto, em concentrações de 150-200 mg/L possuem efeito tóxicos em cultura de linfócitos periféricos de humanos. Para células fúngicas, no entanto, devido a presença da parede celular, há diferenças nas taxas de mortalidade e concentração de terpinoleno utilizadas para atingir os mesmos efeitos tóxicos (AGUILAR-USCANGA; FRANC, 2003; TURKEZ et al., 2015). Dentre os monoterpenos, como o  $\alpha$ -terpineol e 1,8-cineol, os potenciais inibitórios e antifúngicos do terpinoleno são considerados menos eficazes. Assim como para estas substâncias e para o terpinoleno, a proposta para explicar os efeitos tóxicos observados é que estas moléculas possam gerar uma alteração na permeabilidade da membrana celular, levando a necrose da célula fúngica. Além disso, foram observados aumentos significativos nos níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo após a exposição de várias espécies fúngicas ao terpinoleno (YU et al., 2015; PONTIN et al., 2015; MONTANARI et al., 2012).

Além da possível inibição do maquinário enzimático fúngico pelo terpinoleno, é possível que as condições de biotransformação tenham influenciado diretamente na concentração desse terpeno no meio de cultura. Como visto na seção 5.2, o terpinoleno evaporou completamente após 24 horas de experimento, não estando mais presente nos dias dois e três de biotransformação. Dessa forma, devido a sua alta volatilidade, as condições do experimento podem ter potencializado a evaporação dessa molécula para o ambiente, tornando-o ausente no meio de cultura. Com isso, não haveria substrato suficiente para que o fungo realize as reações de biotransformação (OLIVEIRA, 2017).

## 6. CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento do procedimento de biotransformação com o terpinoleno, foi observado que o volume que melhor solubilizou a quantidade necessária de terpinoleno foi de 60  $\mu$ L de etanol.

Além disso, foi visto que o terpinoleno evaporou completamente após um dia de experimento, não estando mais presente nas amostras no dia 2 e 3 após o início do procedimento de biotransformação.

A extração líquido-líquido permitiu a análise do terpinoleno e seu produto de biotransformação livre de interferentes.

A biotransformação fúngica utilizando o fungo SSR2 foi analisada por CG-EM e através da análise via espectrometria de massas, foi possível a identificação de um produto de biotransformação 1. O PB1, através do perfil de fragmentação, foi caracterizado como limoneno pela biblioteca de espectros de massas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e confirmado com dados da literatura. O limoneno foi visto tanto no D1 quanto no D2 de biotransformação.

## **7. PERSPECTIVAS**

### **7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO**

De acordo com os resultados obtidos, há a necessidade de otimizar os parâmetros utilizados no processo de biotransformação, tais como a duração do experimento, a concentração do terpinoleno a ser utilizada e a velocidade de agitação durante o procedimento e temperatura de incubação.

#### **7.1.1 Duração do experimento**

Como foi observado, o terpinoleno evapora completamente após 24 horas de biotransformação. Por isso, as alíquotas a serem coletadas devem se concentrar ao longo desse dia.

#### **7.1.2 Concentração do terpinoleno**

Visto a falta de resultado para os fungos SSR3 e *Aspergillus sclerotiorum*, pode-se pensar em realizar experimentos de concentração inibitória mínima do fungo frente a diferentes concentrações de terpinoleno. Para tanto, outras concentrações de trabalho serão pensadas, tais como 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L, que são concentrações menores que a concentração atual de trabalho (200 mg/L). Dentre todas as concentrações utilizadas, escolheremos a que obtiver maior rendimento no que tange à presença de produtos de biotransformação.

#### **7.1.3 Velocidade de agitação**

Visto que a velocidade do *shaker* pode influenciar diretamente a evaporação do substrato, o ideal será realizar diferentes experimentos em diferentes rotações, como em 80 rpm, 90 rpm, 100 rpm, 110 rpm e 120 rpm.

#### **7.1.4 Temperatura de incubação**

Considerando que o terpinoleno é uma substância volátil pretende-se reduzir a temperatura de incubação atual de 30 °C para 25 °C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-USCANGA, B., FRANÇ, J. M., A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation, **Lett. Appl. Microbiol.**, 37, 268–274, 2003.
- AGUS, H. H., SARP, C., CEMILOGLU, M. Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicol. Res.**, v. 7, 848–858, 2018.
- AHMAD, N. S., WAHEED, A., FARMAN, M., QAYYUM, A. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. **Journal Ethnopharmacol**, 2010; 129: 250–253, doi: 10.1016/j.jep.2010.03.017.
- ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R. TRAVASSOS, L.R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environment factors on *Fonsecae pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, New York, v. 119, p. 17-23, 1992.
- ASTANI, A., REICHLING, J., SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytother**, 2010, 24: 673-679.
- AYDIN, E., TÜRKEZ, H., TAŞDEMİR, Ş. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. **Arh Hig Rada Toksikol**, 64:415–24, 2013.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos Endofíticos**. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 1999.
- AZEVEDO, J. L., MACCHERONI JÚNIOR, W., ARAÚJO, W. L. Importância dos microorganismos endofíticos na agricultura. In: LUZ, W. C. **RAPP: revisão anual de patologia de plantas**. v. 11, 2003. p.333-71.
- BABY, K. C., RANGANATHAN, T. V. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare*) volatile oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 8, 248–256, 2016.
- BARTH, T.; ALEU, J.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S.; COLLADO, I.G. HPLC Analysis of Midodrine and Desglymidodrine in Culture Medium: Evaluation of Static and Shaken Conditions on the Biotransformation by Fungi. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 460–467, 2013.
- BARY, A. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten** v. 2, Engelaman, Leipzig, 1866.
- BENETEL, Gabriela. **Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore**. 2018. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, 2018.

BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, 2009, v. 32, n. 3, p. 588-594.

BORGES, K.B.; BORGES, W.S.; PUPO, M.T.; BONATO, P.S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2008.

BOUYAHYA, Abdelhakim. ET-TOUYS, Abdeslam. ABRINI, Jamal. TALBAOUI, AHMED. Lavandula stoechas essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017, 12. 179-184.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **Int J Food Microbiol**. 2004, Aug. 1, 94(3):223-53.

CABRAL, C., POCAS, J., GONCALVES, M. J., CAVALEIRO, C., CRUZ, M. T., SALGUEIRO, L. Ridolfia segetum (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Ind Crops Prod** 2015; 65: 56–61.

CALSAMIGLIA, S., BUSQUET, M., CARDOZO, P. W., CASTILLEJOS, L., FERRET, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, 2007, 90(6), 2580–2595.

CATALUÑA, R. S. R. Desenvolvimento de um equipamento para avaliação do efeito do etanol na pressão de vapor e entalpia de vaporização em gasolinas automotivas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, pp. 580-585, 2006.

CAVAION, J. C. L. **Aplicação de fungos filamentosos para s-oxidação do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzóico (lassbio-596)**. Tese (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, 2012.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.95, p.47-59, 2012.

CHAPLA, V. M., BIASETTO, C. R., ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev. Virtual Quím.**, 5 (3), 421-437, 2013.

CLEFF M. B., MEINERZ, A. M. I., FONSECA, A. O., ALVES, G. H., MEIRELES, M. C. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero Candida isoladas de animais ao

óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2012.

COLLINS, C.H., BRAGA, G. L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DAVIS, E. Advances in the Enzymology of Monoterpene Cyclization Reactions. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. p. 585-608, 2010.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, 2001.

DEMYTTENAERE, J. K. N., Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 265-270, 2001.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, n° 2, p. 181–222, 2002.

DEWICK, P. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, v. 3, p. 187-310, 2009.

EICEMAN, G. A. Ion-mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, 21, 2002, 259-275.

HACHIMI, E. F., ALFAIZ, C., BENDRIS, A., CHERRAH., ALAOUI, K. Activité anti-inflammatoire de l'huile des graines de *Zizyphus lotus* (L.) **Desf. Phytothérapie**. In press, 2017.

ELIAS, L. M. **Bioprospeção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazonia**. Tese (Doutorado em Ciência). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2015.

FAO, Food Safety and Quality. Disponível em <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/details/en/c/1330/>. Acesso em 18 de agosto de 2021.

FONTES, Simone Silveira. **Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da Hidroxizina e obtenção do metabólito quirál e ativo Cetirizina**. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2013.

FREEMAN, E. M. **The seed-fungus of *Lolium temulentum* L: the Darnel**. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London*, v. 196, p.1-174, 1904.

GANGADEVI, V., MUTHUMARY, J. A novel endophytic Taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. **Appl Biochem Biotechnol**. 158(3):675-84, 2009.

GARCÍA, A., CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GERMAINE K., KEOGH E., GARCIA-CABELLOS, G., BORREMANS, B., LELIE, D., BARAC, T., OEYEN, L., VANGRONSVELD, J., MOORE, F. P., MOORE, E. R., CAMPBELL, C. D., RYAN, D., DOWLING, D. N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiol Ecol.** 48(1):109-18, 2004.

GHISALBA, O., MEYER, H. P. AND WOHLGEMUTH, R. Industrial biotransformation, Encyclopedia of Industrial Biotechnology. **Bioprocess, bioseparation, and cell technology**, 2010.

GIRI, A. D; VIKAS; GIRI; CHARU; SINGH; AJAY; WARD; OWEN; NARASU, M. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, 2019, 175-199.

GRAEDEL, T.E. **Handbook of Green Chemistry and Technology**, ed. Clark J. and Macquarrie D.J., Wiley, New York, 2002, pp. 56–61.

GVR, Grand View Research. Essential Oils Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Food & Beverages, Spa & Relaxation), By Product (Orange, Peppermint), By Sales Channel, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. EUA, 2020. Disponível em <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market#>. Acesso em 04 de novembro de 2021.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HENCH, P. S., KENDALL, E. C., SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. **Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic**, p. 97-104, 1949.

HENRY, L. K., THOMAS, S. T., WIDHALM, J. R., LYNCH, J. H., DAVIS, T. C., KESSLER, S. A., BOHLMANN, J., NOEL, J. P., Dudareva N. Contribution of isopentenyl phosphate to plant terpenoid metabolism. **Nature Plants**, v. 4, p. 721–729, 2018.

HILL, R. A., CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Products Reports**. v. 29, nº 7, p. 780–818, 2012.

HUANG, A. C., OSBOURN, A. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. **Pest Manag Sci.** 2019 Sep;75(9):2368-2377.

ICMBio. **Plano de manejo do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007.

INTHIMA, P., NAKANO, M., OTANI, M., NIKI, T., NISHIJIMA, T., KOSHIOKA, M., SUPAIBULWATANA, K. Overexpression of the gibberellin 20-oxidase gene from



Torenia fournieri resulted in modified trichome formation and terpenoid metabolites of *Artemisia annua* L. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 129, 223–236, 2017.

ITO K., ITO M., The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure-activity relationships. **J Nat Med.**, v. 67, n. 4, p. 833-7, 2013.

KABIR, A., CACCIAGRANO, F., TARTAGLIA, A., LIPSI, M., ULUSOY, H., LOCATELLI, M. Analysis of Monoterpenes and Monoterpenoids, v. 10, p. 1016, 2019.

KAMIRI, A., HADIAN, J., FARZANEH, M., KHADIVI-KHU, A. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus*. **Ind Crops Prod**, 2015; 65: 315–323.

KANDHASAMY, H., CHO, B., YU, S. K. Effect of olfactory stimulation of isomeric aroma compounds, (+)-limonene and terpinolene on human electroencephalographic activity. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, p. 561-566, 2015.

KRINGS U., BRAUER, B., RUDIGER K., BERGER, R. G. Biotransformation of  $\gamma$ -terpinene using *Stemphylium botryosum* (Wallroth) yields p-mentha-1,4-dien-9-ol, a novel odorous monoterpene. **Biocatalysis and Biotransformation**. 23. 457-463, 2009.

LEAL, S., PINO, N., STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J.R., ESCOBAR, P. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, 2013, 25, 512 - 519.

LEDWITCH, K., OGBURN, R., COX, J., GRAHAM, R., FRITZSCHE, A., GOSNELL, D., MANNING, T. Taxol: efficacy against oral squamous cell carcinoma. **Mini Rev Med Chem**, (4):509-21, 2013.

LI, J., SIDHU, R., FORD, E. The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia* . **J Ind Microbiol Biotech**, v. 20, 259–264, 1998.

LINDMARK-HENRIKSSON, M., ISAKSSON, D., SJÖDIN, K., HÖGBERG, H. E., VANEK, T., VALTEROVÁ, I. Transformation of alpha-pinene using *Picea abies* suspension culture. **J Nat Prod.**, 66(3):337-43, 2003.

LOURENÇO, Genira F. Importância econômica e industrial dos óleos essenciais. Disponível em: < <http://www.sabernarede.com.br> > Acesso em 16 ago. 2012.

MA, Y., ITO, Y. Chiral High-Speed Counter-Current Chromatography: Future Strategies for Chiral Selector Development. **Current Chromatography**, v.1(1), p. 69–80, 2014.

MACEDO, E.M.A. et al. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 49, n. 7, 2016.

MAMOLI, L., VERCELLONE, A. Biochemische Umwandlung von  $\Delta^4$ -Androstendion in  $\Delta^4$ -Testosteron. **European Chemical Societies Publishing**, v. 70, p. 470-471, 1937.

MAN, A., SANTACROCE, L., JACOB R., MARE, A., MAN, L. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. **Pathogens**, 2019 Jan 28, 8(1):15.

MAROSTICA JUNIOR, M. R., PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 382-387, 2007.

MARTINS, C. M. **Estudo Químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análises do óleo essencial da espécie Kiekmeyera cariacea Mart. & Zucc (Pau-Santo) do cerrado**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, 2010, Dec. 15, 15(12):9252-87.

MONTANARI, R. M., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., SILVA, C. J., ANDRADE, N. J., ISMAIL, F. M. D., Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells, **Molecules**, v. 17, 9728–9740, 2012.

MUSSI-DIAS, V., ARAÚJO, A. C. O., SILVEIRA, S. F., ROCAABADO, J. M. A., ARAÚJO, K. L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2021). **PubChem** Compound Summary for CID 11463, Terpinolene. Retrieved December 15, 2021.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals (Basel)**, 2017 Nov. 2, 10(4):86.

NELSON, D. R., STROBEL, H. W. Secondary Structure Prediction of 52 Membrane Bound Cytochromes P450 Shows a Strong Structural Similarity to P450cam. **Biochemistry**, v. 28, p. 656-660, 1989.

NISA, H., KAMILI, A. N., NAWCHOO, I. A., SHAFI, S., SHAMEEM, N., BANDH, SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microb Pathog.** v. 82, n. 50, 2015.

NOMA, Y; Asakawa Y., 3.19 - Biotransformation of Monoterpenoids, Editor(s): Hung-Wen (Ben) Liu, Lew Mander, **Comprehensive Natural Products II**, Elsevier, 2010, Pages 669-801.

OLIVEIRA, C. E. L., **Determinação de grandezas termodinâmicas de compostos terpênicos presentes em óleos essenciais por cromatografia gasosa e proposição de modelo de contribuição de grupos para estimação de entalpias**

**de vaporização.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2017.

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

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PANDEETI, E. V. P., VEERAIHAH, S., ROUTHU, G. D. **Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms.** Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry, Academic Press, 2019.

PATIL, J., JAYAPRAKASHA, G. K., CHIDAMBARA, M. K. N., CHINDAMBARA, M., SHANE, E., TICHY, M., CHETTI, B. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chemistry**. 2009 Jun;114(4):1351-1358.

PAUL, P. E. V; SANGEETHA, V; DEEPIKA, R. G. Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. **Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry**, 2019,107–125.

PAVANELLI, S.P. **Degradação de Corantes da Indústria Alimentícia por Processos Oxidativos e Redutivos:** Monitoramento por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte-MG, 2010.

PAVELA, R., MAGGI, F., CIANFAGLIONE, K., CANALE, A., BENELLI, G. Promising insecticidal efficacy of the essential oils from the halophyte *Echinophora spinosa* (Apiaceae) growing in Corsica Island, France. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 1–11, 2019.

PEDROSA, F. C.. **Cromatografia gasosa aplicada em estudos de metabolômica.** 2018. 37 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, Ouro Preto, 2018.

PEIXOTO, P.A.S., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p.62-76, 2002.

PERGOLIZZI, J. V; TAYLOR, R; LEQUANG, J. A; RAFFA, R.B. The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products. **J Clin Pharm Ther.** 2018 Jun;43(3):313-319.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 1871-1872, 1952.

PIMENTEL, I., KUCZKOWSKI, F. C., AUER, M., ALBINO, J. C. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v.36, n.1, p.123-8, 2006.

PONTIN, M., BOTTINI, R., BURBA, J. L. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*, **Phytochemistry**, 115, 152–160, 2015.

POVH, F. P., RODRIGUES, V. M., MEIRELES, M. A. A., PINHEIRO, N. Determinação da pressão de vapor de compostos orgânicos por cromatografia gasosa. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, pp. 465-474, 2006.

PRESUTTI, T. R. **Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em tandem no diagnóstico da deficiência de 3 $\beta$ -hidroxidesidrogenase**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2017.

REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**. 289(5486):1920-1, 2000.

RICO-MARTINEZ, M.; MEDINA, F.G.; MARRERO, J.G.; OSEGUEDA-ROBLES, S. Biotransformation of diterpenes. **RSC Advances**, v.4, n.21, p.10627-10647, 2014.

SADGROVE, N.; JONES, G. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. **Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 48-102, 2015.

SAIKKONEN K., WÄLI P., HELANDER, M., FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Sci**. v. 6, p. 275-80, 2004.

SANTOS, A.S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico n.º 99**. Belém: Embrapa, 2004. 6p.

SARJONO, P; ISMIYARTO, I; NGADIWIYANA, N.P; NOR, R; ARIESTIANI, B; KUSUMA, B; DARMASTUTI, N. R. J. Antioxidant activity from limonene encapsulated by chitosan. IOP Conference Series: **Materials Science and Engineering**, 2019.

SCAVO, A., RESTUCCIA, A., MAUROMICALE, G. Allelopathy: Principles and basic aspects for Agroecosystem control. In: Gaba, S., Smith, B., Lichtfouse, E. (Eds.), **Sustainable Agriculture Reviews**. 28. Springer, Cham, p. 47–101, 2018.

SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol**, 23(4):193-198, 2005.

SEYYEDNEJAD, S. M., KOOCHAK, H., NAJAFABADE, F. P., KOLAH, M. Allelopathic effect of aquatic hull extract of rice (*Oryza sativa* L.) on growth of *Silybum marianum* and *Echinochloa crus-galli*. Afr. **J. Agric. Res.** v. 5 (16), 2222–2226, 2010.

SHAFAGHA, A., SHAFAGHATLONBAR, M. Antimicrobial activity and chemical constituents of the essential oils from flower, leaf and stem of *Gypsophila bicolor* from Iran. **Nat. Prod. Commun.** 6 (2), 275–276, 2011.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla: estudos dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares.** 205. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, D. G. Isolamento e caracterização do óleo essencial de *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (erva cidreira) e investigação da atividade biológica, 2008. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SILVA, D. G. **Isolamento e caracterização do óleo essencial de *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (erva cidreira) e investigação da atividade biológica.** 2008. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J., BRYCE, D. L. Mass spectra of chemical compounds, In., *Spectrometric identification of organic compounds.* **Wiley**, p. 464, 2005.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica.** 8. ed. Grupo Editorial Norma, 2006.

SMITH, R. V., ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 551-558, 1974.

SOUTHWELL, I. A., RUSSELL, M. F. Volatile oil comparison of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. **Phytochemistry** 2002; 59: 391–393.

SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. D. L., ASTOLFI, S., PINHEIRO, M. L. B., SAQUIZ, M. I. M., PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, 2004.

SOUNDHARARAJAN, K. C., HAEMEB, Y., KIM, S. Effect of olfactory stimulation of isomeric aroma compounds, (+)-limonene and terpinolene on human electroencephalographic activity. **European Journal of Integrative Medicine**. p. 561–566, 2015.

STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**. v. 9, n. 260 p. 214-6, 2013.

STOUDT, T. H. The microbiological transformation of steroids. **Advances in Applied Microbiology**, v. 2, p. 183-222, 1960.

- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed. Porto Alegre; Artmed, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, RS, 2009.
- TATHE, A. N.; MANGESH, A. G. Biocatalysis: A Brief Review. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 4, n. 1355, 2011.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.
- TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **ACS Med Chem Lett**. 2017 Apr 18, 8(5):476-480.
- TURKEZ, H., AYDIN, E., GEYIKOGLU, F., CETIN, D. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro, **Cytotechnology**, v. 67, 409–418, 2015.
- UNITED STATES. **US Code of Federal Regulations**. 1985. Food and Drug Administration, Washington, D.C. v. 7, n. 6, p. 561-566, 2015.
- VESPERMANN, K. A.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C.; PESSÔA, M. G.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805-1817, 2017.
- VIANA, M. D. M., CARDOSO, R. M., SILVA, N. K. G. T., FALCÃO, M. A. P., VIEIRA, A. C. S., MOREIRA, M. S., CAMPESATTO, E. A. Anxiolytic-like effect of Citrus limon (L.) Burm f. essential oil inhalation on mice. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 96-104, 2016.
- VIEGAS, J. R. C., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, Apr. 2006.
- Vincenti, M; Horning, S.R; Cooks, R.G. Energetics of retro-Diels–Alder fragmentation in limonene as characterized by surface-induced dissociation, and energy- and angle-resolved mass spectrometry. **Org. Mass Spectrom.**, 2019.
- VINCENTI, M; HORNING, S.R; COOKS, R.G. Energetics of retro-Diels–Alder fragmentation in limonene as characterized by surface-induced dissociation, and energy- and angle-resolved mass spectrometry. **Org. Mass Spectrom**, 1988, 23: 585-593.
- WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc**. 93(9):2325-7, 1971.
- YU, D., WANG, J., SHAO, X., XU, F., WANG, H., SHAO, C. X. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*, **J. Appl. Microbiol.**, 119, 1253–1262, 2015.

YU, T. W., BAI, L., CLADE, D., HOFFMANN, D., TOELZER, S., TRINH, K. Q., XU, J., MOSS, S. J., LEISTNER, E., FLOSS, H. G. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. **Proc Natl Acad Sci.** v. 99, n. 12, p. 7968-73, 2002.