

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI0205433-7 A2



Leia-me
antes

(22) Data do Depósito: 20/11/2002

(51) Classificação: C07C 33/05 ; C07C 49/543

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENOL A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO

(57) Resumo: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENOL A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO". É descrito um processo de obtenção de verbenol a partir de alfa-pineno por biotransformação, utilizando como biocatalisador, culturas líquidas de B. sorokiniana. O substrato é colocado sob condições de biotransformação em contato com as células de biocatalisador e entre 5 e 7 dias é obtido o produto trans-verbenol com rendimentos de conversão superiores a 71% ou 81%, enquanto a proporção de subprodutos é minimizada. O trans-verbenol encontra utilização como bioinseticida e importante intermediário de síntese de produtos farmacêuticos.

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Nome do Inventor: José Carlos Germani / [Amelia Teresinha Henriques](#) / Arthur Germano Fett Neto / Renata Pereira Limberger

(74) Nome do Procurador: Paulo Afonso Pereira Cons. em Marcas e Patentes Ltda

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENOL A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um processo de obtenção de verbenol a partir de alfa-pineno por biotransformação. Mais especificamente, a presente invenção diz respeito a um processo de obtenção de *trans*-verbenol com rendimentos elevados, por biotransformação de alfa-pineno, em que o biocatalisador utilizado são culturas líquidas de *Bipolaris sorokiniana*.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

A aplicação da biocatálise começou a ser evidenciada no século XIX, quando Pasteur utilizou o fungo *Penicillium glaucum* para obter L-tartarato de amônio a partir de uma mistura racêmica dos isômeros D e L. Estes estudos preliminares geraram uma cascata de outros trabalhos, tendo como principal obstáculo, na ocasião, a dificuldade de obtenção de culturas puras. A partir de então, o aumento do número de trabalhos utilizando reações de biotransformação foi baseado, inicialmente, em reações catalisadas por *Saccharomyces cerevisiae*, como a produção microbiológica de acetona, glicerol e

butanol durante a Primeira Guerra Mundial. Posteriormente, com o uso de leveduras contaminadas por bactérias, ficou caracterizado o potencial biocatalítico destes microorganismos.

5 Em se tratando de metabólitos secundários e seus intermediários, o primeiro exemplo de reações de biotransformação conhecido pode ser considerado como a condensação estereoseletiva de benzaldeído com piruvato endógeno, mediada por *S. cerevisiae*, levando à formação de (*R*)-1-hidroxi-1-fenil-propan-2-ona, a qual é facilmente convertida em (*1R,2S*)-efedrina, alcalóide com propriedades adrenérgicas, utilizado no
10 tratamento de asma, hipotensão e congestão nasal.

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

Apesar de culturas de células vegetais serem biocatalisadores altamente viáveis, devido a sua capacidade de produzir uma vasta gama de micromoléculas, além de constituírem uma ferramenta importante na regulação da produção de metabólitos de interesse,
20 somente em 1964, foram publicados estudos relacionados à habilidade destes sistemas em transformar substratos exógenos, visando à obtenção de metabólitos secundários. Assim, o artigo de Sthols, S. J.; e Staba, E. J. "Production of Cardiac glycosides by plant tissue culture. IV. Biotransformation of digitoxigenin and related substances". *Journal of Pharmaceutical Science*, v.54, p.56-64, 1964, relata a
25 suplementação de culturas de células de *Digitalis lanata* com o cardenolídeo digitoxigenina com isolamento, após 7 dias, deo um produto, posteriormente denominado 3-desidrodigitoxigenina.

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

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

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

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

5 *B. sorokiniana* (sin.: *Helminthosporium sativum*) é um fungo patogênico do trigo e de diversas gramíneas, que sobrevive em sementes infectadas e restos de plantas, ou ainda, em hospedeiros secundários, por vários anos. Não são conhecidos trabalhos referentes a estudos *in vitro*, e com relação ao metabolismo secundário, apenas o trabalho de Nakajima, H.; Toratsu, Y.; Fuji, Y.; Ichinoe, M.; Hamasaki, 10 T. “Biosynthesis of sorokinianin a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*: Evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathways”. *Tetrahedron Letters*, v.39, p.1013-1016, 1998, que descreve o isolamento e caracterização de uma fitotoxina sesquiterpênica, por eles 15 espécie e, conseqüentemente, sua aplicabilidade em estudos de biotransformação de mono- e sesquiterpenóides.

A patente DD 251993 ensina a produção de trans-verbenol por uma cepa de *Acetobacter*.

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

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

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

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

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

Nesta mesma linha de utilização, a patente US 6203786 ensina composições atrativas de besouros que infestam pinheiros contendo 100 partes de alfa-pineno e 10 partes de *trans*-verbenol.

15 Ainda uma aplicação do produtos *trans*-verbenol obtido com as reações de biotransformação de alfa-pineno conforme o presente processo, destacando-se a síntese de (-)-dendrobina ilustrada na Figura 5, alcalóide presente em *Dendrobium nobile* (orquídea ornamental chinesa), com importantes atividades antipirética e
20 hipotensiva, utilizando (+)-*trans*-verbenol como material de partida, como descrito por Cassayre, J.; Zard, S. Z. "A short synthesis of (-)-dendrobine. Some observation on the nickel mediated radical cyclisation and on the Pauson-Khand reaction". *Journal of Organometallic*, v.624, p.316-326, 2001.

25 Torna-se evidente portanto que há interesses em várias áreas técnicas em desenvolvimentos para a obtenção, com rendimentos de 80% em peso ou mais, de produtos de alto valor agregado como o verbenol, derivado de terpenos e sesquiterpenos, utilizando como

sistema biocatalítico culturas de células íntegras de *B. sorokiniana*, tal desenvolvimento sendo descrito e reivindicado no presente pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção é dirigida ao processo de obtenção de *trans*-verbenol por biotransformação de alfa-pineno utilizando como biocatalisador, culturas de *B. sorokiniana*.

De acordo com a invenção, o processo inventivo compreende:

10 a) Prover um meio nutritivo a uma cultura de *B. sorokiniana* de modo que a cultura possa adquirir biomassa celular suficiente para a biotransformação de alfa-pineno;

b) Adicionar à cultura de a) que adquiriu biomassa celular uma proporção de alfa pineno capaz de ser biotransformada pela dita cultura e deixar reagir, sob condições de biotransformação, durante o tempo de incubação necessário para a reação;

15 c) Após o término da reação de biotransformação, extrair os produtos; e

d) Separar o produto verbenol.

20 Assim, a presente invenção provê um processo de obtenção de *trans*-verbenol por biotransformação de alfa-pineno utilizando como biocatalisador, culturas de células de *B. sorokiniana*.

A presente invenção provê ainda um processo de obtenção de *trans*-verbenol por biotransformação de alfa-pineno com mais de 80% de rendimento (% de peso de produto em relação ao substrato administrado) e poucos subprodutos reacionais.

25 A presente invenção provê ainda um processo de biotransformação de alfa-pineno em presença de células íntegras de *B. sorokiniana* como biocatalisador, gerando como produto principal o *trans*-verbenol, importante material em si e intermediário igualmente interessante pois

facilita a formação de outros derivados de interesse comercial de difícil obtenção por outros meios.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

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

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

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

15 A FIGURA 4 anexa ilustra a cinética de biotransformação de (+)-alfa-pineno por *B. sorokiniana*. No eixo das ordenadas estão relacionadas as concentrações relativas dos produtos durante o período de incubação e no eixo das abscissas, o tempo de reação, em dias.

A FIGURA 5 anexa ilustra uma aplicação farmacêutica importante do *trans*-verbenol, a saber a síntese de (-)-dendrobina a partir de (+) *trans*-verbenol.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 A presente invenção compreende pois um processo de biotransformação de alfa-pineno para produzir principalmente *trans*-verbenol e outros derivados úteis, com o *trans*-verbenol sendo produzido em rendimentos superiores a 80% e com poucos sub produtos.

O processo de acordo com a invenção compreende colocar em contato, sob condições de biotransformação, alfa-pineno e culturas de *B. sorokiniana*.

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

A nomenclatura IUPAC do *trans*-verbenol é *trans*-4,6,6-trimetil biciclo[3.1.1]-hept-3-en-2-ol.

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

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

- **Alfa-pineno**

Alfa-Pineno é um monoterpene bicíclico de núcleo pinano, amplamente distribuído no reino vegetal e um dos monoterpenos mais
15 amplamente utilizados, encontrando aplicações desde produtos domissanitários até as indústrias química e farmacêutica.

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

As estruturas dos enantiômeros (1*S*,5*R*)-(-)alfa-pineno e (1*R*,5*S*)-
20 (+)-alfa-pineno estão ilustradas na Figura 1.

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

aerossóis, desinfetantes, inseticidas, indústria de tintas e esmaltes e para mascarar odores.

Na indústria química, há uma diversidade de produtos que vêm sendo obtidos em escala comercial utilizando alfa-pineno como material de partida, tais como canfeno e triciclono, importantes intermediários químicos de diversos produtos comerciais como cânfora, borneol e terpineol e acetato de terpenila e isomerização deste para beta-pineno, com subsequente conversão para linalol, geraniol e nerol, produtos largamente utilizados em síntese e em perfumaria. Outra aplicação relevante do alfa-pineno, que tem recebido considerável atenção, é a oxidação ao ar, levando à formação de óxido de alfa-pineno, pinonal, pinocarveol, verbenol, verbenona, carveol, canfolenal, sobrerol, mirtenol e mirtenal. Mas a multiplicidade de produtos associada a baixa especificidade dificultam a aplicação industrial dos métodos atuais. A Figura 2 ilustra a diversidade de produtos derivados de alfa-pineno.

- Cultura celular
- *Bipolaris sorokiniana*

O fungo *B. sorokiniana* foi isolado de sementes de trigo infectado, pela EMBRAPA (Passo Fundo, RS), e vem sendo mantido no laboratório de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na forma de esporos, em glicerina a 50% em água MilliQ. Em período de experimentos, o fungo foi inoculado em ágar Sabouraud, em tubos inclinados, com repiques periódicos de 2 meses.

25 • Reações de Biotransformação

As metodologias utilizadas para as reações de biotransformação de alfa-pineno em *trans*-verbenol em presença de culturas líquidas de *Bipolaris sorokiniana* foram adaptadas de Agrawal, R.; Joseph, R.

“Optimization of condition for the biotransformation of alfa-pinene to verbenone by a *Penicillium sp.*”. *Journal of Food Science and Technology*, v.37, n.4, p.430-432, 2000, em estudo utilizando (*R*)-alfa-pineno como substrato exógeno em sistema de culturas celulares de *Aspergillus niger*.

Para crescimento das culturas líquidas usadas em biotransformação, utilizou-se meio de dextrose de batata (100g de batatas, 30 g de dextrose e 1L de água), sem ajuste de pH e temperatura ambiente (20 a 30°C). Inóculos iniciais foram obtidos a partir de culturas em meio sólido. Para os ensaios de biotransformação, cerca de 10g de biomassa de fungo (peso fresco) foram incubadas em cada 100 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0, a 30°C, na presença de 50 mg de alfa pineno.

Culturas de *B. sorokiniana* foram transferidas assepticamente, com auxílio de alça de sementeira, para frascos Erlenmeyer contendo meio nutritivo (caldo BDA). Após um período de aquisição de biomassa celular, os microorganismos foram transferidos, após decantação, para frascos contendo tampão fosfato de potássio, e então suplementados com o substrato.

Em geral as reações de biotransformação foram efetuadas na proporção de 0,5% em peso de substrato em relação ao biocatalisador. No entanto, outras proporções podem ser usadas sem prejuízo para os rendimentos do processo, tal aspecto não sendo limitativo da invenção. De um modo geral admite-se que faixas razoáveis compreendem desde 0,01% em peso de substrato até 1% em peso. Para proporções próximas a 1% em peso, em que poderia haver uma preocupação com a toxidez do alfa-pineno, recomenda-se reduzir o tempo de exposição da cultura ao substrato ou mesmo alterar o overhead gasoso do frasco

de reação.

O monitoramento das bioconversões foi realizado mediante a retirada de alíquotas periódicas de 5 ml, extraídas com hexano e analisadas por CG/EM. Ao final do experimento, foram retirados 35ml da suspensão reacional.

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

A reação de biotransformação é geralmente terminada com o próprio solvente de extração (por exemplo n-hexano) que destrói as membranas celulares e inativa as enzimas oxidativas, provavelmente responsáveis pela reação (e.g. citocromo P450 mono-oxigenases).

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

• Caracterização dos substratos e de seus metabólitos

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

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

respectivamente.

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

A identificação dos produtos foi baseada no índice de Kováts e nos respectivos espectros de massa, por comparação destes com amostras autênticas, dados retirados da literatura, espectrotescas, ou ainda, por
10 RMN¹H e ¹³C, no Instituto de Química da UFRGS, sendo a identificação baseada em dados da literatura ou por comparação com amostras provenientes de métodos químicos sintéticos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e aqueles com técnicas especiais (DEPT, COSY e HETCOR) foram obtidos nos espectrômetros Bruker AC-300/P, Gemini 300 BB utilizando 300 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C e Varian XL 200 utilizando 200 MHz par ¹H e 50 MHz para ¹³C. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) usando CHCl₃ como referência. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes
15 de acoplamentos (J) em Hertz.

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

• Isolamento dos substratos ou de seus metabólitos

25 O isolamento dos substratos ou de seus metabólitos foi realizado por cromatografia sólido-líquido (CSL) segundo o método de Kirchner, que consiste na eluição da amostra com quantidades crescentes de acetato de etila em hexano. Os terpenos não oxigenados apresentam

maior afinidade pelo hexano sendo rapidamente eluídos, enquanto os terpenos oxigenados formam pontes de hidrogênio com a sílica, ficando mais adsorvidos, tendo sua eluição retardada. A ordem de eluição dos constituintes oxigenados com o aumento do gradiente de acetato de etila em hexano é a seguinte: óxidos, ésteres, cetonas e álcoois.

Como suporte foi utilizada coluna de 30 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro interno, e como fase estacionária, sílica 70-230 mesh. Foram coletadas frações de 10 ml, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando gel de sílica 60 GF₂₅₄ como fase estacionária, hexano e acetato de etila (80:20) como sistema eluente e anisaldeído sulfúrico para detecção.

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

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

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

Um processo muito empregado é cromatografia em coluna de sílica gel para separar os componentes hidrocarbonados dos oxigenados,

que pode ser adaptado para uso industrial com colunas bulk preparativas, obtendo-se verbenona.

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

10 Mais recentemente, há vários relatos de separação de aromas terpênicos vegetais por extração supercrítica com CO₂ (Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997) 1-37). Este método parece ser vantajoso e mais barato que os métodos convencionais, além de permitir ótima separação de componentes. O
15 uso de CO₂ como solvente supercrítico permite trabalhar com pressões relativamente baixas e temperatura próxima da ambiente. Resultados encorajadores, embora ainda necessitando confirmação em escala de produção, foram relatados para fracionamento de monoterpenos hidrocarbonados e componentes de aroma oxigenados de casca de
20 laranja (Budich, M.; Brunner, G. Vapour-liquid equilibrium data and flooding point measurements of the mixture carbon dioxide + orange peel. *Fluid Phase Equilibria* (1999) vol. 158-160, p. 759-773). Aparentemente, extração por fluido supercrítico será uma técnica importante para extração de terpenos e aromas no futuro próximo.

25 • **Biotransformação de alfa-pineno**

Conforme a Figura 3, as principais reações observadas na bioconversão do alfa-pineno foram hidroxilação, formando verbenol, seguida de posterior oxidação alílica, levando a verbenona.

Os resultados obtidos com o biocatalisador utilizado na invenção estão apresentados a seguir, ordenados de acordo com as formas enantioméricas do alfa-pineno.

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

5 Nos experimentos conduzidos como branco, constituídos de frascos contendo apenas células e meio, sem presença de substrato, não houve detecção de substâncias relacionadas aos metabólitos em questão. Em contrapartida, nos frascos constituídos apenas de substrato e meio, houve rápida conversão de (-)-alfa-pineno a *trans*-
10 verbenol e inúmeros outros produtos de oxidação. A TABELA 1 abaixo ilustra os produtos obtidos na degradação de (-)-alfa-pineno (50 mg) em meio reacional (50 ml). Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em experimentos individuais realizados com cada um dos meios utilizados com os diferentes
15 sistemas biocatalíticos (água destilada, água milliq, tampão fosfato de potássio pH7,0, meio MS preparado com água milliq e meio MS preparado com água destilada), com o desvio padrão calculado através do conjunto dos resultados obtidos nestes diferentes meios reacionais, demonstrando que não houve diferença significativa entre eles, o que
20 pode ser verificado pelos baixos valores de desvio-padrão obtidos em cada ponto.

TABELA 1

	3 horas	d1	d3	D5	d7	d10	d15
(-)-alfa-pineno	2,2±1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Canfolenal	7,2±2,5	3,2±0,9	2,0±0,9	1,5±0,6	0,8±0,2	1,6±0,4	0,2±0,1
<i>Trans</i> -pinocarveol	10,9±3,7	6,5±2,7	5,6±2,3	4,4±0,8	3,1±1,7	3,0±1,4	1,0±0,3
<i>cis</i> -verbenol	2,1±0,5	2,3±1,3	3,1±0,8	2,7±1,0	2,0±1,4	2,9±0,4	2,7±0,1
<i>trans</i> -verbenol	62,5±3,5	64,6±6,0	67,5±2,9	67,6±2,4	64,6±2,4	59,4±1,6	60,0±2,5

Mirtenol	6,7±2,5	6,1±1,2	6,6±0,5	6,5±0,6	6,0±0,5	6,5±0,5	6,9±0,4
(-)-verbenona	7,6±0,8	8,1±1,3	10,9±0,8	12,9±0,7	17,6±2,2	19,6±1,3	23,8±0,3
Mirtanol	2,3±1,5	1,7±0,9	2,1±0,3	2,2±0,4	2,7±0,6	2,6±0,2	2,7±0,3

Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em experimentos conduzidos em duplicata, contendo (-)-alfa-pineno (50mg) em 50 ml de água destilada, água milliq, tampão fosfato de potássio pH7,0, meio MS preparado com água milliq ou meio MS preparado com água destilada, com os respectivos valores de desvio-padrão.

De acordo com os dados expostos acima, o consumo total de (-)-alfa-pineno ocorre em cerca de 3 horas de reação, sendo *trans-verbenol* o principal produto formado, em proporções superiores a 50%. Bem como nos experimentos contendo células, ao longo do período de incubação, *trans-verbenol* se forma em rendimentos elevados no entanto nestes experimentos “branco” ocorre a formação de vários produtos paralelos à formação de *trans-verbenol*, enquanto o uso do biocatalisador proposto produz o produto desejado com pequena proporção de sub produtos.

Os resultados obtidos com os experimentos utilizando *B. sorokiniana* e (-)-alfa-pineno estão apresentados na TABELA 2 abaixo, indicando alto rendimento de *trans-verbenol*, com pouca formação de outros produtos, como verbenona e outros produtos.

A bioconversão de (-)-alfa-pineno (50mg) por *Bipolaris sorokiniana* envolveu (10g) em meio não nutritivo, tampão fosfato de potássio (pH7,0). Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em 2 experimentos independentes, realizados em quadruplicatas, com os respectivos valores de desvio-padrão.

TABELA 2

+	d1	d3	d5	d7
(-)-alfa-pineno	2,1±1,7	1,0±2,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -pinocarveol	11,7±0,3	8,7±0,8	6,3±0,7	5,4±0,7
<i>trans</i> -verbenol	47,9±1,7	68,4±3,3	81,9±2,5	78,3±5,1
Mirtenol	5,1±0,3	3,6±0,2	0,9±1,7	3,1±3,3
não identificado*	6,1±0,4	4,3±0,3	0,0	1,0±1,8
(-)-verbenona	4,3±1,1	7,5±1,1	10,9±1,3	11,3±2,1

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

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

O potencial biocatalítico de *B. sorokiniana* frente a (+)-alfa-pineno foi testado utilizando tampão fosfato de potássio (pH 7,0) como meio reacional e concentração de substrato de 0,5% com relação ao peso de células. A cinética da reação, ao longo de todo o período de incubação, está ilustrada na Figura 4.

Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 3 abaixo para a bioconversão de (+)-alfa-pineno (50mg) por *B. sorokiniana* (10g) em tampão fosfato pH7,0. Os valores apresentados representam as médias das concentrações obtidas em 2 experimentos independentes, realizados em quadruplicata, com os respectivos valores de desvio-padrão.

TABELA 3

	d1	d3	d5	d7
(+)-alfa-pineno	14,3±6,2	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -verbenol	63,9±9,3	69,3±9,4	68,2±9,2	71,1±4,8
(+)-verbenona	18,9±8,8	30,3±9,9	31,7±9,1	27,8±5,5

De forma análoga às reações envolvendo o enantiômêro (-), a reação de biotransformação de (+)-alfa-pineno por *B. sorokiniana*

envolve a formação inicial de *trans*-verbenol com rendimentos superiores a 70% após 7 dias de incubação e subsequente conversão a (+)-verbenona. Não foram detectadas presença de *trans*-pinocarveol e mirtenol, geralmente presentes como constituintes minoritários em reações de biotransformação de alfa-pineno.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de verbenol a partir de alfa-pineno por biotransformação, caracterizado por que compreende:

5 a) Prover um meio nutritivo a uma cultura de *B. sorokiniana* de modo que a cultura possa adquirir biomassa celular suficiente para biotransformação de alfa-pineno;

10 b) Adicionar à cultura líquida de a) que adquiriu biomassa celular uma proporção de alfa-pineno capaz de ser biotransformada pela dita cultura líquida e deixar reagir, sob condições de biotransformação, durante o tempo de incubação necessário para a reação;

c) Após o término da reação de biotransformação, extrair os produtos; e

d) Separar o produto verbenol.

15 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a *B. sorokiniana* é isolada de sementes de trigo infectado, sendo mantida na forma de esporos, em glicerina a 50% em água milliq e quando utilizado em experimentos, inoculado em ágar Sabouraud, em tubos inclinados, com repiques periódicos de 2 meses.

20 3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que o crescimento das culturas líquidas é efetuado em meio de dextrose de batata e 0.025% de extrato de levedura, pH 5,8 e temperatura de 30°C, os inóculos iniciais sendo obtidos a partir de culturas em meio sólido.

25 4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por que adicionalmente o meio é suplementado com 1% de glicose.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que as culturas de *B. sorokiniana* são transferidas assepticamente, com auxílio de alça de semeadura, para frascos contendo meio nutritivo

caldo BDA e são deixadas adquirir biomassa celular.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por que os frascos contendo as culturas que adquiriram biomassa celular são suplementados com alfa-pineno.

5 **7.** Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por que o conteúdo dos frascos contendo as culturas que adquiriram biomassa celular é decantado para frascos contendo tampão fosfato de potássio 0,05M a pH 7, e então é feita a suplementação com alfa-pineno.

10 **8.** Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a proporção de alfa-pineno para o biocatalisador é de 0,01 a 1% p/p.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a proporção de alfa-pineno para o biocatalisador é de 0,5% (p/p).

15 **10.** Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a proporção de alfa-pineno para o biocatalisador está entre 0,01 e 1% (p/p).

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que são produzidas proporções menores de trans-pinocarveol e verbenona.

20 **12.** Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a biotransformação ocorre em um período de 5 a 7 dias.

13. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a reação de biotransformação é terminada pela adição de um solvente orgânico.

25 **14.** Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por que o solvente orgânico é um hidrocarboneto alifático como n-hexano.

15. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a separação dos produtos de reação é feita por destilação fracionada a vapor, destilação a vácuo e extração com solventes.

20 **16.**

5 **16.** Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a separação dos produtos de reação é feita por cromatografia em coluna de sílica gel para separar os componentes hidrocarbonados dos oxigenados, adaptado para uso industrial com colunas bulk preparativas.

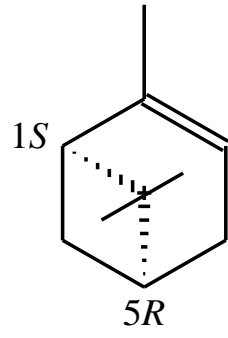
17. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que a separação dos produtos de reação é feita por destilação com um fluido supercrítico como CO₂.

RESUMO

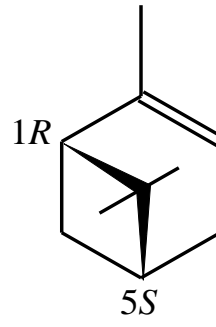
PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERBENOL A PARTIR DE ALFA-PINENO POR BIOTRANSFORMAÇÃO

É descrito um processo de obtenção de verbenol a partir de alfa-
5 pineno por biotransformação, utilizando como biocatalisador, culturas
líquidas de *B. sorokiniana*. O substrato é colocado sob condições de
biotransformação em contato com as células de biocatalisador e entre 5
e 7 dias é obtido o produto *trans*-verbenol com rendimentos de
conversão superiores a 71% ou 81%, enquanto a proporção de
10 subprodutos é minimizada. O *trans*-verbenol encontra utilização como
bioinseticida e importante intermediário de síntese de produtos
farmacêuticos.

FIGURA 1

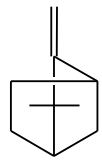


(-)-alfa-pineno

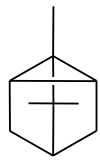


(+)-alfa-pineno

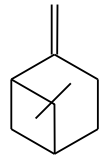
FIGURA 2



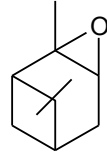
canfeno



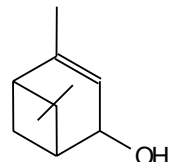
triciclono



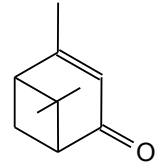
beta-



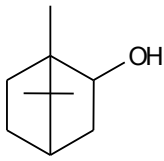
óxido de alfa-



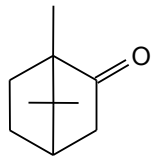
verbenol



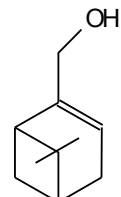
verbenon



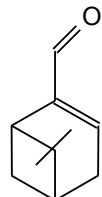
borneol



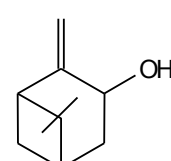
cânfora



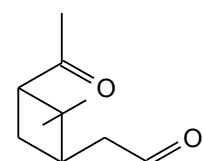
mirtenol



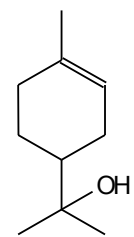
mirtenal



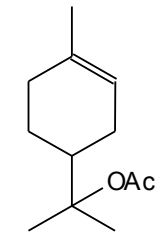
pinocarveol



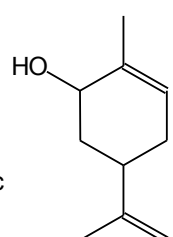
pinonal



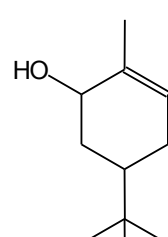
alfa-terpineol



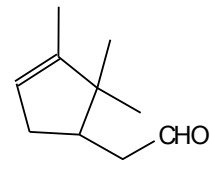
acetato de



carveol



sobrerol



canfolenal

FIGURA 3

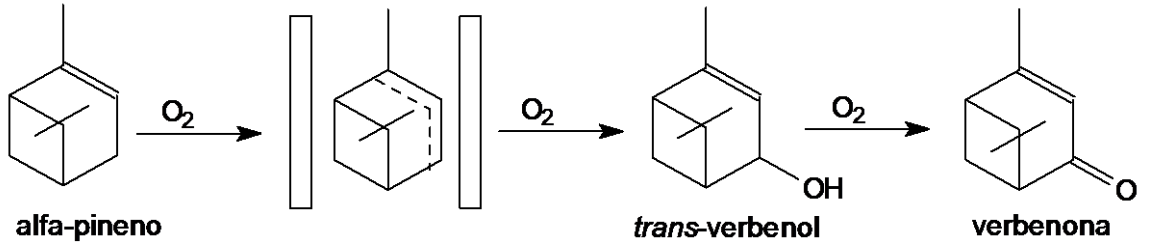


FIGURA 4

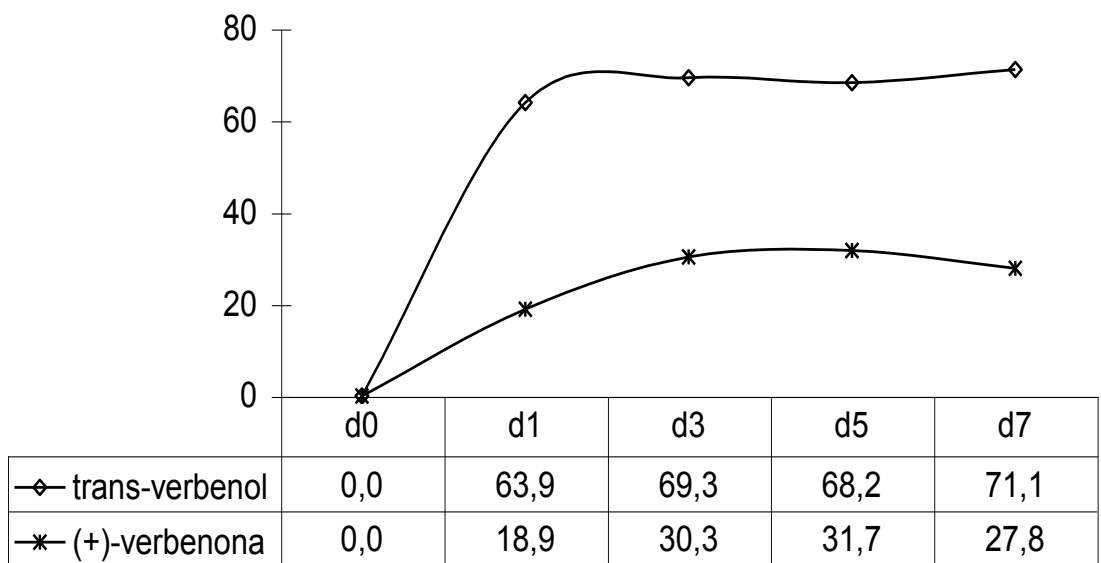


FIGURA 5

