



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
Professor Aloísio Teixeira



JAQUELINE FIGUEREDO NERIS

Biotransformação Fúngica De Monoterpenos: Procedimentos, Análise e  
Caracterização – Revisão de Escopo

MACAÉ  
2021

JAQUELINE FIGUEREDO NERIS

BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA DE MONOTERPENOS: PROCEDIMENTOS,  
ANÁLISE E ISOLAMENTO.

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 farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barth

MACAÉ  
2021

## CIP - Catalogação na Publicação

FN446b Figueredo Neris, Jaqueline  
Biotransformação Fúngica De Monoterpenos:  
Procedimentos, Análise e Caracterização - Revisão de  
Escopo / Jaqueline Figueredo Neris. -- Rio de  
Janeiro, 2022.  
49 f.

Orientador: Thiago Barth.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia,  
2022.

1. Biotecnologia. 2. Biotransformação. 3. Fungos.  
4. Monoterpenos. I. Barth, Thiago , orient. II.  
Título.

Jaqueline Figueredo Neris

BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA DE MONOTERPENOS: PROCEDIMENTOS,  
ANÁLISE E ISOLAMENTO.

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do  
título de farmacêutico.

Macaé, 14 de fevereiro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Daniela B. Gurpilhares (Presidente da Banca)  
UFRJ/Campus Macaé  
<http://lattes.cnpq.br/1620649796215912>

Prof. Dr. Denise O. Guimarães  
UFRJ/Campus Macaé  
<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Biossíntese de IPP .....   | 13 |
| <b>Figura 2.</b> Exemplos de estruturas moleculares das variações estruturais de terpenos.....  | 14 |
| <b>Figura 3.</b> Gráfico com o percentual das condições de biotransformação encontradas nos artigos científicos.....                            | 36 |
| <b>Figura 4.</b> Percentual de uso dos diferentes meios de cultura.....   | 37 |
| <b>Figura 5.</b> Gráfico com as temperaturas utilizadas nos procedimentos de biotransformação.....  | 38 |
| <b>Figura 6.</b> Gráfico com a distribuição percentual de solventes empregados na extração de produtos de biotransformação de monoterpenos..... | 41 |
| <b>Figura 7.</b> Distribuição percentual dos métodos cromatográficos empregados na separação dos produtos de biotransformação.....              | 46 |
| <b>Figura 8.</b> Gráfico com a distribuição de técnicas empregados na caracterização e análise estrutural dos produtos de biotransformação..... | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação.....   | 30 |
| <b>Tabela 2.</b> Condições experimentais empregadas nos procedimentos analíticos.<br>..... | 39 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1.</b> Exemplos de reações de biotransformação realizadas por fungos..... | 18 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIÇÕES

|                |  |
|----------------|--|
| <b>Ac-CoA</b>  | acetilcoenzima a   |
| <b>CG</b>      | cromatografia gasosa   |
| <b>CG-DIC</b>  | cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama              |
| <b>CG-EM</b>   | cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas                     |
| <b>CCD</b>     | cromatografia em camada delgada  |
| <b>CL</b>      | cromatografia líquida clássica   |
| <b>CLAE</b>    | cromatografia líquida de alta eficiência                                     |
| <b>CLAE-UV</b> | cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta |
| <b>DAMPP</b>   | dimetilalil-pirofosfato  |
| <b>DMAPP</b>   | difosfato dimetilalilo   |
| <b>ELL</b>     | extração líquido-líquido   |
| <b>FE</b>      | fase estacionária  |
| <b>FM</b>      | fase móvel   |
| <b>FPP</b>     | difosfato de farnesila   |
| <b>g/L</b>     | grama por litro  |
| <b>GFPP</b>    | geranilfarnesil difosfato  |
| <b>GGPP</b>    | difosfato de geranylgeraniol   |
| <b>GPP</b>     | difosfato de geranila  |
| <b>IPP</b>     | isopentenil pirofosfato  |
| <b>IV</b>      | infravermelho  |
| <b>UV-Vis</b>  | ultravioleta – visível   |
| <b>MEP</b>     | metileritritol   |
| <b>MVA</b>     | mevalonato   |
| <b>min</b>     | minuto   |
| <b>µg</b>      | micrograma   |
| <b>µm</b>      | micrômetro   |
| <b>µM</b>      | micromolar   |
| <b>µL</b>      | microlitro   |
| <b>EM</b>      | espectrometria de massas   |
| <b>nm</b>      | nanômetro  |
| <b>%</b>       | porcentagem  |
| <b>®</b>       | marca registrada   |
| <b>pH</b>      | potencial hidrogeniônico   |
| <b>PTs</b>     | preniltransferases   |
| <b>PYS</b>     | fitoeno sintase  |
| <b>SQS</b>     | sesquiterpenos   |
| <b>rpm</b>     | rotações por minuto  |
| <b>UV</b>      | ultravioleta   |
| <b>v/v</b>     | volume/volume  |



## RESUMO

Os terpenos são produtos naturais produzidos principalmente por plantas e são classificados de acordo com o número de carbonos (C) em: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e triterpenos (C30). Na indústria de cosméticos e alimentos, os monoterpenos, devido a sua maior volatilidade, são amplamente empregados como aromas e perfumes. Os monoterpenos podem ser obtidos através de procedimentos de extração a partir de óleos essenciais, pela síntese química ou por processos biotecnológicos: biocatálise e biotransformação. Os processos biotecnológicos, realizados por fungos, produzem derivados de monoterpenos que não são facilmente preparados por síntese química e são considerados “naturais”, equivalentes aos obtidos de fontes naturais. Devido a importância econômica e científica da área decidimos revisar os procedimentos biotecnológicos e analíticos empregados. Assim o objetivo foi realizar o levantamento bibliográfico de artigos científicos publicados no período de janeiro de 2010 a novembro de 2021 que apresentam a temática da biotransformação fúngica de monoterpenos. Foram conduzidas buscas de artigos disponíveis nas bases de dados: Scopus, Science Direct e Scielo; utilizando os descritores: “fungi”, “biotransformation” e “monoterpene”, publicados durante o período de janeiro de 2010 a novembro de 2021. A etapa de seleção dos artigos foi dividida em duas: aquisição e extração. Na etapa de aquisição foram respeitados critérios de exclusão e de inclusão. Foram excluídos artigos de revisão, artigos que contêm outro microrganismo que não fungo e artigos que empregam enzima isolada na biotransformação, além de duplicidades. Os trabalhos selecionados na etapa de aquisição foram lidos na íntegra e a partir disso foram extraídos os dados de interesse: Autor; Monoterpeno; Fungo; Produtos de biotransformação; Procedimento de biotransformação; Condições empregadas no processo de biotransformação, na extração, análise e caracterização estrutural. Ao aplicar os descritores e os filtros de artigos originais publicados no período de janeiro de 2010 a novembro de 2021, retornaram 67 artigos na Science Direct, 24 no Scopus e 1 no Scielo. No entanto, ao aplicar a etapa de aquisição, restaram apenas 14 artigos. Entre estes artigos 86% deles realizaram a biotransformação sob agitação, em *Erlenmeyers*. A maioria dos trabalhos empregou temperaturas na faixa de 25 a 30 °C. Com relação ao meio de cultura 11 artigos empregaram algum açúcar, como fonte de

carbono, em sua composição. O percentual de artigos que utilizaram meio sintético foi de 7%, mineral 21% e complexo 72%. Com relação aos dados analíticos, a extração líquido-líquido foi a mais empregada e o solvente acetato de etila foi o mais utilizado em 64% dos trabalhos. A técnica cromatográfica de separação mais empregada foi a cromatografia gasosa (CG), correspondendo a 67% dos artigos. E por fim, a espectrometria de massas foi a técnica escolhida por 46% dos pesquisadores, na caracterização estrutural dos produtos de biotransformação. Os procedimentos de biotransformação empregaram principalmente condição de agitação, temperatura de 28 °C e meios de cultura complexos. Com relação a etapa analítica, a técnica de extração mais usada foi a extração líquido-líquido, a técnica de análise mais empregada foi a CG e como técnica para caracterização estrutural a espectrometria de massas.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, Cromatografia gasosa, Extração líquido-líquido, fungos, monoterpenos, Procedimento de biotransformação.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....  | 12 |
| 1.1 Terpenos .....  | 12 |
| 1.1.1 Monoterpenos .....  | 15 |
| 1.2 Biotransformação e Biocatálise.....   | 15 |
| 1.2.1 Emprego de fungos na biotransformação .....   | 17 |
| 1.2.2 Etapas e condições do processo de biotransformação.....   | 20 |
| 1.2.2.1 Tipos de meio de cultivo.....   | 20 |
| 1.2.2.2 Condição estática e de agitação .....   | 21 |
| 1.2.2.3 pH.....   | 21 |
| 1.2.2.4 Temperatura e Pressão.....  | 21 |
| 1.2.3 Metodologias para análise de produtos de biotransformação de monoterpenos.....                                | 22 |
| 1.2.3.1. Técnicas de preparo de amostras.....   | 22 |
| 1.2.3.2. Técnicas empregadas na separação e quantificação dos monoterpenos e seus produtos de biotransformação..... | 23 |
| 1.2.3.2.1 Técnicas cromatográficas .....  | 23 |
| 1.2.3.3 Técnicas empregadas na caracterização estrutural dos monoterpenos.....                                      | 25 |
| 1.2.3.3.2 Espectrometria de massas.....   | 25 |
| 1.3 Fragrâncias Naturais .....  | 26 |
| 2. Justificativa .....  | 28 |
| 3. Objetivos .....  | 29 |
| 3.1 Objetivo Geral .....  | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos .....   | 29 |
| 4. Metodologia.....   | 30 |
| 4.1. Seleção .....  | 30 |
| 4.1.1. Etapa I – aquisição.....   | 30 |
| 4.1.2. Etapa II – Extração.....   | 30 |
| 5. Resultados e discussão .....   | 31 |
| 5.1 Condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação.....   | 31 |
| 6. Conclusão .....  | 43 |
| 6. Referências .....  | 44 |

## 1. Introdução

### 1.1 Terpenos

Os terpenos são hidrocarbonetos orgânicos e representam o maior grupo de substâncias encontradas na natureza. São produzidos por vegetais, fungos e bactérias através do metabolismo secundário (SORVARIAB; HARTIKAINEN, 2021). Já foram descritas mais de 80.000 substâncias desta classe e possui uma ampla diversidade química e estrutural (CHRISTIANSON, 2017).

Os eucariotos, algumas bactérias gram-positivas e microrganismos do domínio *archaea* biossintetizam os terpenos preferencialmente pela via do mevalonato (MVA), enquanto bactérias gram-negativas, algas verdes e cianobactérias os produzem pela via do metileritritol (MEP) (SUSSMAN, 2010).

A MVA (Figura 1) se inicia pela condensação de moléculas de acetilcoenzima A (Ac-CoA) dando origem ao acetoacetil-CoA que se condensa com outra Ac-CoA dando origem ao 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Esse último sofre redução para converter-se em ácido mevalônico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriânico). Após esse processo, sofre fosforilação e descarboxilação e converte-se em isopentenil pirofosfato (IPP) que por fim através da isomerização produz a dimetilalil-pirofosfato (DAMPP) que é altamente reativa (TAIZ & ZEIGER, 2017; PYNE, *et. al.*, 2019).

Já a via do MEP (Figura 1, Adaptada) se inicia com a condensação de uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato resultando em 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP) através da enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS). Após essa etapa, a enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) realiza a catálise simultânea do rearranjo da molécula e reduz a DOXP em MEP (SUSSMAN, 2010).

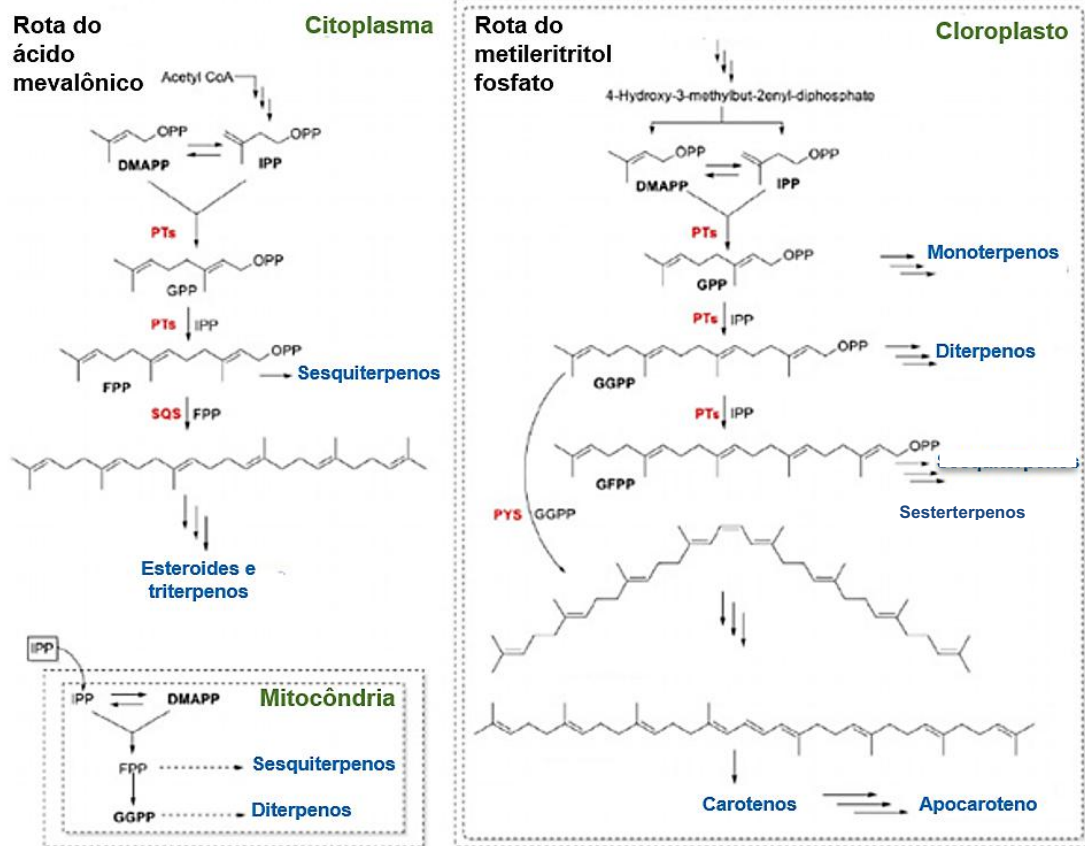


Figura 1, Adaptada. Biossíntese de IPP (difosfato de isopentenila) através de duas rotas sintéticas. À esquerda, a via do ácido mevalônico (MVA). À direita, a via do fosfato de metileritritol (MEP). **IPP**: difosfato de isopentenila; **DMAPP**: difosfato dimetilalilo; **GPP**: difosfato de geranila; **FPP**: difosfato de farnesila; **GGPP**, difosfato de geranilgeraniol; **GFPP**: geranilfarnesil difosfato; **PTs**: prenilttransferases; **PYS**: fitoeno sintase; **SQS**: sesquiterpenos. Fonte (HUANG; OSBOURN, 2019).

Os vegetais produzem esses metabólitos secundários com o intuito de atrair agentes polinizadores, além de combater pragas, como insetos e microrganismos (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). Nos animais e microrganismos essas substâncias possuem diversas propriedades, como: atividade reguladora em reações enzimáticas, estabilização das membranas celulares e de contribuição em algumas vias metabólicas (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006; BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009).

Os terpenos, de modo geral, são de grande relevância científica, porque possuem não só atividades biológicas, mas também possuem propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana (BUSTAMANTE et al., 2010), anticâncer (FERNANDES *et al.*, 2005) e antioxidante (GEESI, 2018). Além disso possuem propriedades benéficas na agricultura sendo utilizados tanto no

crescimento do vegetal, devido à produção de fito-reguladores, quanto no combate de doenças e pragas (AFZAL *et al.*, 2014).

Esses metabólitos possuem variações estruturais que são chamadas de: monoterpeno (possuem 10 carbonos na sua cadeia principal), sesquiterpeno (15 carbonos), diterpeno (20 carbonos), triterpeno (30 carbonos) (Figura 2) e terpenos superiores (acima de 30 carbonos) (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009). Devido ao baixo peso molecular dos monoterpenos e sesquiterpenos, ambos são amplamente voláteis e estão presentes nos óleos essenciais. São utilizados pelos vegetais como agentes repelentes, contra pragas e insetos, e como antibióticos contra microrganismos patogênicos. Já os diterpenos e os triterpenos têm um maior peso molecular e possuem função no crescimento e desenvolvimento do vegetal. Os diterpenos estão presentes numa classe de hormônios reguladores do crescimento vegetal e os triterpenos estão presentes nas membranas celulares estabilizando as interações entre os fosfolipídeos (TAIZ *et al.*, 2017).

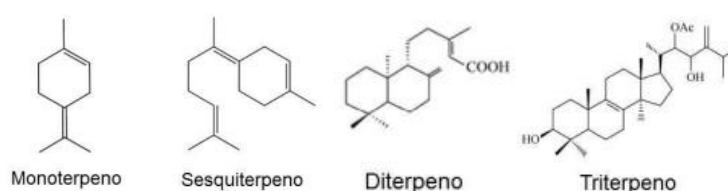


Figura 5. Exemplos de estruturas moleculares das variações estruturais de terpenos

Diversos são os processos de obtenção dos terpenos: extração de fontes vegetais, síntese química e por processo biotecnológico (MOLINA *et al.*, 2013). A extração de fontes vegetais, apesar de não gerar resíduos tóxicos, possui alto custo e rendimento reduzido (AKACHA; GARGOURI, 2015). O segundo, possui vantagem econômica e rápido tempo de produção, no entanto produz uma mistura racêmica com diferença sensorial e leva a produção de resíduos tóxicos. Já os processos biotecnológicos, são realizados, também, por microrganismos e produzem derivados de terpenos e compostos que não são facilmente preparados por métodos químicos, além de produzirem compostos considerados “naturais” (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009).

### **1.1.1 Monoterpenos**

Os monoterpenos são terpenos de baixo peso molecular, contendo apenas 10 carbonos na sua estrutura química. Por isso, são voláteis em temperatura ambiente e são encontrados na composição dos óleos essenciais e nos aromas das flores (NAWADE *et al.*, 2019).

As plantas metabolizam diversos monoterpenos com variadas estruturas moleculares que possuem aplicações nas áreas: cosmética, farmacêutica, alimentícia e até mesmo de biocombustíveis. No entanto, a produção agrícola desses monoterpenos é inviável devido à necessidade do local específico para plantação de cada espécie vegetal. A produção via síntese química, como já mencionado, traz diversas desvantagens, por isso a mais viável e vantajosa, assim como para outros terpenos, é a produção via biocatálise envolvendo microrganismos, como os fungos (LEI *et al.*, 2021).

Os monoterpenos também possuem diversas propriedades relevantes, como: potenciais inibidores do crescimento de diversas plantas e da germinação de sementes (ABRAHIM *et al.*, 2000). Além disso, também já foram relatadas outras atividades em diversos trabalhos como: potentes antimicrobianos (tanto para bactérias gram-positivas, quanto para gram-negativas) (SUN *et al.*, 2008), agentes citotóxicos, antimaláricos, antifúngicos, inseticidas e até mesmo como ingrediente de perfumes, aditivos alimentares e sabonetes (PRATES *et al.*, 1998).

## **1.2 Biotransformação e Biocatálise**

Para transformar substâncias em novos produtos é necessário realizar uma reação química. No intuito de aumentar esse processo, pode-se utilizar catalisadores que além de acelerarem essas reações, têm a vantagem de não serem consumidos durante o processo (SHELDON; WOODLEY, 2018). Ao utilizar esses catalisadores, o processo químico passa a ser chamada de catálise. Essas reações podem ser categorizadas em quimiocatálise que ocorre por meio de catalisadores químicos ou biocatálise quando ocorre por meio de microrganismos ou enzimas isoladas (CHOUDHARY *et al.*, 2021).

O número de processos quimiocatalíticos utilizados nas indústrias químicas e farmacêuticas ainda é alto devido aos rendimentos satisfatórios

apresentados por esse tipo de processo. No entanto, esse tipo de reação apresenta diversas desvantagens como: necessidade de equipamentos sofisticados, processos de purificação e refino, sistemas de controle e alto índice de poluição ambiental (CHOUDHARY et al., 2021).

Os processos biotecnológicos têm gerado grande notoriedade nos ramos científico, econômico e ambiental (VESPERMANN *et al.*, 2017). Dentre eles, a biotransformação é um processo favorável em diversos campos científicos, visto que possui especificidade régio e estereosseletiva, além de produzir resíduos com toxidez inferior aos processos químicos e ocorrer em condições mais amenas (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009). A biotransformação é uma reação química que ocorre através da catálise realizada por sistemas enzimáticos ou microrganismos num meio de enzimas purificadas, cultura de células ou sistema multifásico, onde são adicionados precursores a serem metabolizados (VESPERMANN *et al.*, 2017).

Para que haja o processo de biotransformação é necessário que ocorra a biocatálise de um precursor adequado que será modificado em um produto análogo a ele. Esse produto é recuperável e gerado a partir de reações consideradas simples, quimicamente definidas e biocatalisadas por microrganismos ou enzimas celulares. Para que o processo ocorra, é necessário que esses biocatalisadores sejam capazes de atuar em substâncias diferentes de seus substratos naturais (RAMOS, 2009).

A biotransformação acontece a partir da mistura de uma biomassa previamente cultivada e crescida, denominada de biocatalisador, com o substrato. Após realizada a mistura e exposta a um determinado tempo em condições de agitação, temperatura e pH, o substrato é transformado no produto desejado. A biotransformação pode ser realizada por biocatalisadores formados por sistemas enzimáticos ou por microrganismos inteiros como células livres, células imobilizadas ou sistemas multifásicos (MOLINA *et al.*, 2013). Os sistemas multifásicos são constituídos por uma fase aquosa, que contém o biocatalisador, e por uma fase orgânica contendo o substrato ou algum solvente orgânico que terá a função de reservatório para o produto e substrato. O processo de biotransformação ocorre na fase aquosa ou entre as duas fases. As vantagens desse método é que o produto é facilmente recuperado devido à



separação com o biocatalisador, além de o solvente e o biocatalisador poderem ser reutilizados. As desvantagens são: o solvente orgânico pode inibir a reação, causar danos ao biocatalisador caso haja interação com a membrana celular e até mesmo desnaturar as proteínas celulares (RAMOS, 2009).

A biotransformação faz parte da chamada “Química Verde” devido à sua menor produção de poluentes quando comparada à quimiocatálise. Além disso, a biotransformação, assim como toda reação biocatalítica, pode levar à obtenção de produtos enantiopuros podendo ser consideradas naturais, utilizando apenas catalisadores ecológicos como células e enzimas num meio aquoso com condições de temperatura e pH mais moderados. Ao final, os produtos, em sua maioria, são moléculas com alta atividade quimiorregioestereosseletiva e que possuem diversas funções nos ramos científico, farmacológico, agropecuário, entre outros (BIANCHINI *et al.*, 2015).

### **1.2.1 Emprego de fungos na biotransformação**

Devido às desvantagens das quimiocatálises como: alto custo, resíduos tóxicos e subprodutos indesejados, foi necessário pensar em alternativas menos custosas e tóxicas (CHOUDHARY *et al.*, 2021). Em 1952, a partir do trabalho científico de Peterson e Murray, os estudos de biotransformação empregando microrganismos, como fungos e bactérias receberam maior notoriedade. Esse estudo resultou na 11 $\alpha$ -hidroxilação da progesterona em apenas uma etapa utilizando como microrganismo o fungo *Rhizopus arrizus*. A partir desse ano até os dias atuais, é possível observar o grande potencial catalítico e os altos rendimentos gerados em biotransformações utilizando, principalmente, fungos (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009).

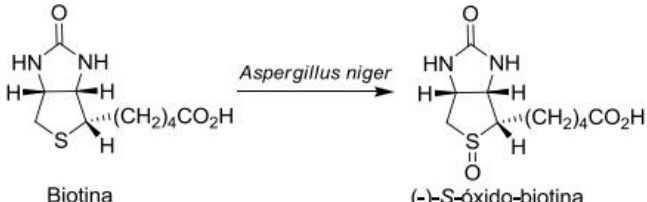
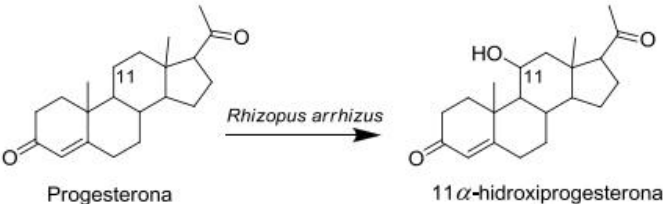
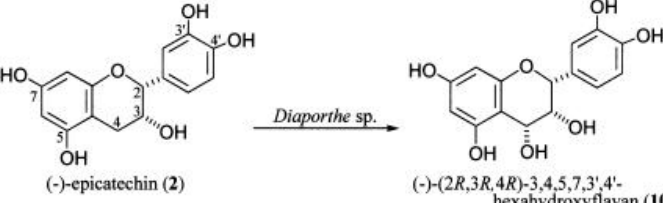
Os fungos são microrganismos capazes de se apresentar em forma unicelular, pluricelular ou leveduras e podem ser também filamentosos (SILVA *et al.*, 2005). No ecossistema, desempenham o papel de decompositores naturais. Podem ser patogênicos, mas também podem ser encontrados em diversos meios e organismos levando vantagens aos hospedeiros (CARDOSO *et al.*, 2010).

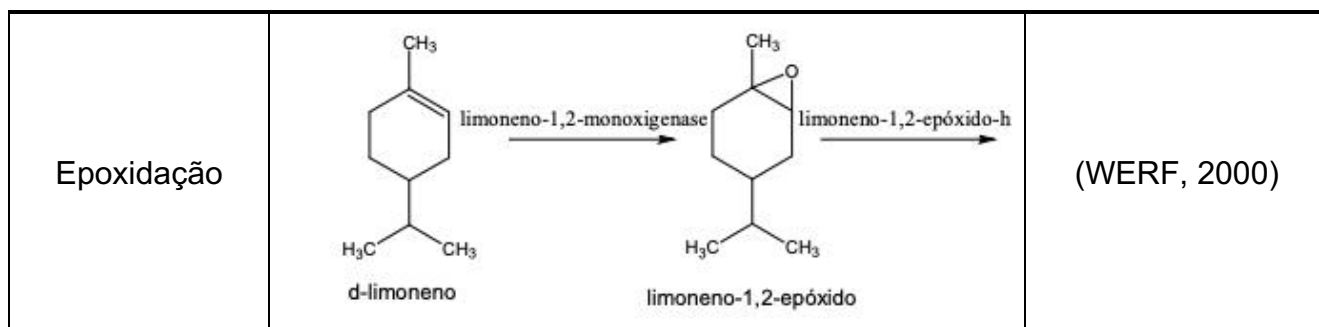
O metabolismo e a biotransformação são processos distintos desenvolvidos pelos microrganismos. O metabolismo possui duas etapas: o

metabolismo primário e o metabolismo secundário. O primário é responsável pela produção de biomassa e energia, além de funções celulares essenciais. O secundário é responsável pela adaptação do organismo às condições do meio em que vive, através da produção de metabólitos de massa molar baixa que é favorável ao seu crescimento, além de terem importância científica e industrial (RUIZ *et al.*, 2010; BRAKHAGE, 2013). A biotransformação, por sua vez, é também chamada de “metabolismo xenobiótico” por ser um processo que realiza modificações estruturais em substâncias exógenas, para que o microrganismo sobreviva na presença delas, através de sistemas de enzimas que levam à produtos de polaridade maior (PERVAIZ *et al.*, 2013).

As reações de biotransformação, realizados por fungos, descritas mais frequentemente na literatura são: oxidação, hidroxilação, hidroxilação estereosseletiva e epoxidação (Quadro 1) (BIANCHINI *et al.*, 2015). Esses processos são úteis para o desenvolvimento dos microrganismos e para que eles se adaptem ao ambiente. Além de serem de extrema valia para o desenvolvimento da biotecnologia (CREŠNAR; PETRIC, 2011).

**Quadro 1.** Exemplos de reações de biotransformação, realizados por fungos.

| Reação                        | Biotransformação fúngica   | Autor                         |
|-------------------------------|--|-------------------------------|
| Oxidação                      |  <p>Biotina</p> <p><i>Aspergillus niger</i></p> <p>(-)-S-óxido-biotina</p>   | (WRIGHT <i>et al.</i> , 1954) |
| Hidroxilação                  |  <p>Progesterona</p> <p><i>Rhizopus arrhizus</i></p> <p>11α-hidroxiprogesterona</p>                                | (PETERSON; MURRAY, 1952).     |
| Hidroxilação estereosseletiva |  <p>(-)-epicatechin (2)</p> <p><i>Diaporthe sp.</i></p> <p>(-)-(2R,3R,4R)-3,4,5,7,3',4'-hexahydroxyflavan (10)</p> | (AGUSTA <i>et al.</i> , 2005) |



As células dos fungos podem ser empregadas como biocatalisadores nos processos de biotransformação tanto na sua forma e estado original, quanto modificadas no intuito de gerar enzimas ou bens de consumo. Frente à disponibilidade desses microrganismos presentes na natureza, a quantidade de aplicações ainda é baixa, por isso o grande interesse da indústria e da ciência no emprego fungos na biotransformação (BORGES *et al.*, 2009).

Para realizar um processo de biotransformação é necessário ponderar algumas questões, entre elas o substrato a ser escolhido, isto é, as substâncias a serem biotransformadas e se irá utilizar a célula inteira (Biotransformação) ou apenas enzimas isoladas (biocatálise) (BIANCHINI *et al.*, 2015).

No campo científico, a utilização de enzimas individualizadas ainda é pouco empregada, já no campo industrial, enzimas imobilizadas são mais exploradas (HORMIGO *et al.*, 2010). Já quando se trata do emprego do microrganismo inteiro, os fungos são os mais aplicados nos processos de biotransformação (BORGES *et al.*, 2009; BIANCHINI *et al.*, 2015).

Ao comparar a utilização de enzimas *versus* a utilização de microrganismos inteiros, ambas, em condições ambientais, são capazes de catalisar a conversão enantio e estereosseletiva. Já a segunda é considerada mais vantajosa devido à presença de todos os cofatores, além de fornecer a quantidade ideal de enzimas e de níveis de energia (RESTAINO *et al.*, 2014).

Diante das vantagens apresentadas, a biotransformação utilizando biocatalisadores formados por microrganismos inteiros tem gerado grande notoriedade devido à essa técnica não necessitar de etapas de purificação de enzimas que é bastante propensa a interromper a estrutura proteica e com isso levar à perda da atividade enzimática, além de não ser necessária a etapa de isolamento da enzima (RUDROFF, *et al.*, 2018).

### **1.2.2 Etapas e condições do processo de biotransformação**

Os procedimentos de biotransformação envolvem muitas vezes três etapas: ativação do fungo, pré-cultivo e biotransformação propriamente dita. Para isso, é necessário que haja anteriormente o cultivo do fungo desejado para experimento. Nesta etapa, de biotransformação, o fungo pré-cultivado juntamente com o meio de cultura adequado e com a substância a ser biotransformada serão expostas a diversas condições como: agitação do meio ou não, pH, temperatura.

#### **1.2.2.1 Tipos de meio de cultivo**

O ramo da microbiologia desenvolveu e continua desenvolvendo diversos meios de culturas com diversos constituintes. Eles são divididos em: meios ricos que também são denominados de complexos ou completos, meio mineral, também chamado de pobre ou quimicamente definido e meio artificial como o czapek.

O meio complexo não tem uma composição muito definida, como no caso dos minerais. Nesse tipo de meio, há na sua composição componentes de produtos animais, vegetais ou microbianos, como por exemplo: extrato de levedura, de malte, de carne ou ágar. É um meio que fornece todos os nutrientes necessários para o metabolismo de fungos. O meio mineral ou quimicamente definido tem na sua composição quantidades de compostos precisos, ou seja, sua natureza quantitativa e qualitativa é conhecida. Esse tipo de meio é mais empregado no estudo de proliferação de microrganismos específicos que necessitam de estudos sobre suas demandas ambientais e nutricionais. Já o meio artificial, como o czapek, pode ser utilizado para cultivo de microrganismos que usam como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio (MADIGAN *et al.*, 2016). Para que se obtenha resultados satisfatórios e com elevado grau de confiança, é necessário escolher um meio de cultura que tenha interferência mínima no processo de biotransformação. Portanto, o meio de cultura deve ser o mais favorável para formar os metabólitos e o que menos interfere na análise cromatográfica posterior (SORRENTINO, 2019).

### **1.2.2.2 Condição estática e de agitação**

Reações biocatalíticas ocorridas em condições aeróbicas são as que possuem maior destaque na indústria. No entanto, o oxigênio não é um gás tão solúvel e os solutos presentes no meio de cultivo podem piorar ainda mais essa solubilidade, por isso uma das formas de aerar o meio da biotransformação é através de um sistema de agitação. A agitação também tem como objetivo a manutenção da homogeneidade dos solutos e substratos presentes no meio de cultivo, bem como manter os sólidos em suspensão, dispersar os gases formados pelo processo da biotransformação e a transferência de calor (BASTOS, 2010).

Além disso, com relação à agitação ou não do meio, segundo Sorrentino (2019), a melhor condição de biotransformação é através da agitação do meio, visto que quando o meio se encontra estático não há um desenvolvimento adequado de metabólitos resultantes.

### **1.2.2.3 pH**

O pH é um fator muito importante visto que interfere na estabilidade dos grupos ionizáveis das enzimas dos microrganismos, podendo afetar a estrutura molecular tridimensional e o sítio alvo das enzimas. Esse fator quando se encontra na faixa adequada favorece que o sítio alvo esteja na estrutura química ideal para que haja a interação correta com o substrato. As enzimas, sejam elas do microrganismo inteiro ou quando são utilizadas de forma isolada na biotransformação, tem uma faixa ideal limitada de pH ou um valor ótimo para estarem ativas e estáveis. Portanto, é necessário que haja um estudo prévio do biocatalisador que será utilizado, para que fatores como o pH esteja na faixa correta e não comprometa o processo de biotransformação (BASTOS, 2010).

### **1.2.2.4 Temperatura e Pressão**

Os biocatalisadores podem ser inativados ao sofrerem uma desnaturação. Na maioria das vezes é irreversível e com isso ocorre a perda total desse catalisador. A temperatura é crucial no estado funcional das enzimas e conseqüentemente dos microrganismos e enzimas isoladas utilizados como biocatalisadores. Esse fator pode interferir desde o estado dos

grupos funcionais que participam do processo de biotransformação até a disponibilidade do oxigênio no meio (BASTOS, 2010).

As reações enzimáticas têm influência da temperatura bem como a maioria das reações químicas. Isto é, a velocidade da reação aumenta conforme aumento da temperatura. Todavia, há um limite nesse aumento, visto que cada enzima tem uma faixa ideal de estabilidade para que haja atividade. A maioria das enzimas tem uma sensibilidade térmica na faixa dos 50 °C sofrendo rápida desnaturação ao ultrapassar essa temperatura e apresentam a temperatura ótima de atividade e ativação na faixa de 30 a 40 °C (variando pouco para menos e para mais) (BASTOS, 2010).

Para estocagem de microrganismos inteiros ou das suas enzimas isoladas, sugere-se o uso de baixas temperaturas para conservá-los e reutilizá-los novamente (BASTOS, 2010).

Com relação ao fator pressão, essa condição também está relacionada com o processo ideal de biotransformação. Ao ser exposto a uma pressão elevada, o microrganismo e as enzimas podem ser afetados prejudicando assim a formação do produto de biotransformação (BASTOS, 2010).

### **1.2.3 Metodologias para análise de produtos de biotransformação de monoterpenos**

Os estudos de biotransformação são conduzidos em matrizes biológicas complexas, quer seja originária de um meio de cultura complexo ou de componentes fúngicos. Assim, antes da realização da etapa analítica para quantificação e identificação dos produtos de biotransformação é necessário o emprego de uma técnica de preparo de amostras. Após extração, a fim de identificar e quantificar os produtos de uma reação são utilizadas diversas metodologias analíticas. Dentre elas encontram-se as técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Para a caracterização estrutural vem sendo empregadas as técnicas espectroscópicas como RMN, UV-Vis e a espectrometria de massas.

#### **1.2.3.1. Técnicas de preparo de amostras**

A teoria da extração líquido-líquido (ELL) baseia-se na partição ou distribuição de um composto que possui diferente solubilidade e está presente

entre duas fases ou líquidos imiscíveis. Sendo uma dessas fases um solvente orgânico e a outra aquosa. No processo de extração o composto que tem característica apolar terá preferência pela fase que contém o solvente orgânico, bem como o polar terá preferência pela fase aquosa.

A ELL é também denominada de extração por partição ou por solvente. Essa técnica aplica-se no processo de obtenção de amostras solúveis ou líquidas. Suas vantagens principais são: simplicidade, por ser realizada em apenas uma etapa, facilidade de usar vários solventes que aumentam a faixa de solubilidade da extração, além de ser econômica e possível de ser aplicada em diversas áreas como na análise de fármacos e alimentos, por exemplo (BARTH *et al.*, 2014).

### **1.2.3.2. Técnicas empregadas na separação e quantificação dos monoterpenos e seus produtos de biotransformação**

#### **1.2.3.2.1 Técnicas cromatográficas**

As técnicas cromatográficas têm papel fundamental na avaliação dos resultados de estudos de biotransformação. As técnicas cromatográficas apresentam-se em diferentes formatos e podem ser classificadas com base na forma física do sistema cromatográfico em cromatografia planar e em coluna. Na cromatografia planar a fase estacionária (FE) é disposta sobre uma superfície plana, enquanto na cromatografia em coluna ela é acondicionada em um tubo cilíndrico. Em ambas, a fase móvel (FM) é um líquido. A cromatografia planar pode ser realizada em papel ou em placa recoberta pela FE (sólida ou quimicamente ligada), conhecida como cromatografia em camada delgada (CCD). Na cromatografia em coluna o estado físico da FM pode ser um gás (cromatografia gasosa, CG) ou um líquido (cromatografia líquida (CL). A CL em coluna inclui dois grupos: a técnica desenvolvida em coluna de vidro aberta, sob pressão atmosférica, também conhecida por CL clássica e a técnica pressurizada/automatizada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No caso da cromatografia gasosa (CG), a amostra, que deve possuir alta volatilidade ou ser volatilizável e ser resistente a temperaturas de até 400 °C, é introduzida na coluna onde será separada, com base na interação com a fase

estacionária e volatilidade. Ao final os componentes vaporizados são detectados e quantificados no detector (SUCHARA, 2007). A partir desta técnica, substâncias volatilizáveis e gases podem ser separados. Os principais gases de arraste são: hélio, hidrogênio e nitrogênio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Para detecção das substâncias separadas pelo CG, pode-se acoplar a espectrometria de massas (CG-EM) ou detectores de ionização em chamas (CG-DIC). O CG-EM é a técnica mais escolhida para identificação de substâncias voláteis enquanto a CG-DIC é empregada preferencialmente em quantificações (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

O detector por ionização de Chama (DIC) é considerado um método barato e de fácil manutenção. O DIC utiliza uma chama de ar/hidrogênio na qual durante a passagem da amostra suas moléculas orgânicas se oxidam produzindo íons. Esses íons produzem um sinal elétrico que é analisado e convertido a um pico cromatográfico (ZUAS; MULYANA; BUDIMAN, 2016). Diferente da CG, na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) as amostras devem estar no estado líquido e não precisam ser voláteis para serem quantificadas e identificadas. O que deve ser analisado nesse tipo de técnica é a solubilidade da amostra na fase móvel (RAMOS, 2014). Isto é, os analitos são separados através de sua migração diferencial entre a fase estacionária e a fase móvel. As substâncias menos solúveis na fase móvel ficam mais retidas na fase estacionária e apresentam um tempo de retenção superior quando comparadas àquelas mais solúveis na fase móvel, quem apresentam menores tempos de retenção (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Há também a cromatografia em camada delgada (CCD) que pode ser usada tanto para quantificar quanto para qualificar. É uma técnica versátil e pode ser utilizada para analisar diversas classes de substâncias. A fase estacionária é constituída por um material fino e adsorvente, geralmente gel de sílica. Em uma das extremidades aplica-se a amostra na CCD depois posiciona-se a placa na posição vertical dentro de uma câmara fechada com a fase móvel que é constituída por um solvente orgânico. Esse solvente migra através da placa em direção ao topo por meio de forças capilares. Os componentes da amostra atingem distâncias variáveis até a fase móvel atingir o topo e a placa é então retirada da câmara para leitura dos pontos que são os



analitos separados e o fator de retardamento é por fim avaliado (ROCHA *et al.*, 2020).

### **1.2.3.3 Técnicas empregadas na caracterização estrutural dos monoterpenos**

#### **1.2.3.3.1. Técnicas espectroscópicas**

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica de alto potencial. Esta metodologia identifica número de núcleos atômicos que possuem propriedades magnéticas e momento angular de spin, isto é, que possuam número atômico e/ou massa ímpares. Nessa técnica é possível estudar diversos núcleos, mas os mais comuns são o hidrogênio e o carbono (SOUZA, 2019).

A espectroscopia na região ultravioleta-visível (UV-VIS) e consiste na medida de absorção da radiação eletromagnética da região espectral do ultravioleta e visível. É uma técnica antiga usada para quantificar e qualificar diversas classes de constituintes de uma amostra. No entanto, devido às bandas de absorção, muitas vezes, apresentarem de forma espaçada e sobreposta, limita o uso da técnica para fins de caracterização estrutural (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Já a espectroscopia de infravermelho (IV) avalia a absorção das substâncias da radiação na região do infravermelho. Assim como as outras ela também pode ser utilizada para qualificar uma amostra a ser investigada. É uma técnica muito importante em diversas áreas, inclusive na área da química de produtos naturais.

#### **1.2.3.3.2 Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas que é uma técnica analítica que permite tanto a quantificação quanto a qualificação, ou seja, a caracterização da molécula. Essa técnica permite a análise dos átomos e moléculas a partir da razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons presentes em amostras desconhecidas quando estão no estado gasoso. Por isso que ela é amplamente acoplada à cromatografia gasosa. O resultado da análise gera um espectro de massas e a partir da leitura correta dos espectros dos íons é possível sugerir sua estrutura química (VESSECCHI *et al.*, 2011).

### 1.3 Fragrâncias Naturais

Fragrâncias, aromas ou odorantes, são compostos químicos que possuem como propriedade a produção de cheiro. Devido à volatilização de alguns constituintes químicos ocorre a produção desses compostos aromáticos (KAUR *et al*, 2018).

A fragrância é utilizada em diversos artigos de consumo, como perfume, sabão, hidratante, especiarias, vinho, entre outros. O aroma empregado nesses itens leva ao consumidor uma sensação de bem-estar e prazer (KUMAR; GANDHI, 2016).

Essas substâncias que produzem aroma, podem ser classificadas em artificial, idênticos à natureza ou natural, a depender da sua origem. Os artificiais são aqueles que não são identificados em nenhuma origem natural e que foram produzidos de origem química, como exemplo: o fixolide. Os idênticos à natureza são quimicamente análogos aos naturais, com aroma muito semelhante aos encontrados na natureza, no entanto são produzidos em meios químicos, como exemplo o acetaldeído (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015). Já os naturais são os originados da natureza, seja por meios físicos ou através da biotecnologia, como exemplo: o geraniol (KUMAR; GANDHI, 2016).

Os terpenos podem ter aplicação como sabor e fragrância a depender da configuração absoluta do composto, já que os enantiômeros apresentam diversas propriedades sensoriais. Há séculos, plantas e ervas que contêm terpenoides com essas propriedades têm sido usados pelo homem tanto na área cosmética e alimentícia, quanto na aromaterapia. A biotransformação também produz, sob condições ideais, fragrâncias e aromas enantiomericamente puros (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006).

A produção desses terpenos pelas plantas ocorre para proteção. Suas estruturas químicas podem ser cíclicas (exemplos: mentol e eucaliptol) ou podem ser lineares (exemplos: geraniol e citral). Os diferentes odores presentes nas fragrâncias ocorrem devido ao grupo funcional que compõe cada molécula aromatizante. Com isso, classifica-se cada molécula de acordo com o seu grupo funcional, dentre eles: terpenos, ésteres e álcoois. Uma simples alteração na estrutura molecular já é suficiente para alterar o aroma da molécula (KUMAR; GANDHI, 2016).

Além das propriedades cosméticas e alimentícias, as fragrâncias possuem atividades farmacológicas e são aplicadas na aromaterapia através dos óleos essenciais, por isso são amplamente estudadas. Em uma pesquisa recente, publicada em janeiro de 2021, Oshima e Ito relataram uma atividade sedativa de alguns óleos essenciais e monoterpenos que estão presentes em fragrâncias, constatando que o próprio aroma tem efeito sedativo. Eles utilizaram quatro componentes de uma fragrância (l-mentol, d-cânfora, álcool feniletílico e geraniol) por via inalatória em camundongos. Através de um teste de campo aberto a atividade sedativa foi avaliada e os resultados foram bastantes promissores, evidenciando uma ação sedativa, dependente da dose, por todos os componentes utilizados.

## **2. Justificativa**

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.

O uso de fungos em reações de biotransformações, apresenta vantagens, como menores custos de produção e baixa complexidade experimental (GIRI, *et. al.*, 2001).

Mesmo apresentando uma reduzida complexidade experimental, existe uma diversidade de condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação por fungos que justificam a necessidade de revisar a literatura observando as condições mais empregadas nestes procedimentos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo geral realizar levantamento bibliográfico de artigos científicos publicados no período de janeiro de 2010 a novembro de 2021 que apresentam a temática da biotransformação fúngica de monoterpenos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Apresentar as condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação;
- Apresentar as condições analíticas empregadas na extração, análise e caracterização estrutural dos produtos de biotransformação formados.

## **4. Metodologia**

O levantamento bibliográfico foi realizado seguindo critérios de exclusão e de inclusão. Os trabalhos selecionados foram aqueles cujo objetivo do artigo fosse a biotransformação de monoterpenos por fungos. Já os excluídos foram: artigos de revisão, artigos que contêm outro microrganismo que não fungo e artigos que empregam enzima isolada na biotransformação.

Sabendo-se quais são os artigos relacionados ao critério de exclusão e inclusão, foram realizadas as etapas de seleção e classificação.

### **4.1. Seleção**

A etapa de seleção foi dividida em duas: aquisição e extração.

#### **4.1.1. Etapa I – aquisição**

Nessa etapa foram conduzidas a busca dos artigos nas bases de dados: Scopus, Science Direct e Scielo; utilizando as seguintes descritores: “fungi”, “biotransformation” e “monoterpene”. Durante o período de janeiro de 2010 a novembro de 2021. Todos os resumos foram lidos para avaliar se estão dentro dos critérios de inclusão. Estes artigos foram inspecionados em um gerenciador de referência Endnote para verificação das duplicidades e adequação correta das informações dos autores.

#### **4.1.2. Etapa II – Extração**

Nessa etapa os artigos selecionados na etapa I, foram lidos na íntegra e a partir disso foram extraídos os dados de interesse: Autor; Monoterpeno; Fungo; Produtos de biotransformação; Procedimento de biotransformação; Condições metodológicas empregadas na biotransformação e Condições experimentais empregadas na extração, análise e caracterização estrutural.

## **5. Resultados e discussão**

Ao aplicar na base de dados as palavras-chaves “fungi”, “biotransformation” e “monoterpene” e os filtros de artigos originais publicados no período de janeiro de 2010 a novembro de 2021, foram encontrados 71 artigos no Science Direct, 16 no Scopus e 1 no Scielo.

Na inspeção de duplicidades, o único artigo (RAMOS *et al.*, 2015.) selecionado no Scielo estava duplicado no Scopus. Dos 6 artigos selecionados no Scopus, 3 (MEI *et al.*, 2021; DARAMWAR KIRAN *et al.*, 2012; CECATI *et al.*, 2017.) estavam presentes também no Science direct.

Ao realizar a etapa de extração, na qual foi feita a leitura dos resumos para excluir aqueles que contêm outro microrganismo que não fungo e artigos que empregam enzima isolada na biotransformação, o número de artigos diminuiu consideravelmente. No Science Direct restaram apenas 7 artigos, no Scielo continuou tendo 1 artigo e no Scopus restaram 6 artigos.

Os dados analisados por este trabalho de revisão foram agrupados em duas tabelas. Na tabela 1 são apresentados os dados relativos ao procedimento de biotransformação e na tabela 2 apresentamos as condições experimentais empregadas na etapa analítica.

### **5.1 Condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação.**

Na tabela 1 são apresentados os dados relativos ao procedimento de biotransformação: monoterpene biotransformado, o(s) fungo(s) utilizados, os produtos gerados no processo de biotransformação, além das condições de biotransformação e meios de cultura empregados.

**Tabela 1:** Condições experimentais empregadas nos estudos de biotransformação.

| Autor                        | Monoterpeno (Substrato)                 | Fungos  | Produtos de biotransformação  | Condições de biotransformação                                 | Meio de cultura  |
|------------------------------|---|---|---|---|--|
| RAMOS <i>et al.</i> , 2015.  | 1,8-cineol                              | <i>Mucor ramannianus</i> ,<br><i>Aspergillus niger</i> ,<br><i>M. ramannianus</i>   | 2-exo-hidroxi-1,8-cineol<br>3-exo-hidroxi-1,8-cineol  | Erlenmeyer, sob agitação (150 rpm) por 5 dias a 30 °C         | 1% de glicose, 0,5% extrato de levedura, 0,5% peptona, 0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e 0,1% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.   |
| MEI <i>et al.</i> , 2021.    | β-Ionona, citral, γ-terpineno e mirceno | <i>Alternaria alternata</i>   | (2R,9S)-9-Hidroxi-3,7-megastigmadieno-5-o, (2R,9S)-9-Hidroxi-3,7-megastigmadieno-5-one, 5R-hidroxi-7,8-dihidro-β-ionona 4R-hidroxi-β-ionona | Erlenmeyer, sob agitação (180 rpm) 3 dias a 28 °C.            | Líquido de Batata e dextrose   |
| CECATI <i>et al.</i> , 2017. | <i>Eupatorium buniifolium</i>           | <i>Fusarium solani</i> ,<br><i>Alternaria alternata</i><br><i>Neofusicoccum sp.</i> | R-(+)-limoneno, α-(-)-pineno, α-(+)-pineno e sabineno   | Erlenmeyer, sob agitação (150 rpm) por 72h a 28 °C no escuro. | Meio líquido de Czapek   |
| LEE <i>et al.</i> , 2015a.   | α-pineno e geraniol                     | <i>Polyporus brumalis</i>   | α-terpineol e p-mentano-3, 8-diol   | Erlenmeyer, estático, a 28 °C por 5 dias                      | 1% de glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ), 0,02% de C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> , 0,01% de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05% de MgSO <sub>4</sub> e 0,01% de CaCl <sub>2</sub> . |



|                                 |   |  |   |   |  |
|---------------------------------|---|--|---|---|--|
| LEE <i>et al.</i> , 2015b.      | (-)- $\alpha$ -pineno                     | <i>Ceriporia sp.</i> ,<br><i>Stereum hirsutum</i>        | $\alpha$ -terpineol, mirtenol, cânfora e isopinocarveol   | Frascos de cultura, estático a 26 °C.                   | 1% glicose, 0,02% de tartarato de amônio, 0,2% de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01% de solução de oligoelementos, 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) |
| TRYTEK; FIEDUREK; GROMADA, 2016 | $\alpha$ -pineno                          | <i>Crisosporium pannorum</i>                             | verbenol e verbenona  | Erlenmeyer, sob agitação (200 rpm) a 20 °C.             | Meio líquido: extrato de malte 1%, peptona 0,5%, glicose 1% e extrato de levedura 0,5%.  |
| BIER; MEDEIROS; SOCCOL, 2017    | limoneno                                  | <i>Phomopsis sp</i>                                      | $\alpha$ -terpineol, carvona, limoneno-1,2-diol, terpinen-4-ol, mentol e carveol  | Erlenmeyer sob agitação.                                | O meio de extrato de laranja   |
| MOHAMMA <i>et al.</i> , 2018.   | timoquinona                               | <i>Aspergillus niger</i>                                 | 5-isopropil-2-metiloxepin-1-ona, 3-hidroxi-5-isopropil-2-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona e 5-isopropil-2-metilbenzeno-1,4-diol | Erlenmeyer, sob agitação (128 rpm). A 28 °C por 3 dias. | Meio líquido: água destilada 3,0L; glicose 60,0g; peptone 15,0g; extrato de levedura 15,0g; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 15,0g e NaCl 15,0g.   |
| MOLINA <i>et al.</i> , 2013.    | citronelol, limoneno, linalool e geraniol | <i>Penicillium sp.</i> , e <i>Aspergillus sp.</i>        | óxido de rosa (maior produto encontrado)  | Erlenmeyer, sob agitação (160 rpm). A 30 °C por 3 dias. | Meio líquido: glicose (1 g/L), extrato de malte (0,3 g/L), extrato de levedura (0,3g/L), peptona bacteriológica (0,5 g/L), e o pH não foi ajustado.  |
| KIRAN <i>et al.</i> , 2013.     | Isoforona, 1,8-cineol e cânfora           | <i>Alternaria alternativa</i> e <i>Neurospora crassa</i> | 4 $\alpha$ -hidroxi-isoforone   | Erlenmeyer, sob agitação.                               | Meio líquido: glicose (20g), polipeptona (5g), extrato de levedura (5g), cloreto de sódio (5g) e hidrogenofosfato dissódico (5g)   |

|                                   |   |  |   |  |  |
|-----------------------------------|---|--|---|--|--|
| NUNES <i>et al.</i> , 2013.       | enantiomeros de carvona                   | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> | Enone dihidrocarvona, p-mentano-2,8,9-triols e neodihidrocarveol  | Erlenmeyer, sob agitação (125 rpm). A 28 °C por 3 dias.        | Meio líquido: ágar dextrose de batata.   |
| BADEE;HELM Y; MORSY, 2011.        | d-limoneno                                | <i>Penicillium digitatum</i>   | α-terpineol   | Erlenmeyer, sob agitação (120 rpm). A 25 °C por 3 dias.        | Meio líquido: Caldo de levedura de malte: extrato de 2% de malte, 1% de glicose, 1% peptona bacteriológico, extrato de levedura de 0,3% e o pH de 6,1. |
| SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2012. | (4R)-(-)-carvona                          | Levedura de Baker  | (1R,4R)-dihidrocarvona  | Erlenmeyer, sob agitação.                                      | Meio líquido contendo solução tampão de fosfato/ácido cítrico de potássio  |
| DARAMWA <i>et al.</i> , 2012.     | (±)-lavandulol e (±)-tetrahidrolavandulol | <i>Rhizopus oryzae</i>   | 2-(3,3-dimetiloxiran-2-yl)-3-metilbut-3-en-1-ol 2-metil-5-(prop-1-en-2-yl)hex-2-ene-1,6-diol, 2-metil-5-(prop-1-en-2-yl)hexane-1,6-diol, 2-(3-metilbut-2-enyl)-3-metilenebutano-1,4-diol, 5-metil-2-(2-metiloxiran-2-yl)hex-4-en-1-ol | Erlenmeyer sob agitação (220 rpm). A 29-30 °C por 36h, pH 7,0. | Batata e dextrose.   |

Analisando os dados da tabela 1, observamos que entre os 14 artigos revisados 12 deles empregaram a condição de agitação e 2 deles utilizaram a condição estática no procedimento de biotransformação (Figura 3). Sorrentino (2019) afirma que a agitação favorece a formação de produtos de biotransformação e por isso é o método mais empregado. Bastos em 2010 explica que o resultado é melhorado devido à agitação influenciar positivamente a aeração do meio, visto que o oxigênio é um gás de baixa solubilidade, além de realizar a manutenção da homogeneidade dos solutos no meio de cultivo.

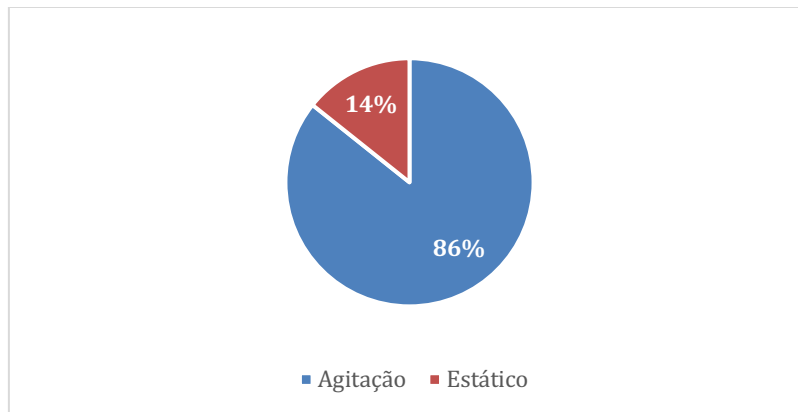


Figura 3. Gráfico com o percentual das condições de biotransformação encontradas nos artigos científicos

Com relação à escolha do meio de cultura, segundo Sorrentino (2019), deve ser aquele que tenha menor grau de interferência para que seja favorável a formação de produtos de biotransformação. Analisando os dados extraídos dos artigos sobre os meios de culturas utilizados, a maioria, 10 dos 14 artigos revisados, utilizaram meios de cultura complexos (Figura 4) que segundo Madigan (2016) são meios que fornecem todos os nutrientes necessários para o metabolismo de fungos.

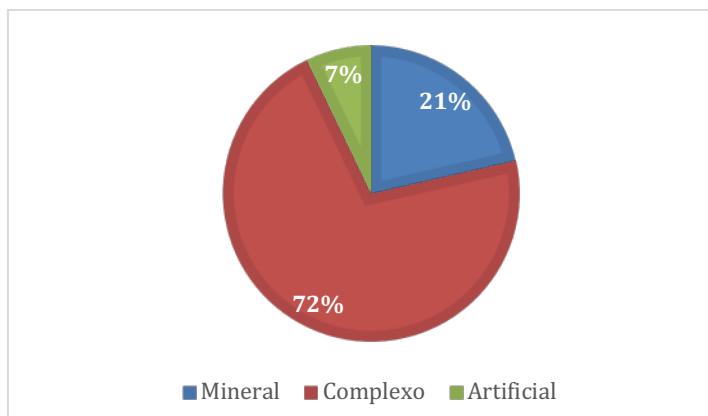


Figura 4. Percentual de uso dos diferentes meios de cultura.

A respeito da faixa de temperatura, 3 dos 14 artigos não relataram qual foi a temperatura escolhida. Entretanto, dentre os que informaram, com exceção de 1 (TRYTEK; FIEDUREK; GROMADA, 2016), todos os outros empregaram temperatura na faixa de 25 a 30 °C (Figura 5). O trabalho publicado por Trytek; Fiedurek; Gromada (2016) foi exceção, para a variável temperatura, pois realizou o processo de biotransformação a 20°C. Isso ocorreu provavelmente devido ao fungo empregado. *Crisosporium pannorum*, que é um fungo que habita também as regiões da Antártida, ou seja, é um fungo que é ativo em temperaturas mais baixas. Já os demais trabalhos selecionaram a faixa de temperatura ideal de ativação dos fungos (25 a 30 °C), corroborando com o descrito por BASTOS em 2010. Além disso, é possível afirmar que a temperatura escolhida pelos estudos científicos não foi maior devido à alta volatilidade dos monoterpenos. Logo, se a temperatura fosse alta, o substrato seria facilmente evaporado e conseqüentemente perdido.

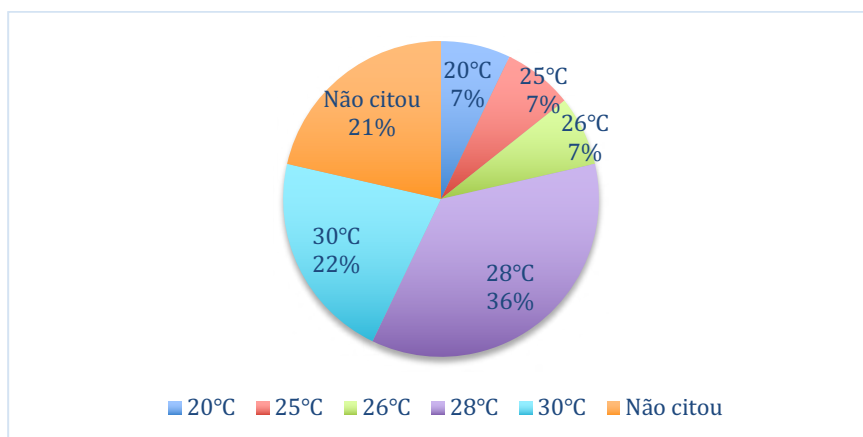


Figura 5. Gráfico com as temperaturas utilizadas nos procedimentos de biotransformação

As condições de pH e pressão, apesar de serem fatores extremamente importantes para a manutenção da estrutura enzimática do biocatalisador, pouco foi citado pelos artigos.

Na tabela 2 são apresentadas as condições empregadas nas etapas de extração, quantificação e caracterização estrutural dos produtos de biotransformação.

## 5.2 Condições experimentais empregadas nos procedimentos analíticos.

Com relação aos dados revisados dos procedimentos analíticos, estes foram agrupados na tabela 2, onde estão apresentadas as técnicas de extração, os métodos de análise e caracterização dos produtos de biotransformação.

**Tabela 2:** Condições experimentais empregadas nos procedimentos analíticos.

| <b>Autor</b>                          | <b>Condições de extração</b>         | <b>Análise quantitativa</b> | <b>Análise Qualitativa<br/>(caracterização dos produtos)</b> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--|
| RAMOS <i>et al.</i> , 2015.           | Solvente utilizado: acetato de etila | CG-DIC                      | CG-EM e RMN.   |
| MEI <i>et al.</i> , 2021.             | Solvente: metanol                    | CLAE-UV, coluna C18         | RMN  |
| CECATI <i>et al.</i> , 2017.          | Solvente: acetato de etila           | CG-DIC coluna DB-5          | CG-EM  |
| LEE <i>et al.</i> , 2015a.            | Solvente: acetato de etila           | CG-DIC                      | CG-EM com uma coluna DB-5                                    |
| LEE, SY, <i>et al.</i> , 2015b.       | Solvente: acetato de etila           | CG-DIC coluna DB-5          | CG-EM  |
| TRYTEK;<br>FIEDUREK;<br>GROMADA, 2016 | Solvente: hexano                     | CG-DIC                      | CG-EM  |

|   |   |                                     |                 |
|---|---|-------------------------------------|-----------------|
| BIER; MEDEIROS;<br>SOCCOL, 2017         | Solvente: diclorometano/n-<br>pentano (1:1) | CG-DIC coluna HP-5.                 | CG-EM           |
| MOHAMMAD, <i>et al.</i> ,<br>2018.      | Solvente: acetato de etila                  | CG-DIC. CL com sílica               | RMN             |
| MOLINA <i>et al.</i> ,<br>2013.         | Solvente: acetato de etila                  | CG-DIC                              | CG-EM           |
| KIRAN <i>et al.</i> , 2013.             | Solvente: acetato de etila.                 | CL empacotado com sílica            | UV-Vis, RMN     |
| NUNES, <i>et al.</i> ,<br>2013.         | Solvente: acetato de etila                  | CG-DIC                              | CG-EM           |
| BADEE; HELMY;<br>MORSY, 2011.           | Solvente: acetato de etila.                 | CG-DIC                              | CG-EM           |
| SILVA; STAMBUK;<br>NASCIMENTO,<br>2012. | Solvente: diclorometano                     | CCD e CG-DIC                        | CG-EM e RMN.    |
| DARAMWAR<br>KIRAN <i>et al.</i> , 2012. | Solvente: diclorometano                     | CCD em placas de sílica.<br>CG-DIC. | CG-EM, IV e RMN |

Legenda: CG-DIC: cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama; CG-EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; CCD: Cromatografia em camada delgada; CL: cromatografia líquida clássica; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta; IV: infravermelho; UV-Vis: Ultravioleta – visível; RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

Analisando na tabela 2, observamos que com exceção do trabalho de MEI et al. (2021) que empregou como técnica de extração a precipitação de proteínas, e o metanol como solvente, os demais trabalhos empregaram a extração líquido-líquido. Além disso, o solvente preferencialmente utilizado por 64% (Figura 6) dos trabalhos revisado, assim como para Silva, Vespermann; Molina (2013), foi o acetato de etila. O acetato de etila, dentre os solventes imiscíveis em água (éter dietílico, hexano e clorofórmio), é o de maior polaridade (BARTH *et al.*, 2014), contribuindo com a extração dos produtos de biotransformação, que, frequentemente, são mais polares que os substratos que os originam.

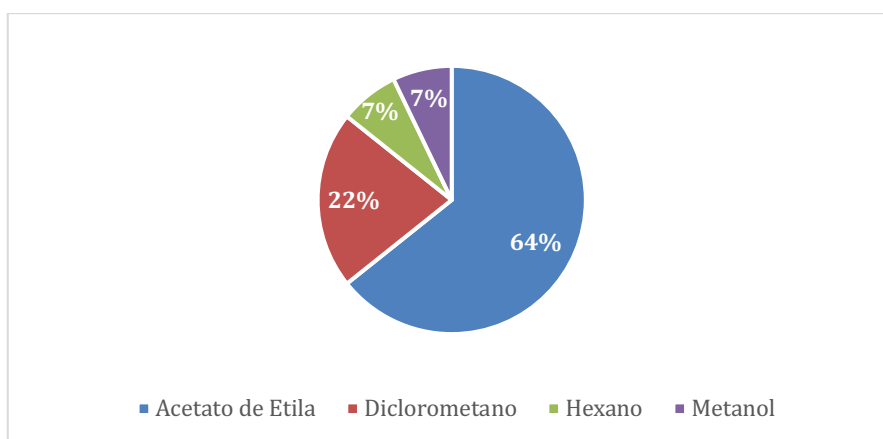


Figura 6. Gráfico com a distribuição percentual de solventes empregados na extração de produtos de biotransformação de monoterpenos.

Com relação ao resultado das condições de análise cromatográfica, a metodologia analítica mais utilizada foi a cromatografia gasosa (CG) (Figura 7) como estabelecido por GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009. Devido aos monoterpenos serem substâncias com baixo peso molecular, essas substâncias são altamente voláteis, por isso para sua análise é totalmente pertinente o emprego da cromatografia gasosa (NAWADE, *et al.*, 2019).



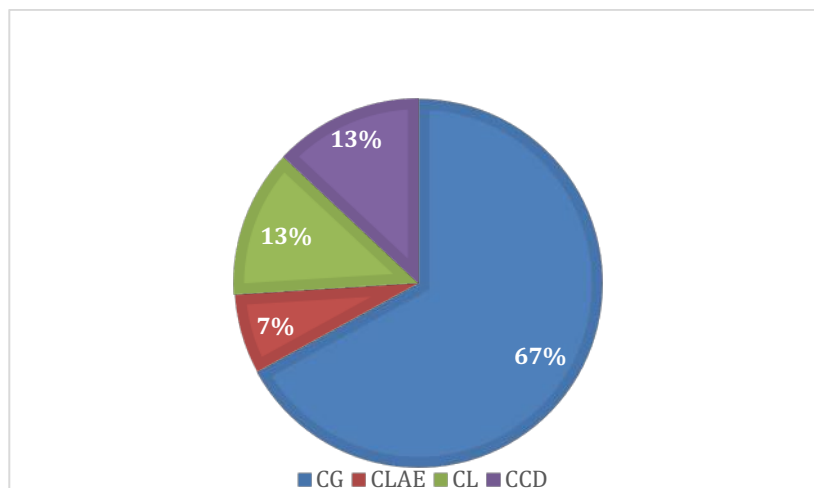


Figura 7. Distribuição percentual dos métodos cromatográficos empregados na separação dos produtos de biotransformação.

Por fim, foi possível observar que juntamente com a CG, a espectrometria de massas foi a técnica mais empregada na caracterização estrutural (Figura 8), corroborando assim com o estudo de VESSECCHI em 2011. Visto que essa técnica permite a análise dos átomos e moléculas a partir da razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons gerados após sua fragmentação quando estão no estado gasoso. Devido a isso a espectrometria de massas é amplamente acoplada à cromatografia gasosa. Logo, se os monoterpenos possuem alta volatilidade e podem facilmente serem separados pelo CG, é pertinente que a espectrometria de massas seja amplamente utilizada para caracterização dessas moléculas. Outra metodologia altamente empregada é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) indo ao encontro do preconizado por GOUVEIA e OLIVEIRA em 2009. Diante da cadeia carbônica presente na estrutura molecular dos monoterpenos e a técnica de RMN ser extremamente eficaz na análise de carbonos, é possível verificar a utilização cada vez maior dessa metodologia na análise desses metabólitos secundários.

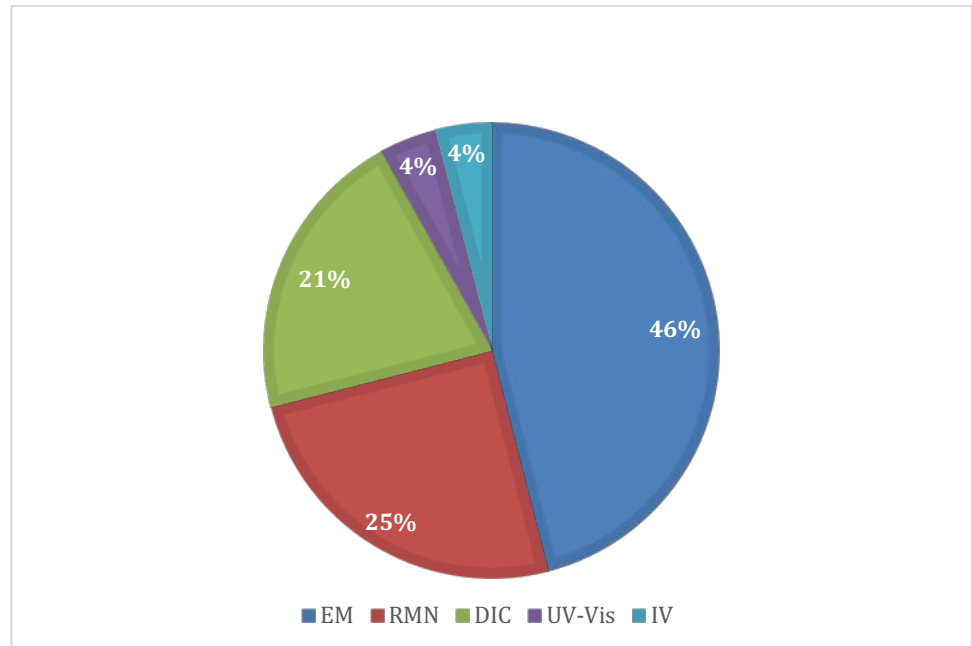


Figura 8. Gráfico com a distribuição de técnicas empregados na caracterização e análise estrutural dos produtos de biotransformação.

## **6. Conclusão**

Apesar da ampla relevância apresentada pelos monoterpenos em diversos setores como industrial e ambiental, foi possível notar que mesmo num período longo de 11 anos, apenas 14 artigos científicos foram encontrados em 3 bases de dados com os filtros aplicados. E mesmo os artigos selecionados, nem todos apresentaram detalhadamente as condições de biotransformação, como exemplo, muito deles não apresentaram o pH e temperatura do meio, além de quais colunas cromatográficas foram utilizadas.

Com relação aos procedimentos de biotransformação, foi possível constatar que a melhor condição que propicia a produção dos metabólitos foi sob agitação e o meio de cultura mais empregado foi do tipo complexo. A faixa de temperatura mais empregada ficou situada entre 25 e 30 °C e o pH próximo da neutralidade, favorecendo a sobrevivência do fungo.

Com relação a etapa analítica dos estudos de biotransformação a técnica de extração preferida foi a extração líquido-líquido empregando acetato de etila como solvente. A técnica de separação mais empregada foi a CG e para caracterização estrutural a CG acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

## 6. Referências

ABRAHIM, D.; BRAGUINI, W.L.; KELMER-BRACHT, A.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize J. Chem. Ecol., 26, pp. 611-624, 2000.

AGUSTA A.; MAEHARA, S.; OHASHI, K.; SIMANJUNTAK, P.; SHIBUYA, H. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. Chem Pharm Bull (Tokyo). V.53, p.1565-9, 2005.

AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. Chemosphere, v.17,p. 232-242, 2014.

AKACHA, N.B.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: synthesis, recovery, modeling, and bioprocesses. Food and Bioproducts Processing, v. 94, p. 675-706, 2015.

BADEE, A.Z.M.; HELMY, S. A.; MORSY, N. F.S. Utilisation of orange peel in the production of  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). Food Chemistry - FOOD CHEM. V.126. pp. 849-854. Jun, 2011.

BASTOS, R.G. Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos. – São Carlos: EdUFSCar, 162 p. -- (Coleção UAB-UFSCar) 2010.

BICAS, J.L.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. Chem Rev.; v.109, pp.4518-31. Sep, 2009.

BIANCHINI, L.F.; ARRUDA M.F.; VIEIRA S.R.; CAMPELO P.M.; GRÉGIO, A.M.; ROSA, E.A.. Microbial Biotransformation to Obtain New Antifungals. Front Microbiol. Dec, 2015.

BIER, M.C.; MEDEIROS, A.B.; SOCCOL, C.R. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. Fungal Biol. v.121, p.137-144. Feb, 2017.

BORGES K. B., BORGES W. S., DURÁN-PATRÓN R., PUPO M. T., BONATO P. S., COLLADO I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. Tetrahedron: Asymmetry 20, 385–397. Mar, 2009.

BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. Nat. Rev. Microbiol. V.1, p.21–32. Jan 2013.

BUSTAMANTE, K.G.L.I; LIMA, A.D.F.I; SOARES, M.L.I; FIUZA, T.S.I; TRESVENZOL, L.M.F.II; BARA, M.T.F.II; PIMENTA, F.C.III; PAULA, J.R.II. Evaluation of antimicrobial activity of crude ethanol extract from the bark of "sucupira branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. Rev. bras. plantas med. V.12, Sep. 2010.

CARDOSO, E.J.B.N. *et al.* Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: Siqueira JO, Souza FA, Cardoso EJBN, Tsai SM, editores. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: Editora UFLA; 2010.

CECATI, F. M, *et al.* Ecofriendly chemical diversification of *Eupatorium buniifolium* essential oil by endophytic fungi. *Process Biochemistry*. v. 64. p. 93-102. Jan, 2017.

CHOUDHARY, M.; GUPTA, S., DHAR, M.K.; KAUL S. Endophytic Fungi-Mediated Biocatalysis and Biotransformations Paving the Way Toward Green Chemistry. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021.

CHRISTIANSON, D.W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, 117 (17), pp. 11570-11648. Sep, 2017.

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

CREŠNAR B, PETRIČ S. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim Biophys Acta*. V.1814, pp.29-35. Jan, 2011.

DARAMWAR, P.P., RINCY, R., NILOFERJAHAN, S., KRITHIKA, R., GULATI, A., YADAV, A., SHARMA, R., *et al.* Transformation of (±)-lavandulol and (±)-tetrahydrolavandulol by a fungal strain *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, v. 115, pp. 70-74. Jul, 2012.

DE CARVALHO, C. C.; DA FONSECA M. M. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol Adv*, v. 2, p.134-42, 2006.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*.v. 70 p.15-16. Sep, 2009.

FERNANDES, J. *et al.* Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncol Rep*. 13(5):943-7, 2005.

GEESI, M. H. The effect of extraction apparatus on the chemical composition of essential oil from the endemic damask rose (*Rosa Damascena* Mill) with an antioxidant evaluation. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences (IAJPS)*, v. 5, n. 8, p. 7442-7451, 2018.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N.; The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*, v.7, p.408-14. 2007.

GOUVEIA, L. L.; OLIVEIRA, M. R.. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para padronização dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng e *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2009. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GUPTA, C.; PRAKASH, D.; GUPTA, S. Biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *J. Microbiol.* p. 3. Jan, 2015.

HUANG, A. C.; OSBOURN, A. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. *Pest management science*, v. 75, n. 9, p. 2368-2377, 2019.

HORMIGO D, DE LA MATA I, ACEBAL C, ARROYO M. Immobilized aculeacin A acylase from *Actinoplanes utahensis*: characterization of a novel biocatalyst. *Bioresour Technol.* 2010.

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997

KAUR, R.; KUKKAR, D.; BHARDWAJ, S.K.; KIM, K.H.; DEEP, A. Potential use of polymers and their complexes as media for storage and delivery of fragrances. *Journal of Controlled Release*, 285, 81-95, 2018

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, 2007

KIRAN, I.; OZŞEN, O.; CELIK, T.; ILHAN, S.; GÜRSU, B.Y.; DEMIRCI, F. Microbial transformações de isophorone por *Alternaria alternata* e *Neurospora crassa*. *Nat Prod Commun.* v.8, p. 59-61, 2013.

KUMAR, A.; GANDHI, A.J. Aroma therapy in major depressive disorders (mdd): an assessment. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 1224-1241. 2016.

LEE, SY., KIM, SH., HONG, CY. *et al.* Biotransformation of (-)- $\alpha$ -pinene and geraniol to  $\alpha$ -terpineol and p-menthane-3,8-diol by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *J Microbiol.* v.53, p. 462-467. 2015a.

LEE, SY., KIM, SH., HONG, CY. *et al.* Biotransformation of (-)- $\alpha$ -Pinene by Whole Cells of White Rot Fungi, *Ceriporia sp.* ZLY-2010 and *Stereum hirsutum*. *J Microbiol.* V.43, p. 297-302. 2015b.

LEI, D.; QIU, Z.; QIAO, J.; ZHAO, G. Plasticity engineering of plant monoterpene synthases and application for microbial production of monoterpenoids. *Biotechnol Biofuels* 14, 147, 2021.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Microbiologia de Brock*. 12<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MEI, R.-F, *et al.* Interaction between *Alternaria alternata* and monoterpenoids caused by fungal self-protection. *Process Biochemistry.* v. 110, p. 142-150, 2021.

MOHAMMAD, M.Y.; SHAKYA, A.; AL-BAKAIN, R.; HAROON, M.H.; CHOUDHARY, M.I. New monoterpene by biotransformation of thymoquinone using *Aspergillus niger*. *Bioorg Chem.* v.80. p 212-215. Oct, 2018.

MOLINA, G. *et al.* Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits. *Food Sci Biotechnol.* v.22, p.999–1006. 2013.

NAWADE, B. *et al.* Profiling of volatile terpenes from almond (*Prunus dulcis*) young fruits and characterization of seven terpene synthase genes. *Plant Sci.* 2019.

NUNES, F. M., *et al.* New fungi for whole-cell biotransformation of carvone enantiomers. Novel p-menthane-2,8,9-triols production. *Applied Catalysis A General.* V.468, pp. 88-94, 2013.

OSHIMA, T.; ITO, M. Sedative effects of l-menthol, d-camphor, phenylethyl alcohol, and geraniol. *J Nat Med.*; v.75, pp.319-325. 2021.

PERVAIZ, I.; AHMAD, *et al.* Biotransformação microbiana: uma ferramenta para o projeto de medicamentos . *Appl. Biochem. Micro.* 2013.

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.

PRATES *et al.* Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) J. *Stored Prod. Res.*, 34. pp. 243-249. 1998.

PYNE, M. E.; NARCROSS, L.; MARTIN, V. JJ. Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant physiology*, v. 179, n. 3, p. 844-861, 2019.

RAMOS, A. *et al.* Hydroxylation of 1,8-cineole by *Mucor ramannianus* and *Aspergillus niger*. *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology.* v.46, p. 261–264. 2015.

RAMOS, A. S. Redução microbiológica de beta-cetoésteres. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2009.

RAMOS, R.R. Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RESTAINO, O.F.; *et al.* Biotechnological transformation of hydrocortisone to 16 $\alpha$ -hydroxy hydrocortisone by *Streptomyces roseochromogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol.* V.98, pp.1291-9. 2014.

RUDROFF, F. *et al.* Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. *Nat. Catal.* v..1, pp.12–22. 2018

RUIZ, B. *et al.* Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol.* v.36, pp.146-67. 2010

SHELDON, R.A.; WOODLEY, J.M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev.* v. 24, pp. 801-838. 2018.

SILVA, C. H. C. *et al.* AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA EXTRAÇÃO DE PRODUTOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE A-PINENO, XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Blucher Chemical Engineering Proceedings, V. 1, pp 2569-2575. 2019.

SILVA, G. A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza*, v.15, p.47-53, 2005.

SILVA, V.; STAMBUK, B.; NASCIMENTO, M. Asymmetric reduction of (4R)-(?)-carvone catalyzed by Baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* V.77. pp. 98-104. 2012.

SORRENTINO, J. M.. Estudo De Biotransformação De Fármacos Através De *Cunninghamella Elegans* ATCC 9245. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2019.

SORVARIAB, J.; HARTIKAINEN, S.; Terpenes and fungal biomass in the nest mounds of *Formica aquilonia* wood ants. *European Journal of Soil Biology.* 105, 2021.

SOUZA, L. S. Metodologias analíticas para determinação do perfil químico, atividade imunomoduladora e citotóxica do látex de *Euphorbia tirucalli* L. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2019.

SUCHARA, E. A. Desenvolvimento De Metodologias Analíticas Para Determinação De Fármacos Em Fluidos Biológicos E Amostras Ambientais Por Cromatografia Líquida E Gasosa. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

SUN, J. *et al.* Alcoloides indólicos de *Nauclea officinalis* com atividade antimalárica fraca. *Fitoquímica* , v.69, pp . 1405-1410. 2008.

SUSSMANN, R. A. C. Biossíntese de vitamina E nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed. 2017.



TRYTEK, M.; FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of  $\alpha$ -pinene by a psychrotrophic *Chrysosporium pannorum*. *Biochem Eng J.* v.112, p 86-93. 2016.

VESPERMANN, K. A. C. *et al.* Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, mar. 2017.

VESSECCHI, R. *et al.* “Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa”. *Quím. Nova.* vol.34 no.10 São Paulo. 2011.

WERF, V. D.; M. J.; KEIJZER, P. M.; SCHAFT, P. H. V. D. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal Biotechnology*, v. 84, p. 133, 2000.

WRIGHT, L. D. *et al.* Biotin Sulfoxide. III. The Characterization of Biotin Sulfoxide from a Microbiological Source. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, n. 16, 4163-4166, 1954.

ZUAS, O.; MULYANA, M. R.; BUDIMAN, H. Analytical method validation of GC-FID for the simultaneous measurement of hydrocarbons (C2-C4) in their gas mixture. *Rev. Colomb. Quim.*, Bogotá, v. 45, n. 3, p. 22-27, Dec. 2016.