Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

Produção de ácido perílico a partir de limoneno utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica*: otimização e aplicação do processo para a bioconversão do óleo essencial de laranja

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Elba Pinto da Silva Bon

Co-orientadora: Maria Antonieta Ferrara

Rio de Janeiro

Julho de 2018

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERÍLICO A PARTIR DE LIMONENO UTILIZANDO A LEVEDURA *Yarrowia lipolytica*: OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO PROCESSO PARA A BIOCONVERSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA

Felipe Moura Knopp

Maria Antonieta Ferrara

Elba P. S. Bon

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Aprovada por:

_____

Presidente, Professora Dr.ª Elba Pinto da silva Bon

DBq/IQ/UFRJ

_____

Professor Dr. Anderson, de Sá Pinheiro

DBq/IQ/UFRJ

_____

Professor Dr. Antônio Calos Siani

FIOCRUZ/RJ

_____

Professora Dr.ª Maria Alice Zarur Coelho

DBq/IQ/UFRJ

_____

Professor Dr. Rodrigo Volcan Almeida

DBQ/IQ/UFRJ

Ficha Catalográfica

Knopp, Felipe Moura.
Produção de ácido perílico a partir de limoneno utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica*: otimização e aplicação do processo para a bioconversão do óleo essencial de laranja Moura Knopp – Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2018.
Orientador: Elba P. S. Bon
Tese (doutorado) – UFRJ/ IQ/ Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2018.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer à Professora Elba P. S. Bon e principalmente a Dr.ª Maria Antonieta Ferrara por me concederem a oportunidade para a concretização deste trabalho. Obrigado por acreditarem em mim e permitir que eu iniciasse a minha vida científica sob seus olhares, obrigado pelas discussões e críticas construtivas que me fizeram acreditar no meu potencial como pesquisador e como pessoa.

À esquipe de Farmanguinhos – FIOCUZ e todos os membros do projeto Bioconversão do limoneno.

Ao companheiro de trabalho Marcello pelo incentivo, dedicação e extrema paciência com as inúmeras análises de HPLC realizadas com impecável eficiência e organização.

À agro-empresa TropFruit S/A (Estância, SE - Brasil), pelo fornecimento do óleo essencial de laranja utilizado nesse trabalho.

A toda a equipe que fez parte do laboratório Enzitec, no Instituto de Química e Laboratório Bioetanol da UFRJ por me ajudarem nos procedimentos diários e como amigos: Rodrigo, Raul, Ricardo, Gilberto, todos os alunos de iniciação científica, com destaque para as alunas Bruna e Thamires por seu companheirismos e auxílio importantes no trabalho.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e suporte do projeto.

Finalmente agradeço a minha família, sobretudo meus pais, minha irmã, minha médica e minha companheira por me ajudar a chegar até aqui.

RESUMO

KNOPP, Felipe Moura. PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERÍLICO A PARTIR DE LIMONENO UTILIZANDO A LEVEDURA *Yarrowia lipolytica*: OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO PROCESSO PARA A BIOCONVERSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA. Tese (doutorado em ciências - Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018**.**

O monoterpeno *R*-(+)-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de laranja, um subproduto da indústria de cítricos, produzido em grandes quantidades no Brasil. O ácido perílico, que é um derivado mono-oxigenado do limoneno com elevado valor de mercado e com potencial ação anticâncer, pode ser obtido por bioconversão do limoneno. Os processos de bioconversão oferecem, em relação à rotas químicas, vantagens técnicas, econômicas e ambientais como formação de produtos químio-, régio- e enantiosseletivos, uso de condições brandas de reação, baixo consumo de energia e geração de resíduos de baixo risco ambiental. A levedura *Yarrowia lipolytica* pode ser usada no processo de bioconversão do limoneno em ácido perílico porque é capaz de oxifuncionalizar exclusivamente o grupo metil exocíclico do limoneno. Entretanto, o baixo rendimento do processo, atribuído à toxicidade e volatilidade do limoneno, têm desencorajado estudos de aumento de escala. O presente trabalho estudou o processo de bioconversão do limoneno e do óleo de laranja em ácido perílico utilizando a levedura *Y. lipolytica,* tendo sido avaliadas as etapas de produção da levedura e o seu uso no processo de bioconversão. Visando aumentar a produção da levedura o meio de crescimento foi otimizado usando planejamento experimental. O meio apresentando 22,9 g/L de glicose, 7,7 g/L de peptona, 4,1 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de extrato de malte permitiu um aumento da produtividade do processo, conduzido à 28ºC, de 0,13 para 0,18 g de célula/L.h^{-1}. O meio otimizado foi utilizado para cultivo da *Y. lipolytica* em batelada alimentada em biorreator de 2L chegando-se a à concentração celular de 18,0 g (ps) /L com 33 h de cultivo a 28 ^{0}C. Células da levedura colhidas a partir do final da fase exponencial de crescimento até a fase estacionária mostraram-se igualmente competentes. A otimização da bioconversão, estudado inicialmente em frascos agitados resultou na produção de 512,7 mg/L de ácido perílico (32,19% de rendimento molar teórico) em 24 h a 25 ^{0}C, para uma concentração de limoneno e de levedura de 0,16% (v/v) e 27,1 g (ps)/L, respectivamente. A técnica de engenharia evolutiva foi empregada para aumentar à tolerância da levedura à toxicidade do limoneno. Após 30 passagens foi obtida uma linhagem de *Y. lipolytica* mais resistente e capaz de crescer no meio de cultivo contendo 0,12% (v/v) de limoneno. Esta linhagem, crescida em ausência de limoneno e, portanto, sem indução, resultou, na etapa de bioconversão, em que 0,16% (v/v) de limoneno foi adicionado no início do processo e também após 24 h, na formação de 902,6 mg/L ácido perílico em 48 horas. Quando esta linhagem foi crescida em presença do limoneno, e, portanto, induzida durante o crescimento, foi observada na etapa de bioconversão a formação de 1308,7 mg/L de ácido perílico, ficando clara a importância da indução na linhagem adaptada. Esta linhagem foi estocada a -80 ºC durante 10 meses sendo observada a manutenção de 80% na sua capacidade de produção de ácido perílico. A etapa de bioconversão, utilizando-se a linhagem nativa de *Y. lipolytica* foi estudada em biorreatores. Observou-se que a aeração de superfície

(realizada a partir do topo do vaso reacional), foi mais eficiente em relação à aeração convencional (alimentação do ar a partir da base do reator). A aeração de superfície e a alimentação do substrato em duas etapas, conforme acima descrito, resultou na formação de 839,6 mg/L de ácido perílico em 48 h. O biorreator com aeração de superfície foi também usado para a bioconversão do óleo essencial de laranja, um substrato industrial, em condições comparativas. Foram obtidos 806,4 mg/L de ácido perílico em 48 h, mostrando a robustez da levedura *Y. lipolytica* para o uso deste substrato industrial

Palavras-chave: ácido perílico, biotransformação, *Yarrowia lipolytica*, biorreator, óleo essencial de laranja.

ABSTRACT

KNOPP, Felipe Moura. PRODUÇÃO DE ÁCIDO PERÍLICO A PARTIR DE LIMONENO UTILIZANDO A LEVEDURA *Yarrowia lipolytica*: OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO PROCESSO PARA A BIOCONVERSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA. Tese (doutorado em ciências - Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018**.**

The monoterpene *R*-(+)-limonene is the main constituent of orange essential oil, a by-product of the citrus industry produced in large scale in Brazil. Perillic acid, which is a mono-oxygen derivative of limonene with a high market value and potential anticancer activity, can be obtained by bioconversion of limonene. Bioconversion processes offer technical, economic and environmental advantages over chemical routes, such as the formation of products with chemo-, regio- and enantioselectivity, application of mild reaction conditions, low energy consumption and the generation of low-risk environmental residues. *Yarrowia lipolytica* can be used for the bioconversion of limonene as this yeast can exclusively oxidize the exocyclic methyl group of limonene resulting in the formation of perillic acid. However, the low yields, attributed to the substrate toxicity and volatility, have been hindering the process scale up. The present work studied the bioconversion of purified limonene and of the orange oil in perillic acid using *Y. lipolytic* regarding the production of the yeast cells and its use in the bioconversion process. To increase the production of the yeast cells the growth medium composition was optimized using experimental design. The medium presenting 22.9 g / L glucose, 7.7 g / L peptone, 4.1 g / L yeast extract and 1.0 g / L malt extract allowed a productivity of 0.18 g cell / Lh^{-1} in comparison to 0.13 g cell / Lh^{-1} for the non-optimized medium, in experiments carried out at 28^0C. The optimized medium was used for the yeast fed batch cultivation in a 2L bioreactor and resulted in a peak cell concentration of 18.0 g (dw) / L within 33 hours at 25^0C. Yeast cells harvested from the late exponential growth to the stationary phases were equally competent for the bioconversion process. The optimization of the bioconversion process, initially done in shaken flasks, resulted in the production of 512,7 mg / L of perillic acid (32.19% theoretical molar yield) in 24 h, at 25^0C, using a limonene concentration and cell mass of 0.16% (v / v) and 27.1 g (dw) /L, respectively. Evolutionary engineering was employed to increase the yeast tolerance to limonene toxicity. After 30 passages it was obtained a higher resistant *Y. lipolytica* strain that was able to grow in the culture medium added of 0.12% (v / v) limonene. This strain, when grown in the absence of limonene, and therefore not induced, was able to produce, within 48 hours, 902.6 mg/L of perillic acid upon the addition of 0.16% (v / v) limonene at the onset and after 24 hours of the bioconversion process. When this lineage was subjected to limonene induction during growth it was observed in the bioconversion step, done under comparative conditions, the accumulation of 1308.7 mg / L of perilic acid, showing the importance of the induction step. After the adapted yeast strain was stored at -80 ° C for 10 months it retained 80% of the bioconversion capacity. The bioconversion process was also studied in bioreactor using the native *Y. lipolytica* strain. It was observed that aeration performed from the top of the

reaction vessel, known as surface aeration, was more efficient than conventional aeration when the air is fed from the base of the reactor vessel. The surface aeration and the addition of the substrate in two steps, as above described, resulted in the formation of 839.6 mg/L of perillic acid within 48 h. The bioreactor surface aeration and the two steps feed strategy were successfully applied to the bioconversion of the orange essential oil. It was observed the production of 806.4 mg/L of perillic acid in 48 h, showing the robustness of yeast *Y. lipolytica* for the use of this industrial substrate.

Keywords: Perillic acid, biotransformation, *Yarrowia lipolytica*, bioreactor, orange essential oil.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

DMBA	7,12-Dimetilbenz(a)antraceno
µ	Taxa de específica de crescimento
CMRVS	Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária
CYP	Citocromo P450
DCCR	Delineamento composto central rotacional
g	gravidade
GMB	Glioblastoma multiforme
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Kla	Coeficiente volumétrico de oxigênio
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinases*
MO	Meio otimizado
MOsM	Meio otimizado sem extrato de malte
NS	Variável não significativa
PO2	Pressão parcial de oxigenio
rpm	Rotações por minuto
Tg	Tempo de geração
vvm	Volume de ar por volume de meio, por minuto
YMA	*Yeast extract agar*
YMB	*Yeast extract base*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22
   2.1 Terpenos 22
   2.2 Limoneno 24
   2.3. Ação anticâncer de derivados perílicos 28
   2.4. Biotransformação 30
      2.4.1. Estratégias para superar limitações dos processos de bioconversão 31
      2.4.2. Biotransformação do limoneno 32
   2.5. A levedura *Yarrowia lipolytica* 33
      2.5.1. Consumo de substratos hidrofóbicos 35
      2.5.2. Citocromo P450 (CYP) 36
   2.6. Adaptação Evolutiva 39
   2.7. Panorama geral do Projeto Perilato – Parceria FIOCRUZ/UFRJ 40
3. JUSTIFICATIVA 42
4. OBJETIVOS 43
   4.1. Objetivo Geral 43
   4.2. Objetivos Específicos 43
5. MATERIAL E MÉTODOS 44
   5.1. Micro-organismo, propagação e manutenção 44
   5.2. Produção de biomassa celular em frascos agitados 44
   5.3. Bioconversão do limoneno em frascos agitados 44
   5.4. Bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica* colhida em diferentes fases do crescimento 45
   5.5. Reuso de células de *Y. lipolytica* após a bioconversão do limoneno 45
   5.6. Otimização da composição do meio de cultura para crescimento da levedura *Y. lipolytica* 45
      5.6.1. Avaliação da formulação do meio por delineamento Plackett-Burman 45
      5.6.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultivo na levedura *Y. lipolytica* 46
      5.6.3. Avaliação do crescimento da levedura em meio YMB, meio otimizado (MO) e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) 47
      5.6.4. Bioconversão do limoneno utilizando células crescidas em meio YMB, meio otimizado (MO) e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) 47
   5.7. Otimização das condições reacionais para a bioconversão de limoneno 47

5.8. Adaptação evolutiva de *Y. lipolytica* ao limoneno....48
5.8.1. Avaliação da estabilidade da cepa de *Y. lipolytica* adaptada....49
5.9. Estudos em biorreator instrumentado....49
5.9.1. Produção de biomassa celular de *Y. lipolytica*....49
5.9.2. Bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado com aeração convencional....49
a) Bioconversão em biorreator....50
b) Verificação da possibilidade de realizar a bioconversão através da adição direta do limoneno após o crescimento da levedura....50
5.9.3 Bioconversão do limoneno em biorreator com aeração de superfície....50
5.10. Produção de ácido perílico utilizando óleo essencial de laranja....51
5.11. Métodos analíticos....51
5.11.1. Atividade emulsificante....51
5.11.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)....52
5.11.3. Dosagem de glicose....52
5.11.4. Quantificação da massa celular da levedura *Y. lipolytica*....53
5. RESULTADOS....54
5.1. Influência de parâmetros do cultivo e operacionais na capacidade de bioconversão de limoneno da levedura *Y. lipolytica*....54
5.1.1. Considerações iniciais....54
5.1.2 Bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica* colhida em diferentes fases do crescimento....54
5.1.3. Reuso das células de *Y. lipolytica* após a bioconversão do limoneno....57
5.1.4. Otimização da composição do meio de cultura para crescimento da levedura *Y. lipolytica*....59
5.1.4.1. Avaliação da formulação do meio por delineamento Plackett-Burman....59
5.1.4.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultivo na levedura *Y. lipolytica*....62
5.1.4.3. Comparação da produção de massa celular em meio YMB, meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) e meio otimizado (MO)....68
5.1.4.4. Bioconversão do limoneno e produção de surfactantes utilizando *Y. lipolytica* cultivada previamente em meio YMB, meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) e meio otimizado (MO)....70
5.2. Otimização das condições reacionais para a bioconversão de limoneno....72
5.3. Adaptação evolutiva da levedura *Y. lipolytica* visando à obtenção de uma linhagem adequada à bioconversão com elevada concentração de limoneno....77
5.3.1. Adaptação da levedura *Y. lipolytica* a concentrações crescentes de limoneno....77
5.3.2. Morfologia das células de *Y. lipolytica*....82
5.3.3. Avaliação da estabilidade da linhagem de *Y. lipolytica* adaptada....82

5.4. Produção de biomassa celular e bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado....84
5.4.1. Produção de biomassa celular....84
5.4.2. Bioconversão com aeração convencional....87
5.4.3. Bioconversão em biorreator com aeração de superfície....89
5.5. Produção de ácido perílico a partir do óleo de óleo essência de laranja....93
5.5.1. Bioconversão do óleo de laranja em frascos agitados....93
5.5.2. Bioconversão do óleo de laranja em biorreator....93
6. CONCLUSÕES....96
7. TRABALHOS FUTUROS....98
8. REFERÊNCIAS....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos terpenos com base na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos (adaptado de FELIPE e BICAS, 2016). 23
Tabela 2. Composição química do óleo essencial da laranja (Marostica, 2007). 25
Tabela 3. Níveis dos componentes do meio de cultura de crescimento de *Y. lipoytica*. 45
Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para 3 fatores (extrato de levedura, peptona e glicose). 46
Tabela 5. Composição dos meios de cultura YMB, otimizado (MO) e otimizado sem extrato de malte (MOsM) utilizados para o crescimento de *Y. lipolytica*. 47
Tabela 6. Níveis dos componentes: concentração celular e concentração de limoneno.48
Tabela 7. Resultados do planejamento Plackett-Burman no estudo da influência das concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, peptona e glicose na produção de biomassa em 24h e 48h no cultivo de *Y. lipolytica*. 60
Tabela 8. Valores codificados e variáveis de resposta concentração celular (g/L) e pH dos ensaios de cultivo da levedura *Y. lipolytica*. A concentração de extrato de malte foi fixada em 1 g/L em todos os ensaios. 63
Tabela 9. Coeficientes de regressão e testes de hipóteses para os efeitos obtidos para produção de massa celular em 54 h pelo DCCR. 64
Tabela 10. Teste ANOVA para produção de massa celular (g/L) considerando todos os termos do modelo obtido no DCCR. 67
Tabela 11. Comparação entre as maiores produtividades de massa celular de Y. lipolytica entre os meios YMB, MOsM e MO. 69
Tabela 12. Níveis para cada parâmetro estudado e as variáveis de respostas: concentração de ácido perílico, rendimento molar de ácido perílico (%) em 24 h de reação. 74
Tabela 13. Estimativa dos efeitos do DCCR para o rendimento de ácido perílico. 75
Tabela 14. Teste ANOVA para rendimento de ácido perílico (%) considerando todos os termos do modelo obtido no DCCR. 76
Tabela 15. Crescimento e viabilidade celular da levedura *Y. lipolytica* exposta a concentrações crescentes de limoneno. Tempo de cultivo: 48 h em frascos agitados contendo meio YMB. 79
Tabela 16. Influência de parâmetros operacionais na bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica* em biorreator. Tempo de bioconversão: 48 h. 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidade básica de formação dos terpenos. 23
Figura 2. Estrutura química do R-(+) limoneno e S-(-)-limoneno (adaptado de pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). 24
Figura 3. Diagrama de fluxo simplificado para a extração de óleos essenciais de laranja com solventes. (1) trocador de calor, (2) bomba, (3) trocador de calor, (4) moinho, (5) coluna de extração, (6) trocador de calor, (7) coluna de destilação a vácuo, (8) bomba, (9) trocador de calor, (10) bomba e (11) trocado de calor (adaptado de Moncada et al., 2014). 26
Figura 4. Estrutura química do limoneno e de seus derivados perílicos (adaptado de Mirata et al., 2009). 28
Figura 5. Ativação da cascata das quinases: serina/treonina quinases (RAF, MEK) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (adaptado de Pan et al., 2005)..... 29
Figura 6. *Y. lipolytica* em placa de Petri (A) e micrografia ótica de *Y. lipolytica* a fresco (B) (aumento de 1000x), as setas indicam a presença de pseudohifas (representações gráficas do próprio autor). 34
Figura 7. Microscopia ótica a fresco de *Y. lipolytica* em presença de gotícula de limoneno (seta) durante sua bioconversão. Aumento de 1000x (representação gráfica do próprio autor). 36
Figura 8. Esquema do mecanismo de ação do citocromo P450. SH representa o substrato e SOH o produto da reação (Adaptado de Sakaki e Inouye, 2000). 38
Figura 9. Representação esquemática do vaso de fermentação agitado. No qual (a) representa a forma de aeração convencional e (b) aeração de superfície (adaptado de goo.gl/j2gjGU – acessado em 10/03/2018)..... 51
Figura 10. (**a**) Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* em frascos agitados utilizando meio YMB e (**b**) produção de ácido e álcool perílico em 24 h de bioconversão do limoneno. Condições experimentais: limoneno 0,16% v/v, 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, utilizando *Y. lipolytica* cultivada previamente por 12, 20, 24, 42 e 48 h em meio YMB. 55
Figura 11. Produção de ácido perílico a partir da bioconversão do limoneno (0,16% v/v) utilizando células da levedura *Y. lipolytica* após 48 h de bioconversão para uma nova etapa de bioconversão do limoneno em frascos agitados. 58
Figura 12. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 24 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,1..... 61

Figura 13. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 48 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,1.....61
Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 54 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,1. (Q) representa os coeficientes quadráticos das variáveis e (L), os lineares.....65
Figura 15. Superfícies de resposta e curva de contorno para o crescimento celular após 54 h em função da concentração peptona e glicose (a), extrato de levedura e glicose (b) e extrato de levedura e peptona (c). A concentração do extrato de malte foi mantida em 1,0 g/L.....66
Figura 16. Perfil de concentração de massa celular nos meios de cultivo YMB (controle), MO e MOsM otimizados pelo DCCR. Os asteriscos acima dos pontos nas curvas significam diferença estatisticamente significativa, entre os três fatores, de acordo com o teste ANOVA de fator único, seguido de teste de Tukey, ($p > 0,05$). A barra de erros significa o desvio padrão da média. 69
Figura 17. Comparação da concentração de ácido perílico produzido por *Y. lipolytica* cultivada nos meios de cultura YMB, MOsM e MO, com duas aplicações de R-(+)-limoneno 0,16% (v/v) e concentração celular inicial de 20 g/L em tampão fosfato de sódio pH 7,0 50 mM. As letras iguais acima das barras significam diferença insignificante de acordo com o teste ANOVA de fator único, seguido de teste de Tukey ($p<0,05$). A barra de erros significa o desvio padrão da média. 70
Figura 18. Perfil de produção de surfactante durante a etapa de bioconversão do limoneno por Y. lipolytica em até 48 h, utilizando Y. lipolytica cultivada previamente em YMB, MOsM e MO Condições experimentais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (em 0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM. Experimento em duplicata.....72
Figura 19. Perfil do rendimento molar ácido perílico/limoneno em até 48 horas de bioconversão para os 11 ensaios do DCCR. 74
Figura 20. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento molar da produção de ácido perílico (%) em função das concentrações de limoneno (% v/v) e de massa celular (g/L). 77
Figura 21. Bioconversão do limoneno em 48 h, utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* nativa, adaptada (30ª passagem) e adaptada induzida durante o cultivo pela adição de limoneno 0,02 % (v/v). Condições reacionais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, 48 h. 80
Figura 22. Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* nativa (**a**), adaptada (30ª passagem) (**b**) e adaptada (30ª passagem) induzidas com 0,02% de limoneno (**c**), após

cultivo por 48h em meio YMB. Aumento de 1000x utilizando microscópio ótico Nikon modelo Eclipse E200. 82
Figura 23. Bioconversão do limoneno em 48 h, utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* nativa, *Y. lipolytica* nativa induzida durante o cultivo pela adição de limoneno 0,02 % (v/v), adaptada (30ª passagem) e adaptada induzida, após estocagem a -80°C por 10 meses. Condições reacionais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, 48 h. 83
Figura 24. Cinética da produção de massa celular de *Y. lipolytica* e concentração de glicose em meio otimizado em biorreator por batelada alimentada em pulsos. Nos tempos assinalados pelas setas, foram adicionados 50 mL de meio otimizado concentrado 10 vezes. 85
Figura 25. Produção de ácido perílico pela levedura *Y. lipolytica* crescida em biorreator instrumentado (meio MO, em batelada alimentada). Fermentador: bioconversão conduzida em biorreator, a partir da centrifugação das células e ressuspensão em tampão fosfato pH 7,0; Controle: corresponde a bioconversão convencional; Adição direta de limoneno: corresponde a bioconversão realizada sem a centrifugação das células, ou seja, o limoneno foi adicionado diretamente ao meio de cultura após ajuste do pH do meio a 7,0. 88
Figura 26. Bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado com aeração de superfície. Condições operacionais: 20 g/L de massa celular, pH 7,0, 1% de saturação de oxigênio, pO2 de 1%, taxa de aeração de 0,5 vvm e com adição de 0,16% (v/v) de limoneno a cada 24 h (indicada pelas setas vermelhas). Média dos resultados do experimento realizado em duplicata. 91
Figura 27. Bioconversão do óleo essencial em biorreator instrumentado com aeração de superfície. Condições operacionais: 20 g/L de massa celular, pH 7,0, 1% de saturação de oxigênio, pO2 de 1%, taxa de aeração de 0,5 vvm e com adição de 0,16% (v/v) de limoneno a cada 24 h (indicada pelas setas vermelhas). 94

1. INTRODUÇÃO

O *R*-(+)-limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hex-1-eno, é um monoterpeno monocíclico presente em óleos essenciais de diversas espécies de plantas aromáticas e cítricas, como o limoeiro e a laranjeira (AMARAL et al., 2007). O óleo essencial de laranja, obtido diretamente do epicarpo do fruto, contém de 90 a 96% de *R*-(+)-limoneno. O Brasil é o maior produtor mundial de cítricos, destacando-se por sua produção de laranjas de 14,3 milhões de tonelada em 2017, o que representa cerca de 21% da produção mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). A produção mundial de limoneno é estimada em 70.000 toneladas ao ano e seu preço de exportação situa-se em torno de US$ 3,19/kg (KERTON e MARRIOTT, 2013; ALICEWEB, 2015), sendo este composto utilizado principalmente nas indústrias química e alimentícia.

O limoneno é reconhecido como um agente anticâncer, com ações quimiopreventivas e quimioterapêuticas. Sua eficácia durante os estágios de iniciação e progressão da carcinogênese foi demonstrada em diversos tumores (CHOW et al., 2002). Entretanto, a alta dose requerida (1000 mg/kg/dia) limita sua utilidade clínica (BOIK, 2001).

Recentemente, determinados derivados metabólicos do limoneno, como o álcool perílico e o ácido perílico, passaram a ser investigados por sua ação antitumoral (BOIK, 2001). O álcool perílico apresenta efetividade no tratamento de gliomas malignos recorrentes e outros tipos de câncer (XU et al., 2004, da FONSECA et al., 2006a), tendo seu uso terapêutico evoluído para testes clínicos em Fase II (da FONSECA et al., 2006b, da FONSECA et al., 2007).

A pressuposição de que o ácido perílico também apresentaria atividade anticâncer surgiu a partir do mecanismo aceito para estes monoterpenos como inibidores da prenilação de proteínas em células cancerosas (GELB et al., 1995). Este mesmo mecanismo ocorre a nível celular em seres humanos, sendo detectada a presença apenas do ácido perílico no plasma humano após administração do limoneno (CHOW et al., 2002) ou do álcool perílico (YERUVA et al., 2002). Em conformidade, o ácido perílico demonstrou ser eficaz numa gama de ensaios antitumorais *in vitro* (YERUVA et al., 2007).

Devido à dificuldade de se realizar a oxidação, por via química, do grupo metílico exocíclico da molécula do limoneno visando a obtenção seletiva de seus derivados perílicos, a bioconversão se configura como uma alternativa de grande interesse. As bioconversões, utilizando células íntegras ou enzimas isoladas, oferecem vantagens técnicas, econômicas e ambientais, quando comparadas com a síntese química, como (i) formação de produtos com

quimio, regio e enantiosseletividade e menor formação de subprodutos, (ii) uso de condições brandas de reação, levando a um menor consumo de energia e (iii) geração de resíduos de baixo risco ambiental. Assim, os processos de biotransformação têm sido amplamente estudados para a produção de moléculas de alto valor agregado e de difícil obtenção por vias sintéticas convencionais (LIESE et al., 2006). Os processos que utilizam células íntegras são especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofator, pois a própria célula possui a maquinaria para promover a regeneração de moléculas como NADH e NADPH (LIESE et al., 2006).

Entretanto, a ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, e a baixa tolerância a altas concentrações de substratos e produtos tóxicos são um desafio para o uso de micro-organismos em processos de biotransformação (FERRARA et al., 2007). Considerando o uso do limoneno como substrato em bioprocessos, a sua baixa solubilidade em fase aquosa e o efeito inibidor do limoneno e do ácido perílico em altas concentrações podem levar a uma diminuição considerável nas taxas de rendimento do processo (MARS et al., 2001). Diferentes alternativas podem ser utilizadas para diminuir tais efeitos inerentes ao processo de biotransformação microbiana, como o emprego de batelada alimentada, visando atenuar os efeitos inibitórios do substrato, e a utilização de linhagens microbianas mais resistentes a elevadas concentrações do substrato, selecionadas por adaptação evolutiva (REYES, et al., 2014; MIRATA et al., 2009).

A bio-oxidação seletiva do *R*-(+)-limoneno visando a obtenção de derivados perílicos tem sido investigada nas últimas décadas, já tendo sido relatadas transformações utilizando as bactérias. (DUETZ et al., 2003; MIRATA. et al., 2009; van BEILEN et al., 2005). A levedura *Yarrowia lipolytica* (van RENSBURG et al., 1997) também tem sido estudada devido ao seu grande interesse biotecnológico, uma vez que esse micro-organismo é capaz de metabolizar lipídios e hidrocarbonetos, como o limoneno.

O presente trabalho integra uma linha de pesquisa desenvolvida em parceria entre Farmanguinhos/ FIOCRUZ e o Instituto de Química/UFRJ, que visa o desenvolvimento de um medicamento para o tratamento de câncer com base em compostos perílicos. Como resultados anteriores deste projeto, a levedura *Y. lipolytica* foi selecionada por fornecer os maiores rendimentos em ácido perílico a partir do limoneno. O produto da bioconversão é estável e majoritário. Os rendimentos do processo, entretanto, ainda são considerados baixos, embora progressos nesse sentido já tenham sido alcançados (FERRARA et al., 2013; TAPPIN et al., 2016).

Na sua fase atual, o projeto vem explorando a transformação do ácido perílico em seus sais perilatos, moléculas hidrossolúveis que tem facilitada a administração por várias formas farmacêuticas, sendo esta uma grande vantagem do ponto de vista de desenvolvimento de um fármaco. Os sais perilatos têm sido preparados nos laboratórios de pesquisa de Farmanguinhos via uma síntese envolvendo, como primeira etapa, a biotransformação do limoneno em ácido perílico. Em uma segunda etapa química, o ácido perílico é convertido em seu sal perilato. Com base no processo de obtenção e nos resultados promissores de atividade antitumoral, foram protocoladas solicitações de patente no País e no exterior (União Europeia, China e Estados Unidos).

Neste contexto, o presente trabalho enfoca a bioconversão do limoneno a ácido perílico utilizando a levedura *Y. lipolytica* como agente catalítico e tem como proposta a otimização do bioprocesso e a sua transposição para o uso de óleo essencial de laranja como matéria-prima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terpenos

Os terpenos formam a maior classe de produtos naturais, ou metabólitos secundários de origem vegetal, podendo ser extraídos de sementes, flores, folhas, raízes e madeira de plantas superiores (SIMÕES et al., 2001). Esses compostos podem ser definidos como "alcenos naturais" por apresentarem uma dupla ligação carbono-carbono, sendo caracterizados como hidrocarbonetos insaturados (MCMURRY, 2011). Terpenos que contenham oxigênio em sua composição são classificados como terpenóides, podendo apresentar diferentes funções químicas, como ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (FELIPE E BICAS, 2016).

A estrutura elementar de todos os terpenos ou terpenóides é composta de blocos de moléculas de cinco carbonos, conhecidos como unidades de isopreno $(C_5H_8)_n$. Essas unidades são provenientes do isopentenil pirofosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Este último origina os diferentes terpenos por meio de duas rotas metabólicas distintas, as vias do mevalonato e do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP) (KITAOKA et al., 2015).

As unidades de isopreno são encontradas, em maior parte, ligadas entre si por ligações do tipo "cabeça a cauda" (ligação 1-4), como demonstrado na Figura 1a. Os terpenos podem apresentar ainda uma estrutura de ligação "cauda a cauda" (ligação 4-4), representado na Figura 1b, como encontrada nos terpenos irregulares, e, por fim, podem apresentar uma estrutura cíclica, como o limoneno. Assim, os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que sua estrutura possui, classificação conhecida como "regra do isopreno" (Tabela 1) (KRIVORUCHKO e NIELSEN, 2014; HANSON, 2013; DEWICK, 2002).

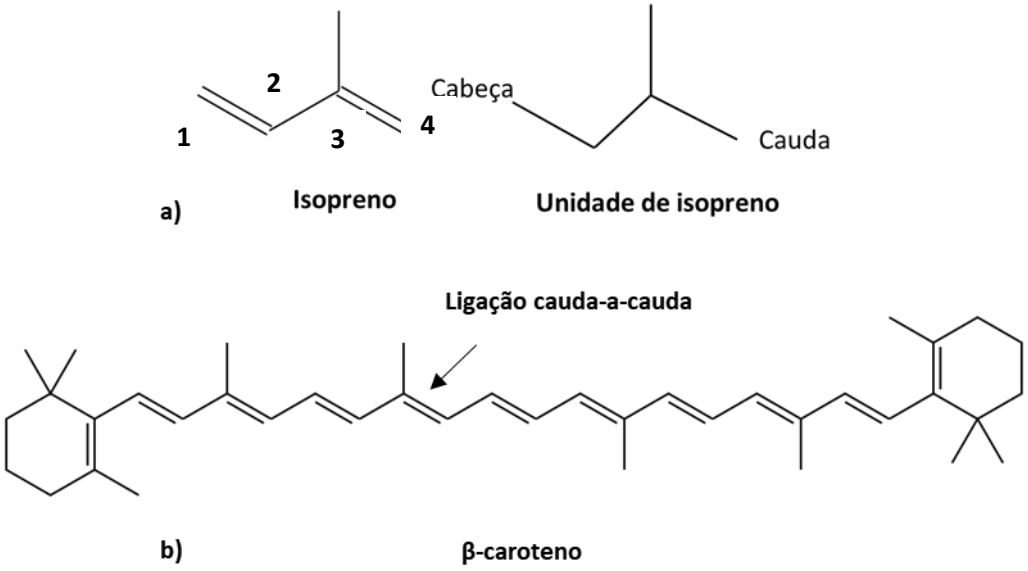


Figura 1. Unidade básica de formação dos terpenos.

Tabela 1. Classificação dos terpenos com base na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos (adaptado de FELIPE e BICAS, 2016).

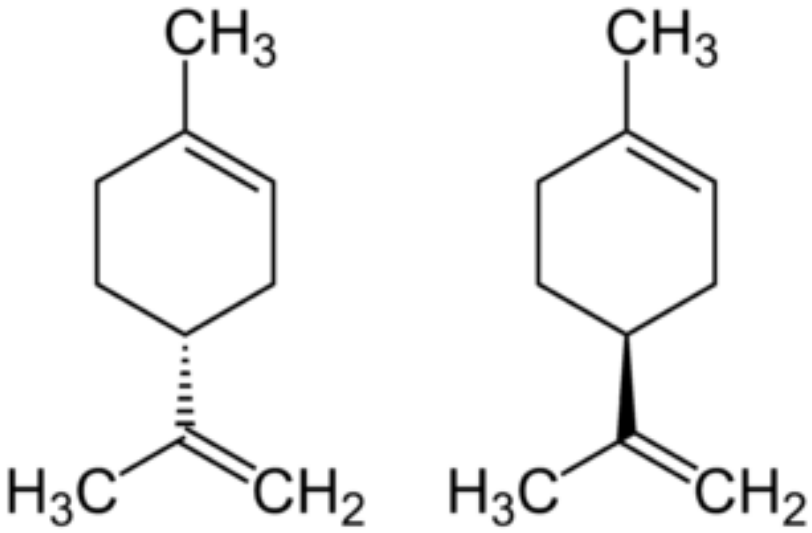
Classificação	Isoprenos	Número de carbonos	Exemplos e aplicação
Hemiterpenos	1	5	Isopreno (monômero empregado na fabricação de borracha), prenol (odor frutado utilizado em perfumes) e ácido isovalérico (essência de queijo)
Monoterpenos	2	10	Limoneno (aroma característico de fruta cítrica) e α-terpineol (aroma característico floral/pinho)
Sesquiterpenos	3	15	Farneseno (“diesel da cana”), nootkatona (aroma característico de toranja) e bisabolol (essência de camomila)
Diterpepenos	4	20	Esteviosídeo (produção de adoçante natural a base de stevia) e sclareol (proveniente da sálvia - *Salvia sclarea*)
Politerpenos	>8	>40	Látex (borracha natural)

Os monoterpenos são os compostos terpênicos mais frequentes em óleos voláteis, compondo cerca de 90% de sua massa total, seguidos pelos sesquiterpenos em concentração bem inferior. Os monoterpenos e sesquiterpenos, devido a suas estruturas terpênicas de menor

massa molecular, apresentam volatilidade acentuada e representam o aroma característico de alguns produtos naturais, particularmente de frutas cítricas e de ervas aromáticas (FARKAS e MOHÁCSI-FARKAS, 2014). Outros terpenóides, como os diterpenos, são geralmente encontrados em óleos vegetais extraídos com solventes orgânicos; por serem unidades terpênicas pouco voláteis, esses compostos são excluídos do grupo dos óleos essenciais (CROTEAU, 1987; TYLER et al., 1996).

2.2 Limoneno

O limoneno é um hidrocarboneto, classificado como um terpeno. A nomenclatura oficial IUPAC da molécula é 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hex-1-eno. Por possuir um centro quiral, o limoneno apresenta isomeria ótica, resultando em dois enantiômeros: o levógiro (L-limoneno) ou *S*-(-)-limoneno; e o dextrógiro (D-limoneno) ou *R*-(+) limoneno cíclico (MISRA et al., 1996), conforme apresentado na Figura 2.



R-(-)-limoneno *S*-(+)-limoneno

Figura 2. Estrutura química do *R*-(+) limoneno e *S*-(-)-limoneno (adaptado de pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Os dois enantiômeros do limoneno são os monoterpenos mais abundantes na natureza. *R*-(+)-limoneno está presente nos óleos das cascas de limão e laranja e no óleo essencial de alcarávia, tendo nos vegetais as funções de prevenir a desidratação e inibir o crescimento

microbiano, enquanto que *S*-(-)-limoneno é principalmente encontrado em várias plantas e ervas, como *Mentha* spp (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001).

No caso dos óleos essenciais de cítricos, em geral, o *R*-(+)-limoneno é o seu componente majoritário, representando cerca de 90 a 96% de sua composição (NONINO, 1997; BERGER et al., 2002), como pode ser observado na Tabela 2. Adicionalmente, diversos outros compostos podem estar presentes em quantidades minoritárias; no óleo de laranja, por exemplo, foram identificados mais de 220 componentes distintos, sendo aproximadamente 2% de aldeídos (principalmente octanal e decanal), 0,8% de álcoois (linalol é o mais comum), 0,3% de ésteres e 1% de compostos não voláteis (carotenoides, tocoferóis, flavonoides, ácidos graxos, esteróis e hidrocarbonetos) (SAWAMURA, M, 2010).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial da laranja (Marostica, 2007).

Composto	Percentual (%)
Limoneno	94,29
Mirceno	1,21
Carvona	1,12
Carveol	0,72
Dihidromirceno	0,55
α-pineno	0,53
Desconhecido	0,36
Terpineno	0,20
Z-citral	0,17
Oxido de limoneno	0,15
Trans-p-2,8 mentadien-1-ol	0,10

O óleo essencial de laranja pode ser obtido a partir origens distintas, podendo ser obtido de subprodutos da indústria de suco de laranja (*Citrus sinensis* ou *Citrus aurantium*), por prensagem a frio de cascas de laranja ou ainda por extração utilizando solventes orgânicos (PIRES et. al., 2018). O processo mais utilizado para sua obtenção é a extração utilizando solventes orgânicos, como o hexano (Figura 3) (MONCADA et al., 2014). Esse óleo é amplamente empregado na indústria química, no preparo de bases para bebidas e perfumes. Na indústria de cosméticos e perfumaria, o citral, um aldeído que pode ser isolado a partir do óleo essencial de laranja, é utilizado como matéria-prima na produção de iononas (aroma e fragrância) devido à presença de *R*-(+)-limoneno (BIZZO et al., 2009).

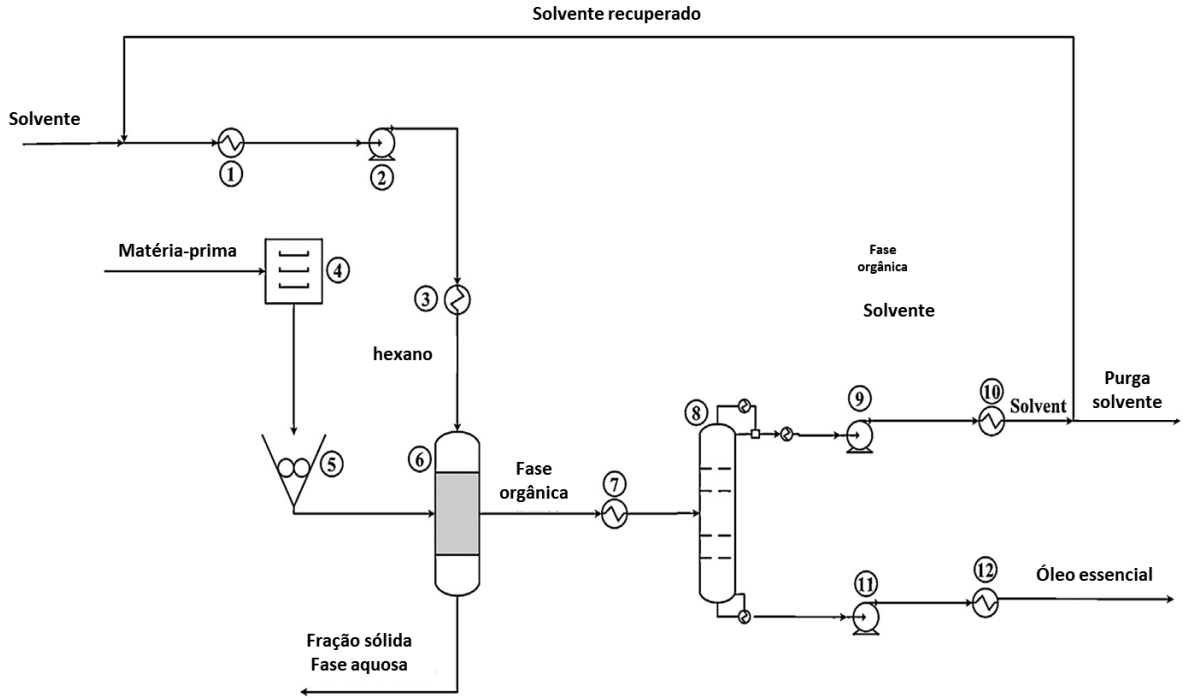


Figura 3. Diagrama de fluxo simplificado para a extração de óleos essenciais de laranja com solventes. (1) trocador de calor, (2) bomba, (3) trocador de calor, (4) moinho, (5) coluna de extração, (6) trocador de calor, (7) coluna de destilação a vácuo, (8) bomba, (9) trocador de calor, (10) bomba e (11) trocado de calor (adaptado de MONCADA et al., 2014).

O Brasil é considerado referência mundial no que tange à produção de óleos essenciais, e seus maiores mercados consumidores são os EUA (40%), seguido pela União Européia (30%) e pelo Japão (7%), segundo a UNComtrade – "United Nations Commodity Trade Statistics Database". O mercado mundial de óleos essenciais está estimado em US$ 15 milhões/ano, com crescimento aproximado de 11% ao ano (UNComtrade, 2015). Adicionalmente, cerca de 45 mil toneladas de *R*-(+)-limoneno são obtidas anualmente como subproduto da indústria cítrica, com projeções para atingir até 65 mil toneladas no ano de 2023, sendo o Brasil o principal fornecedor deste produto no mundo (Global Market Insight, 2015; Berger et al 2002). Apesar do destaque, o Brasil sofre problemas crônicos, como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos e baixos investimentos governamentais no setor (BIZZO et al., 2009).

O limoneno purificado também é empregado na indústria química, sendo utilizado como solvente para resinas, na síntese de outros compostos químicos, na fabricação de borracha e tintas, como agente dispersante para óleo e na síntese química do mentol (ABECITRUS, 2015). O limoneno purificado para ser empregado na indústria química é obtido pela remoção de compostos oxidantes a partir do licor de prensagem extraído durante a fabricação de farelo

de polpa cítrica, quando ocorre a moagem dos resíduos com ajuste do pH através da adição de óxido de cálcio. Este licor passa, em seguida, por uma bateria de peneiras para a remoção de sólidos e posteriormente é enviado para um evaporador de múltiplo efeito, sendo o *R*-(+)-limoneno recolhido no 2º estágio. O condensado recuperado é composto por água e limoneno; quando deixado em repouso, ocorre a separação deste último devido à sua baixa solubilidade em água (MUNHOZ e MORABITO, 2010).

Alguns derivados oxigenados do limoneno apresentam grande interesse industrial, como α-terpineol, carveol, carvona, mentol e os compostos perílicos. O α-terpineol, que tem aroma floral intenso e é um importante produto para a área de cosméticos, é encontrado em óleos essenciais obtidos de coníferas e óleos de lavanda; entretanto, diversos grupos relatam sua obtenção por biotransformação microbiana (KRAIDMAN et al., 1969; TAN e DAY, 1998, MAROSTICA Jr. e PASTORE, 2007). O carveol e a carvona, obtidos a partir da oxidação do carbono 6 do limoneno, parecem atuar no organismo humano como antioxidantes e, segundo recentes investigações, estão presentes em várias formulações que atuam como coadjuvantes para tratamento e prevenção do processo de envelhecimento (KAWASAKI e KOKAKI, 2004). O mentol é extensivamente utilizado na indústria de aromas e em especial para alimentos (MAROSTICA Jr. e PASTORE, 2007).

O álcool perílico (4 isopropenil-1-ciclohexenometanol), o perilaldeído (4-prop-1-en-2-ylcyclohexeno-1-carbaldeído) e o ácido perílico [4-(1-metiletenil)-1-ciclohexeno-1-carboxilato] podem ser obtidos a partir da oxidação do grupo metil exocíclico da molécula do limoneno (carbono 7), de acordo com a reação indicada na Figura 4. Traços ou quantidades pequenas de álcool perílico podem ser detectados em óleos essenciais de lavanda, hortelã, hortelã-pimenta, sálvia, cereja, *cranberry*, shiso (*Perilla frutescens*), capim-limão, bergamota selvagem, palmorosa, sabina-rasteira, alcaravia e sementes de aipo enquanto que o perilaldeído ocorre naturalmente na planta *Perilla frutescens* (BATHAIE e TAMANOI, 2014). Os compostos perílicos apresentam atividades biológicas diversas, em especial atividade antitumoral, conforme detalhado a seguir.

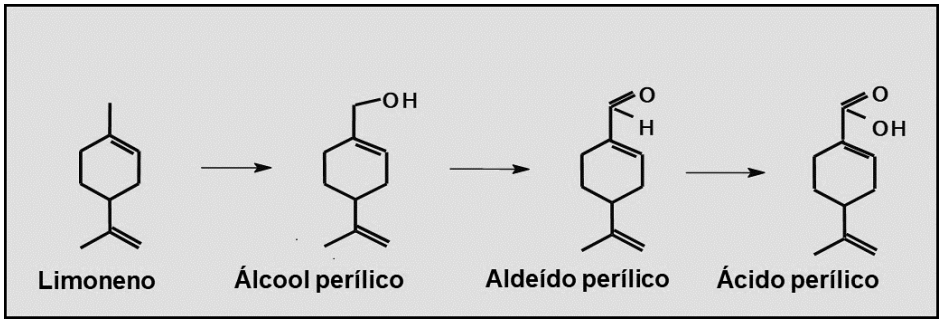


Figura 4. Estrutura química do limoneno e de seus derivados perílicos (adaptado de MIRATA et al., 2009).

2.3. Ação anticâncer de derivados perílicos

Diferentemente do mecanismo de ação de drogas quimioterápicas usuais, os compostos naturais atuam inibindo a proliferação das células tumorais, regularizando a atividade dos sinais envolvidos no crescimento celular, tais como: instabilidade genética, expressão anormal de genes, transdução anormal de sinal, comunicação intercelular anormal e angiogênese, sem alterar as propriedades estruturais das células normais (da FONSECA et al., 2003). A nova geração de drogas com menor grau de toxicidade e maior poder de ação em nível molecular, que não causam danos ao DNA e inibem a transdução do sinal com a consequente inibição da expressão gênica, tem mostrado efeitos quimioterápicos em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os terpenos são exemplo de compostos naturais com propriedades antimitóticas de grande interesse na atualidade (da FONSECA et al., 2003).

Os monoterpenos podem atuar antes do estabelecimento do câncer e, nos casos em que a doença já estiver desenvolvida, podem causar regressão do tumor. Esses compostos parecem inibir a isoprenilação de produtos celulares (Ras 16) da oncogênese. As proteínas da oncogênese, que são proteínas reguladoras do crescimento celular, precisam sofrer modificação pós-traducional, de acordo com o processo de isoprenilação, para serem alocadas em uma membrana de forma a apresentarem atividade. A Ras possui um papel importante na transdução do sinal e é encontrada em sua forma oncogênica em 30% a 40% das neoplasias, com maior frequência nos pacientes com tumores pancreáticos e nos pacientes com câncer de cólon (BOIK, 2001 e da FONSECA, 2005). A ativação da Ras aciona a cascata de fosforilação das serina e treonina quinases, como a RAF, e das quinases ativadas por mitógenos (*MAPK*), que são responsáveis pela fosforilação de várias proteínas citosólicas e nucleares, incluindo fatores de transcrição responsáveis pela proliferação celular. Consequentemente, essas proteínas ativam a via de transdução da sinalização de fatores de crescimento associados com a neo-angiogênese

(LOUTRARI et al., 2004; FERNANDES, et al., 2005; CHAUDHARY et al., 2009), conforme representado na Figura 5.

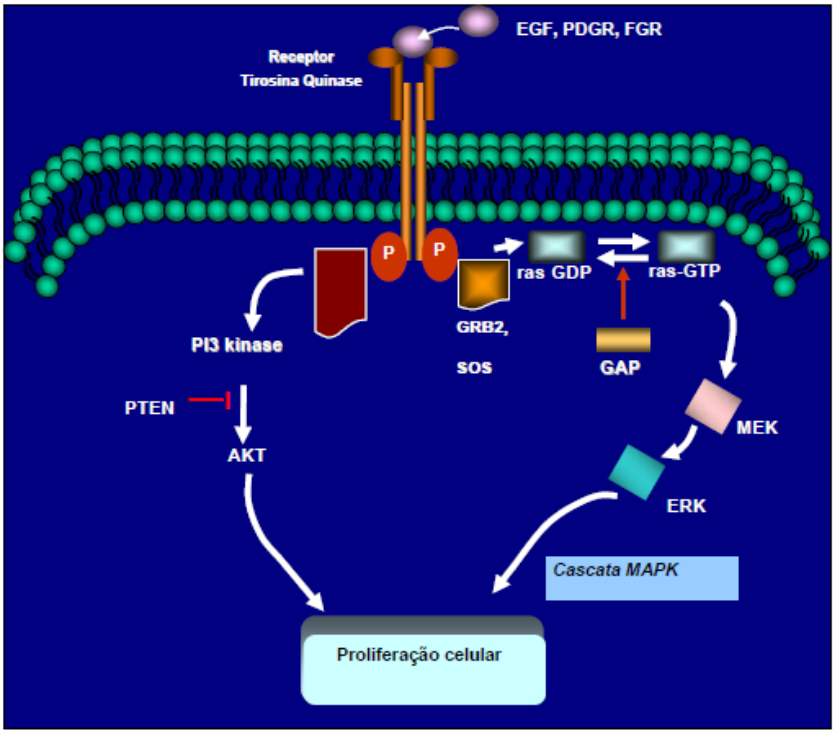


Figura 5. Ativação da cascata das quinases: serina/treonina quinases (RAF, MEK) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (adaptado de SILVA, 2010).

Atualmente, os estudos envolvendo derivados terpênicos com atividade anticâncer têm sido concentrados no álcool perílico, com estudos pré-clínicos e clínicos em estágio avançado. Alguns autores, como Fonseca (2003), relatam que a regressão completa de tumores mamários induzidos em ratos pelo carcinógeno 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) foi obtida na terceira semana de tratamento com álcool perílico 2% (p/v) na dieta. Resultados semelhantes foram obtidos para tumores de fígado induzidos em ratos com o carcinógeno dietil-nitrosoamino e uma dieta com o álcool perílico 2% (p/v) (HAAG e GOULD, 1994).

Com relação aos estudos clínicos com álcool perílico, grandes avanços no tratamento de glioblastoma multiforme (GBM) têm sido relatados (FONSECA et al., 2003, da FONSECA et al., 2014). Este tipo de câncer é considerado de elevada malignidade e altamente agressivo, sendo mais letal no primeiro ano após o diagnóstico inicial, mesmo após intervenção terapêutica (ALI et al., 2015). A sobrevida média dos pacientes diagnosticados com GBM é de 12 a 15 meses. Os pesquisadores realizaram estudo exploratório de inalação do álcool perílico em fase clínica II, tendo esse demonstrado atividade antitumoral parcial, com redução da massa tumoral e aumento da sobrevida para mais de cinco anos em alguns casos (da FONSECA, 2005).

Sabe-se que *in vivo* o álcool perílico é rapidamente metabolizado a ácido perílico e ácido di-hidroperílico, que parecem representar os componentes ativos capazes de mediar a comunicação entre o ambiente extracelular e intracelular, através da ativação de várias vias de transdução de sinais. Segundo da Fonseca et al. (2017) e Teiten et al. (2012), o ácido perílico seria capaz de induzir as mesmas respostas obtidas pelo álcool perílico no tratamento anticâncer, com uma maior meia vida plasmática devido à sua não volatilidade (FERNANDES et al., 2005). Testes in vitro desmostraram que o ácido perílico inibe a proliferação de células de câncer de pulmão (YERUVA et al., 2007).

2.4. Biotransformação

Biotransformação ou bioconversão pode ser definida como o uso de sistemas biológicos para produzir mudanças químicas em compostos que não são seus substratos naturais. Células íntegras ou sistemas enzimáticos isolados podem ser utilizados para biotransformação, podendo estes estar na forma livre ou imobilizada (ISHIGE et al., 2005). O uso de células íntegras, de micro-organismos ou plantas, apresenta como vantagens a maior estabilidade do biocatalisador, que está confinado no ambiente celular, a possibilidade de realizar reações sequenciais e a capacidade de regenerar co-fatores, fator esse essencial nas reações de oxirredução. Em contrapartida, o controle e a reprodutibilidade do processo são mais difíceis de alcançar do que com processos enzimáticos, e reações paralelas costumam ocorrer; além disso, o substrato ou o produto podem ser tóxicos à célula (CARVALHO e FONSECA, 2006). Os sistemas enzimáticos isolados, por outro lado, utilizam reatores mais simples e apresentam maior tolerância ao uso de solventes orgânicos. Entretanto, existe a necessidade de isolar e purificar a enzima de interesse ou adquirir no mercado a um custo, em geral, muito elevado (FERRARA et al., 2017).

Os processos de biotransformação apresentam diversas vantagens quando comparados aos métodos químicos correspondentes: as enzimas apresentam elevada especificidade, gerando produtos com quimio, regio e enantiosseletividade, utilizam condições reacionais brandas e, na maioria dos casos, não há necessidade de proteção de outros grupos funcionais. Além disto, esses processos permitem funcionalizar posições em cadeias carbônicas difíceis de serem alcançadas através de técnicas tradicionais (ISHIGE et al., 2005; SANCHEZ e DEMAIN, 2011). Como consequência, esses processos biológicos minimizam ou mesmo eliminam a formação de subprodutos, diminuindo os custos das etapas de isolamento e purificação;

apresentam menor consumo energético; e resultam em menor impacto ambiental (CARVALHO e FONSECA, 2006).

Devido às suas características inerentes, os processos de biotransformação de compostos orgânicos, além de despertar o interesse acadêmico, vem ganhando espaço em diversos setores industriais, como o de alimentos, produtos para agroindústria, cosméticos e, em especial, o de fármacos, devido à enantiosseletividade das reações catalisadas (PARSHIKOV et al., 2015).

2.4.1. Estratégias para superar limitações dos processos de bioconversão

De uma forma geral, os processos de bioconversão apresentam limitações relacionadas à baixa solubilidade em meio aquoso (característicos dos sistemas biológicos) de grande parte dos substratos e produtos de interesse. Outros fatores importantes são: possibilidade de inibição da reação pelo substrato ou pelo produto; instabilidade e falta de flexibilidade do biocatalisador; baixa concentração do produto; baixos rendimentos; e baixa produtividade (FERRARA et al., 2017).

Diversas estratégias podem ser empregadas para contornar essas limitações. A solubilidade aquosa de substratos pode ser aumentada pela adição ao meio reacional de detergentes, como Tween 80 ou Tween 20, ou de solventes orgânicos miscíveis com água, como metanol, etanol, acetona, isopropanol ou dimetilformamida. Podem ainda ser empregados sistemas reacionais em duas fases, sendo uma aquosa e a segunda constituída de um solvente orgânico apolar (tolueno, ciclohexano, éter metil-*t*-butílico, entre outros). Estes sistemas permitem que substratos e produtos apolares sejam fornecidos ou retirados gradativamente do meio aquoso, reduzindo um possível efeito tóxico ou inibidor ao biocatalisador (FERRARA et al., 2017; MIRATA et al., 2009). Em adição, permitem separar de maneira relativamente fácil o catalisador, ao final do processo, uma vez que este permanece na fase aquosa, e reduzir o risco de contaminação microbiana. Braun e colaboradores (2012), por exemplo, estudaram a bioconversão de progesterona em sistema bifásico água/oleato de etila utilizando células íntegras de *Y. lipolytica* recombinante em biorreator de 1,5 L, alcançando taxa de hidroxilação específica inicial duas vezes maior quando comparado com a bioconversão em meio aquoso.

Da mesma forma, os processos de bioconversão podem ser otimizados com a utilização dos chamados líquidos iônicos, sais formados por cátions e ânions orgânicos ou inorgânicos líquidos a temperatura ambiente (CULL et al., 2000; van RANTWIJK, 2003).

A imobilização do catalisador tem sido mais uma ferramenta bastante útil em aplicações industriais por possibilitar o aumento da estabilidade do biocatalisador e facilitar a sua separação do meio reacional (SANCHEZ e DEMAIN, 2011).

Para o caso de substratos tóxicos ou que causem inibição ao sistema enzimático, como por exemplo o limoneno, podem ser empregados processos em batelada alimentada, no qual o substrato é adicionado gradativamente ao reator (FERRARA et al., 2017; MIRATA et al., 2009).

Por outro lado, produtos deletérios podem ser removidos e recuperados *in situ* através do uso, por exemplo, de resinas adsorventes. Nesse sentido, Mirata e colaboradores (2009) alcançaram um aumento expressivo no rendimento da bioconversão do limoneno por *Pseudomonas putida*, através do emprego de uma coluna de troca iônica para retirar o produto ácido perílico do meio reacional.

2.4.2. Biotransformação do limoneno

A disponibilidade de grandes quantidades de *R*-(+)-limoneno de baixo custo (US$ 1–2/kg) despertou o interesse de químicos e biólogos por essa molécula. Isso se explica, principalmente, pelo fato de alguns compostos medicinais e de aroma possuírem fórmulas estruturais semelhantes ao limoneno, sugerindo grande potencial para utilização industrial deste subproduto da agroindústria (DUETZ, et al., 2003). Em especial, o álcool perílico e o ácido perílico, conforme mencionado acima, vêm ganhando destaque crescente devido ao seu potencial antineoplásico. Assim sendo, a biotransformação de *R*-(+)-limoneno em derivados oxigenados tem sido considerada promissora desde os anos 60 por sua elevada regio e enantioespecificidade, levando à descrição de numerosos micro-organismos, células de plantas e enzimas isoladas utilizadas para este fim (DUETZ, et al., 2003).

Estudos já vêm descrevendo a biotransformação do limoneno para a obtenção de derivados perílicos por linhagens de leveduras, fungos filamentosos e, principalmente, por bactérias, tendo sido o primeiro relato de biotransformação do limoneno a compostos perílicos realizado por Dhavalikar e Bhattacharyya (1966). Não obstante, há descrita a biotransformação utilizando uma linhagem de *Pseudomonas* isolada de uma amostra de solo (CADWALLADER et al., 1989).

Entretanto, a grande maioria dos estudos de biotransformação de monoterpenos descritos até o momento é acadêmica, sendo inviáveis do ponto de vista industrial. Sua aplicação direta em maiores escalas é dificultada pelos baixos rendimentos obtidos devido à

volatilidade e à toxicidade do substrato aos micro-organismos em geral (CHATTERJEE e BHATTACHARYYA 2001; MAROSTICA Jr. e PASTORE, 2007). Segundo Chatterjee e Bhattacharyya (2001), o limoneno reduz a velocidade do processo de fosforilação oxidativa nas células. O coeficiente de partição octanol:água (log P) é utilizado como parâmetro para avaliação da toxicidade de solventes orgânicos apolares para micro-organismos, tendo sido observados valores entre 1 e 5 para substâncias de elevada toxicidade. Hidrocarbonetos como o limoneno, com log P de 4,83, aumentam a fluidez das membranas de fungos, levando à permeabilidade, perda de integridade da membrana e inativação do metabolismo energético devido à dissipação da força próton motora (gradiente eletroquímico de prótons através da membrana) (Onken e Berger, 1999). A alta fluidez da membrana pode impedir a manutenção dos complexos enzimáticos ligados à membrana, como, por exemplo, o complexo formado entre o citocromo P450 mono-oxigenase e o citocromo P450 redutase dependente de NADPH, que está relacionado às transformações oxidativas de terpenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróides e outros compostos lipofílicos promovidas por fungos (ONKEN e BERGER, 1999).

2.5. A levedura *Yarrowia lipolytica*

Leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares, embora algumas leveduras se assemelhem a seres multicelulares, devido à formação de estruturas como hifas ou pseudohifas (Dickinson, 1996). As leveduras são distribuídas entre os filos Ascomycota e Basiodiomycota do reino Fungi. O gênero *Yarrowia* foi isolado e identificado em 1928 por Harrison Yarrow (KREGER-VAN-RIJ, 1984) e é considerado um dos gêneros de leveduras não convencionais mais interessantes da classe dos Hemiascomycetos do ponto de vista biotecnológico. A espécie deste gênero mais conhecida é *Yarrowia lipolytica*, classificada como um micro-organismo estritamente aeróbio, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomycetos. Esta levedura foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, como *Yarrowia lipolytica* por David Yarrow em 1972 (BARTH e GAILLARDIN, 1997; KURTZMAN et al., 2011).

Assim como outras espécies de levedura, *Y. lipolytica* apresenta polimorfismo, podendo ser encontrada sob três formas morfológicas: células de levedura ovóides, pseudo-hifas (caracterizadas por compreender uma cadeia de células alongadas com constrições visíveis posicionando o septo) e hifas septadas (filamentos lineares sem constrições visíveis) (SZABO,

1999) (Figura 6). O micélio verdadeiro consiste de hifas septadas de 3 a 5 µm de largura e até vários milímetros de comprimento; as células apicais, por exemplo, ultrapassam 100 µm, enquanto que os segmentos medem de 50 a 70 µm. Os septos se assemelham a poros centrais do tipo comum a ascomiceto e diferentes de outras leveduras filamentosas, apresentando retículo endoplasmático que se estende de um segmento ao outro. Já o núcleo celular é único a cada segmento (BARTH e GAILLARDIN,1997).

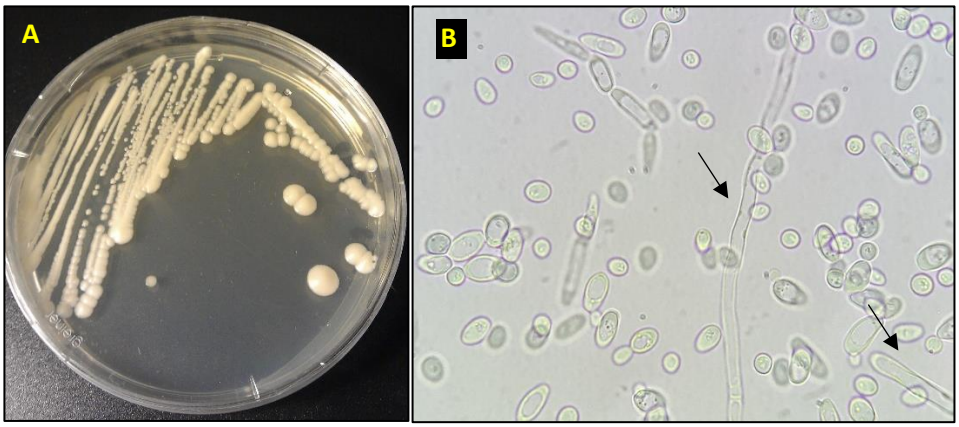


Figura 6. *Y. lipolytica* em placa de Petri (A) e micrografia ótica de *Y. lipolytica* a fresco (B) (aumento de 1000x), as setas indicam a presença de pseudohifas (representações gráficas do próprio autor).

Y. lipolytica possui a sequência genômica total dos seus seis cromossomos já determinada (DUJON et al., 2004), o que permite sua utilização em estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Considerada uma levedura não convencional, *Y. lipolytica* pode assimilar e fermentar diferentes fontes de carbono, como materiais hidrofílicos (glicose, glicerol, álcoois e acetato) e substratos hidrofóbicos (ácidos graxos, triacilgliceróis e alcanos), produzindo metabólitos importantes como ácidos orgânicos (ácido cítrico, pirúvico, succínico, entre outros) (NICAUD et al.; 2002; LIU et al., 2015). Papanikolaou et al. (2008) apresentaram um estudo que demonstra o uso eficiente de matérias-primas de baixo custo por *Y. lipolytica*, como melaço, águas residuais, óleos industriais e rejeitos contendo gorduras.

A produção de proteínas heterólogas é outro campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais, tanto para pesquisa básica como para aplicações industriais e biomédicas. Muller et al. (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de seis enzimas fúngicas. Todas as linhagens não

convencionais foram mais eficientes de que a convencional, sendo *Y. lipolytica* o hospedeiro que apresentou melhor performance e reprodutibilidade.

2.5.1. Consumo de substratos hidrofóbicos

A levedura *Y. lipolytica* pode ser encontrada naturalmente em ambientes contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981), laticínios, flora de queijos picantes (BARTH e GAILLARDIN, 1997) e produtos avícolas crus, sendo particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos (ISMAIL et al., 2001).

Acredita-se que, evolutivamente, micro-organismos que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica e, portanto, se encontra dispersa no meio sob a forma de gotas, tenham desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a esse substrato. O contato direto entre as gotas de óleo e as células, conforme representado na Figura 7, parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é transportada (ERICKSON et al., 1975). A área de contato entre o micro-organismo e o substrato inclui tanto as grandes gotas de substrato, onde o micro-organismo se adere, como as pequenas gotas, que são adsorvidas na superfície celular (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977).

Em fermentações com hidrocarbonetos, a fase oleosa é dispersa em forma de gotas na fase aquosa e a tensão interfacial, que atua entre a fase oleosa e a fase aquosa, tende a manter as gotas na forma esférica contra os estresses de cisalhamento, que tendem a deformá-la. Essas gotas coalescem entre elas continuamente e sua distribuição de tamanho depende da tensão interfacial, da fração volumétrica de hidrocarboneto e da intensidade de agitação (FICKERS, et al., 2005). A distribuição de tamanho das gotas é responsável pela área interfacial entre os dois líquidos e controla a transferência de substrato para as células. Gutierrez e Erickson (1977) observaram uma redução no diâmetro médio das gotas da fase oleosa paralelamente à redução da tensão interfacial durante a fermentação de hexadecano por *Y. lipolytica* e atribuíram o fenômeno à produção de agentes tensoativos pela levedura. De fato, Cirigliano e Carman (1984) foram capazes de detectar e isolar atividade emulsionante, capaz de estabilizar emulsões água-óleo, no meio de fermentação de *Y. lipolytica*. Esse bioemulsionante, que foi chamado de liposan, era composto de aproximadamente 83% de carboidrato e 17% de proteína, apresentando atividade emulsionante maior do que alguns emulsionantes comerciais, como goma arábica, alginato e caseína (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

Uma das principais etapas das vias de degradação de compostos hidrofóbicos em leveduras é a absorção e o transporte desses substratos para o ambiente intracelular, onde

ocorrerá a primeira oxidação, cujos mecanismos são ainda desconhecidos. Deste modo, duas hipóteses têm sido formuladas para explicar o transporte desses substratos hidrofóbicos para dentro da célula, sendo uma a produção de biossurfactantes e a outra o aumento da hidrofobicidade da superfície celular em resposta à interação com os substratos (KIM et al., 2000; FICKERS et al., 2005).

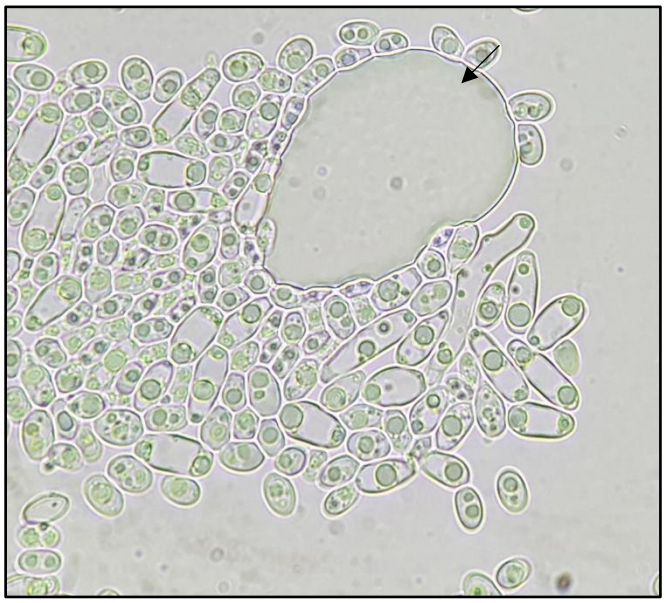


Figura 7. Microscopia ótica a fresco de *Y. lipolytica* em presença de gotícula de limoneno (seta) durante sua bioconversão. Aumento de 1000x (representação gráfica do próprio autor).

2.5.2. Citocromo P450 (CYP)

Os passos oxidativos necessários para a bioconversão de limoneno por leveduras ainda não foram identificados; no entanto, foi reportado que o processo é iniciado por mono-oxigenases da família P450 (DUETZ et al., 2003). Notavelmente, *Y. lipolytica* é uma levedura capaz de utilizar alcanos como fonte de carbono. A oxidação de alcanos primários envolve uma hidroxilação no carbono terminal, catalisada por um sistema alcano mono-oxigenase dependente de P450, seguida pela ação de enzimas oxidantes do álcool (álcool oxidases ou álcool desidrogenases) e aldeído desidrogenases, resultando no ácido correspondente (FICKERS et al., 2005). Por conseguinte, seria razoável supor que o sistema P450 seria responsável pela oxidação do limoneno por esta levedura (FERRARA et al., 2013).

Os citocromos P450 (P450 ou CYP) são uma superfamília de mono-oxigenases pertencente ao grupo das hemeproteínas que estão presentes primariamente ancoradas na

bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso e que participam da metabolização de drogas, esteroides e carcinógenos em organismos eucarióticos. Estas famílias de enzimas, além de serem encontradas em seres humanos, estão presentes em bactérias e fungos (BERNHARDT 2006; PARK et al. 2008, KELLY et al., 2009).

O termo citocromo P450 foi utilizado inicialmente em 1964 para identificar uma hemeproteína com características únicas, designando o nome do pigmento microssomal ligante ao monóxido de carbono (OMURA e SATO, 1964). A característica clássica do P450 é a posição peculiar de sua banda de Soret em 450 nm como resultado da formação do complexo Fe(II)-CO, surgindo desta constatação a denominação P450 (OMURA e SATO, 1964).

As enzimas denominadas citocromo são hemeproteínas cujo grupo prostético heme é composto por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes –CH=, formando a molécula planar porfirina. No centro desta estrutura, encontra-se um átomo de ferro, oscilando entre os estados reduzido (Fe^{2+}) e oxidado (Fe^{3+}) (JONES e POOLE, 1985).

Apesar da diversidade de substratos que podem ser oxidados e dos tipos de reação, todas as CYP450 apresentam um ciclo catalítico comum (DENISOV et al., 2005), representado na Figura 8 e que compreende: (i) ligação da enzima ao substrato, no sítio ativo (grupo heme); (ii) transferência do primeiro elétron do NADPH, via NADPH-P450 redutase, para o citocromo P450; (iii) incorporação de uma molécula de oxigênio e transferência do segundo elétron para o átomo de ferro, via NADPH-P450 redutase e citocromo b5; (iv) clivagem da ligação O−O e liberação de uma molécula de água; (v) retirada do átomo de hidrogênio do substrato e adição do grupo hidroxila; (vi) liberação do produto resultante (SAKAKI e INOUYE, 2000).

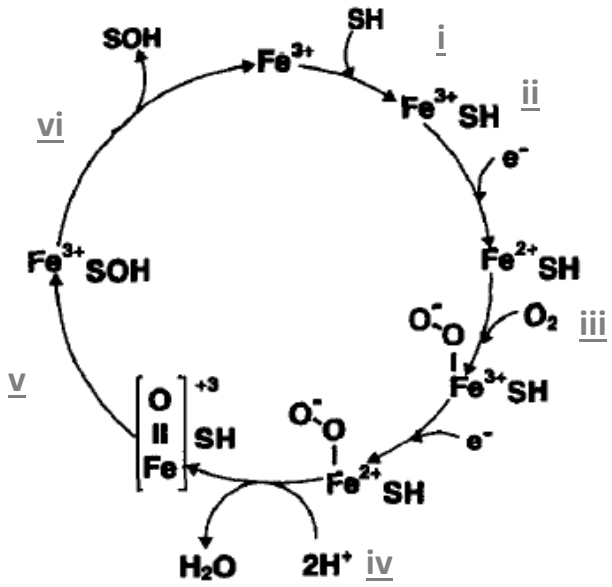


Figura 8. Esquema do mecanismo de ação do citocromo P450. SH representa o substrato e SOH o produto da reação (adaptado de SAKAKI e INOUYE, 2000).

O sítio ativo da CYP450 contém a protoporfirina IX, coordenada com o grupamento heme, situada em uma cavidade hidrofóbica na proteína. A quinta posição de protoporfirina IX é ocupada por um átomo de enxofre de uma cisteína residual, responsável pela ligação do sítio ativo à enzima; o sexto sítio de coordenação, onde ocorre a ativação do oxigênio molecular, está ligado a uma molécula de água (BERNHARDT, 2006).

As CYPs têm a capacidade de ativar os dois átomos de oxigênio que são fornecidos pelo oxigênio molecular (O_2). O oxigênio se liga ao grupamento heme que, por sua vez, está ligado fortemente à proteína através do enxofre tiolato aniônico de um resíduo de cisteína. Esse tipo de ligação à proteína permite que o grupamento heme ative a molécula de oxigênio, separando os dois átomos. Na maioria dos casos, o grupamento funcional adicionado ao substrato é uma hidroxila; contudo, as reações catalisadas pelas CYPs podem incluir também epoxidações, N-, S-, O-desalquilações, N-oxidações, sulfoxidações e desalogenações (ZUBER et al., 2002 e GIRVAN, e MUNRO, 2016).

A superfamília das CYPs inclui dezenas de famílias identificadas por um número arábico após a sigla, tais como CYP1, CYP2 e CYP3. A escolha do número pode ser arbitrária ou estar relacionada à função da família; por exemplo, a CYP21 atua como hidroxilase na posição 21 de esteroides (ANZENBACHER e ANZENBACHEROVÁ, 2001). As enzimas que constituem as subfamílias possuem maior similaridade de sequências e são identificadas por uma letra após o número que identifica a família, como, por exemplo, CYP1A, CYP2C e

CYP3A. As iso-enzimas são denominadas por um número após a identificação das subfamílias, como, por exemplo, CYP1A1, CYP2C9 e CYP3A4 (OROTIZ de MONTELLANO, 2005; de OROTIZ de MONTELLANO, 2010).

A quantidade de isoformas de CYP pode variar conforme a espécie, existindo 102 isoformas em camundongos, 74 em *Cunninghamella elegans*, 57 em seres humanos e somente 3 em *Saccharomyces cerevisae* (SELISKAR e ROZMAN, 2007). À levedura *Y. lipolytica* são atribuídos 17 genes putativos de CYP (LAH et al., 2008). As famílias CYP52 e CYP56 estão frequentemente presentes no genoma do filo Ascomycota, sendo a CYP52 especialmente fundamental no processo de bio-oxidação de cadeias hidrofóbicas de n-alcanos (CHEN et al., 2014).

A capacidade dos P450s de introduzir átomos de oxigênio em posições específicas em moléculas complexas, reações essas muitas vezes não factíveis por métodos químicos tradicionais, torna essas enzimas particularmente valiosas para aplicações biotecnológicas como desenvolvimento de fármacos, biorremediação, síntese de produtos químicos de alto valor agregado, entre outros (GIRVAN, e MUNRO, 2016).

2.6. Adaptação Evolutiva

A obtenção de linhagens de levedura evoluídas em laboratório é uma estratégia comprovadamente eficiente para diversas finalidades. Como exemplos, podemos citar a otimização do transporte de maltose em cultivos aeróbios (JANSEN et al., 2004); a metabolização de xilose e arabinose em anaerobiose plena (KUYPER et al., 2005; SONDEREGGER e SAUER, 2003; WISSELINK et al., 2009); e o aumento da tolerância ao etanol (Brown e Oliver, 1982). As ferramentas podem ser tanto cultivos descontínuos em série (bateladas repetidas), como quimiostatos, dependendo dos objetivos do estudo.

O princípio dessa estratégia baseia-se no fato de que uma população de micro-organismos, que frequentemente contém milhões de indivíduos por mililitro que se duplicam num intervalo de poucas horas, acaba sofrendo mutações após várias gerações. Dentro de um ambiente que confere pressão seletiva, as mutações que originarem indivíduos com melhores condições de desenvolvimento neste ambiente serão selecionadas. Desta maneira, as células menos adaptadas serão eliminadas destes sistemas de cultivo a cada vez que se renova o meio, nas bateladas repetidas, ou continuamente pelo sistema de retirada de meio, quando quimiostatos são utilizados. As células adaptadas, por sua vez, podem crescer nas condições adversas, evoluir ao longo do tempo e deslocar a população original como resultado do processo

de seleção natural (SAUER, 2001). O processo de adaptação de um micro-organismo, sob determinadas condições, pode ser atribuído à síntese de novas enzimas ou cofatores que permitem o metabolismo mais eficiente dos açúcares e a redução dos efeitos de quaisquer inibidores presentes no meio de cultivo (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Não há relatos na literatura até o momento sobre adaptação evolutiva de *Y. lipolytica* ao limoneno para produção de derivados perílicos. No entanto, os trabalhos de adaptação evolutiva para esta levedura objetivam o aumento da produção de lipídeos, como aquele de Liu e colaboradores (2015), que realizaram uma abordagem de engenharia metabólica evolutiva rápida ligada a um processo de enriquecimento celular flutuante para melhorar as taxas de produção e rendimentos de lipídeos. Os autores conseguiram aumentar os rendimentos em 55%, atingindo títulos de produção de 39,1 g/L com mais de 76% do rendimento máximo teórico quando comparado com a cepa nativa.

É interessante mencionar também o trabalho de Gramström, e colaboradores (2002), no qual a levedura *Candida tropicalis* foi testada para a produção de xilitol a partir de frações de bagaço de cana, obtendo-se um rendimento de 0,45 g/g (gramas de xilitol produzidas por gramas de xilose utilizada) após 25 ciclos de adaptação ao meio. Esse resultado positivo indica que a ferramenta para a adaptação pode ser empregada com resultados satisfatórios em melhoramentos de processos de bioconversão.

2.7. Panorama geral do Projeto Perilato – Parceria FIOCRUZ/UFRJ

O presente trabalho enfoca a bioconversão do limoneno a ácido perílico utilizando a levedura *Y. lipolytica* como agente catalítico. O trabalho integra o projeto ***Bioconversão de terpenos para a obtenção de agentes anticâncer,*** desenvolvido em parceria entre Farmanguinhos/ FIOCRUZ e o Instituto de Química/UFRJ e que visa o desenvolvimento de medicamento para tratamento de câncer com base em compostos perílicos. Como principais resultados deste projeto, podem ser citados:

i. Aplicabilidade do uso da levedura *Y. lipolytica*, determinada a partir de um *screening* envolvendo 13 micro-organismos;
ii. Obtenção do ácido perílico como produto majoritário da oxidação biológica do limoneno;
iii. Otimização do processo de bioconversão em nível de bancada;
iv. Estabelecimento do processo de extração e purificação do ácido perílico;

v. Transformação química do ácido perílico em seu sal sódico por razões de conveniência farmacêutica (hidrossolubilidade);
vi. Evidências da atividade anticâncer do ácido perílico e do perilato de sódio *in vitro*;
vii. Estudos de farmacocinética e de metabolização dos derivados perílicos iniciados.

Com relação à rota biotecnológica de obtenção do ácido perílico, o processo desenvolvido anteriormente engloba duas etapas: a primeira abrange a produção de biomassa celular, em condições apropriadas para tal, enquanto a segunda consiste na bioconversão do limoneno propriamente dita. A etapa de bioconversão foi otimizada por planejamento estatístico de parâmetros operacionais (pH, temperatura, concentração de limoneno e adição de nutrientes), fixando-se a concentração de massa celular. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de ácido perílico e o rendimento molar da bioconversão (que considera a produção de ácido perílico em relação à quantidade de limoneno adicionada) são concomitantemente maximizados quando se inicia a bioconversão com baixas concentrações de limoneno (0,16% v/v ou 1,3 g/L) e se realimenta o substrato após 24 h. Nestas condições, atingiu-se concentração de ácido perílico de 0,793 g/L com 48 h de bioconversão, representando um rendimento de bioconversão de 24,2 % (Tappin et al., 2017). O uso de concentrações mais altas de limoneno resultou em menor rendimento molar, atribuído à toxicidade do limoneno às células de levedura, bem como à volatilidade da molécula. Estes efeitos já haviam sido descritos em estudos anteriores de bio-oxidação de limoneno (Ferrara et al., 2013). Adicionalmente, os autores verificaram que o crescimento de *Y. lipolytica* foi inibido quando limoneno na concentração de 0,1% foi adicionado ao meio de crescimento da levedura, indicando a toxicidade do limoneno às células de *Y. lipolytica*. Esses estudos foram realizados em frascos agitados, tendo sido conduzidos apenas ensaios preliminares em biorreator.

3. JUSTIFICATIVA

Os derivados perílicos vem ganhando importância devido às suas propriedades antimicrobianas e, principalmente, ao seu potencial como agente anticâncer. Estas espécies terpenóides, presentes em concentrações muito baixas em algumas fontes vegetais e de difícil obtenção pela via química convencional, podem ser sintetizadas através da bioconversão do monoterpeno limoneno, subproduto de baixo custo da indústria de cítricos.

Apesar do crescente interesse nesta bioconversão tanto do ponto de vista acadêmico quanto tecnológico, os dados disponíveis na literatura sobre o processo de bioconversão do limoneno por leveduras, como Y. lipolytica, são escassos, tornando primordial estudos para o desenvolvimento e otimização do bioprocesso de forma a se alcançar maiores rendimentos e produtividade.

Soma-se a isso o fato de existir uma crescente demanda por bioprocessos verdes alternativos às rotas de síntese química, o que, aliado à capacidade de obtenção enantiosseletiva do composto de interesse, vêm impulsionando o uso de processos biocatalisados em nível industrial, especialmente para a produção de fármacos e de intermediários de drogas.

O presente trabalho apresenta caráter inovador pautado pela obtenção de molécula de alto valor agregado, inédita em medicamentos com atividade anticâncer, através de um processo ambientalmente amigável e não-tóxico, no qual a bio-oxidação ocorre em meio aquoso, em apenas uma etapa, dentro do conceito de “Química Verde”.

Ressalta-se que em que pese o constante surgimento de novos fármacos com atividade anticâncer, que vem revolucionando o tratamento da doença, os custos elevados tanto das substâncias terapêuticas quanto de estadia clínica, têm sido um obstáculo em todo o mundo. Em especial para o Brasil, esse fator é agravado pelo fato do País importar a maior parte dos princípios ativos, configurando uma situação de dependência tecnológica e com decorrentes crises de abastecimento.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Otimização do processo de obtenção do ácido perílico a partir do limoneno utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* para a bioconversão e extensão do processo para o óleo essencial de laranja.

4.2. Objetivos Específicos

- Otimização de parâmetros de cultivo e operacionais da etapa de obtenção de biomassa celular visando a obtenção de células competentes da levedura *Y. lipolytica* para a bioconversão do limoneno;
- Otimização das condições reacionais da etapa de bioconversão do limoneno a ácido perílico;
- Obtenção de uma linhagem de *Y. lipolytica* mais eficiente para a bioconversão do limoneno por adaptação evolutiva da levedura;
- Desenvolvimento do processo de crescimento da levedura *Y. lipolytica* em biorreator instrumentado de 2 L;
- Desenvolvimento do processo de bioconversão do limoneno a ácido perílico em biorreator instrumentado de 2 L;
- Transposição do processo para a bioconversão do óleo essencial de laranja.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Micro-organismo, propagação e manutenção

Os experimentos neste trabalho foram realizados com a linhagem da levedura *Yarrowia lipoytica* INCQS 40149 (ATCC 18942) cedida pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ). A propagação do micro-organismo foi realizada em meio YMA (em g/L: extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0 e ágar-ágar 25,0) a 28 °C por 3 dias; após o crescimento, a levedura foi recuperada da placa com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Essa suspensão foi centrifugada a 3000 x g por 15 min de forma estéril e as células foram suspensas em solução estéril de glicerol a 20% e mantidas a -18 °C.

5.2. Produção de biomassa celular em frascos agitados

A menos que especificado de outra forma, as células de *Y. lipolytica* foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 200 mL de meio YMB (em g/L: extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0). As células foram inoculadas na concentração de 0,1 g/L e incubadas em agitador rotatório (Scientific/Innova 4340, New Brunswick Scientific. Edison, NJ, USA) a 28°C e 200 rpm por 48 h. Alíquotas foram retiradas do cultivo para determinação da concentração de massa celular e de glicose.

5.3. Bioconversão do limoneno em frascos agitados

Após o término do cultivo, a massa celular foi separada de forma estéril através de centrifugação a 3000 x g por 15 minutos (centrífuga Beckman Coulter 6R) e ressuspendida em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, em frascos Erlenmeyer de 250 mL (volume final de 25 mL). Após adição de *R*-(+)-limoneno (97%, Sigma, EUA), a reação foi incubada sob agitação de 200 rpm, a 25°C por 48 h. Nos experimentos de bioconversão nos quais foram utilizadas condições padronizadas, a concentração de massa celular foi de 20 g/L e 40 µL de limoneno (correspondendo a uma concentração de 0,16% v/v) foram adicionados nos tempos 0 e 24 h . Após o período de bioconversão, as células foram separadas por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração dos produtos da bioconversão através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE).

5.4. Bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica* colhida em diferentes fases do crescimento

Foram realizados experimentos de bioconversão do limoneno utilizando a levedura cultivada por 12, 24, 42 e 48 horas em meio YMB, em condições padronizadas, conforme descrito no item 5.3.

5.5. Reuso de células de *Y. lipolytica* após a bioconversão do limoneno

Foram realizados experimentos de bioconversão, de acordo com os procedimentos descritos no item 5.3. Após 48 h de bioconversão, as células de *Y. lipolytica* foram separadas do sobrenadante, através de centrifugação a 3000 x g por 15 min (centrífuga Beckman Coulter 6R), e, em seguida, utilizadas para uma nova bioconversão do limoneno seguindo o mesmo procedimento.

5.6. Otimização da composição do meio de cultura para crescimento da levedura *Y. lipolytica*

5.6.1. Avaliação da formulação do meio por delineamento Plackett-Burman

Foi realizado um planejamento experimental Placket-Burman (planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}) para seleção dos componentes relevantes do meio de cultura. Esse experimento foi realizado seguindo a matriz gerada pelo software Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Os valores das variáveis utilizadas no experimento, bem como seus níveis codificados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Níveis dos componentes do meio de cultura de crescimento de *Y. lipoytica*.

Componente (g/L)	-1	0	1
Extrato de levedura	1,0	3,0	5,0
Extrato de malte	1,0	3,0	5,0
Peptona	3,0	5,0	7,0
Glicose	5,0	10	15,0

5.6.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultivo na levedura *Y. lipolytica*

Após os experimentos de triagem, foram definidas três variáveis significativas para a produção de massa celular: glicose, peptona e extrato de levedura. Desta forma, foi realizado um delineamento fatorial completo 2^{4-1}, incluindo 6 pontos axiais e mais 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios. A Tabela 4 apresenta os valores codificados para as variáveis independentes utilizadas nesta etapa. A concentração do extrato de malte foi fixada em 1,0 g/L

Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para 3 fatores (extrato de levedura, peptona e glicose).

Variável (g/L)	-1,68	-1	0	1	1,68
Glicose	15,0	17,0	20,0	22,9	25,0
Peptona	3,0	4,2	6,0	7,7	9,0
Extrato de levedura	1,0	1,8	3,0	4,1	5,00

A determinação do modelo do planejamento do DCCR, para obtenção dos valores ótimos de concentração dos componentes do meio de cultura, foi realizada através da resolução da equação polinomial que descreve a resposta (massa celular) como uma função das variáveis independentes (glicose, peptona e extrato de levedura) realizada com auxílio do pacote estatístico StatSoft Inc. (Tulsa, OK., USA) **Equação 1** (CALADO e MONTGOMERY, 2003; BOX et al. 1978). A superfície de resposta levou em consideração somente as variáveis significativas, demostrada na **Equação 1**, onde: o coeficiente β_0 é o resultado (resposta) no ponto central, β_j e β_{jj} medem os principais efeitos e interações das variáveis codificadas, x_i e x_j são as variáveis independentes ou fatores codificados e ε significa o erro aleatório.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{K} \beta_j x_j + \sum \sum_{i<j} \beta_i \beta_j x_i x_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \qquad \textbf{Equação 1}$$

5.6.3. Avaliação do crescimento da levedura em meio YMB, meio otimizado (MO) e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM)

O meio de cultura otimizado (MO), definido através dos experimentos de DCCR, foi avaliado para a produção de biomassa celular, comparativamente aos meios YMB e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM). A composição dos meios está descrita na Tabela 5. Os cultivos foram conduzidos conforme detalhado no item 5.1.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura YMB, otimizado (MO) e otimizado sem extrato de malte (MOsM) utilizados para o crescimento de *Y. lipolytica*.

Componente (g/L)	Meio YMB	Meio MO	Meio MOsM
Glicose	10,0	23,0	23,0
Peptona	5,0	7,8	7,8
Extrato de levedura	3,0	4,2	4,2
Extrato de malte	3,0	1,0	-

5.6.4. Bioconversão do limoneno utilizando células crescidas em meio YMB, meio otimizado (MO) e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM)

As células crescidas nos diferentes meios de cultivo foram avaliadas quanto ao potencial de bioconversão do limoneno em condições padronizadas, conforme descrito no item 5.3.

5.7. Otimização das condições reacionais para a bioconversão de limoneno

Com o intuito de otimizar as variáveis concentração de massa celular de *Y. lipolítica* e concentração de limoneno para a bioconversão do limoneno, foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR fatorial completo 2^{3-1}, incluindo 3 pontos axiais e mais 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, tendo como variáveis independentes a massa celular em g/L e concentração de limoneno em % (v/v). A Tabela 6 apresenta os valores codificados para as variáveis independentes utilizadas. A bioconversão foi conduzida conforme descrito no item 5.3, realizando-se, entretanto, apenas uma aplicação de limoneno no início do processo de bioconversão.

Tabela 6. Níveis dos componentes: concentração celular e concentração de limoneno.

Variáveis independentes	-1,41	-1	0	1	1,41
Massa celular (g/L)	10,0	12,90	20,0	27,10	30,0
Limoneno v/v (%)	0,10	0,16	0,30	0,44	0,50

A determinação dos modelos dos planejamentos do DCCR, para obtenção dos valores ótimos, foi realizada através da resolução das equações polinomiais que descrevem a resposta, rendimento molar de ácido perílico, como uma função das variáveis independentes (massa celular e limoneno) realizada com auxílio do pacote estatístico (StatSoft Inc., Tulsa, OK., USA) Equação 1.

5.8. Adaptação evolutiva de *Y. lipolytica* ao limoneno

Para a adaptação evolutiva de *Y. lipolytica*, a levedura foi cultivada no meio YMB (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) com concentrações crescentes de limoneno. Os cultivos foram conduzidos em agitador rotatório a 28°C, 200 rpm e 24 h, conforme descrito a seguir.

Para cada passagem, foi realizada uma ativação das células em meio YMB por 24 h (correspondendo à fase de crescimento exponencial), partindo-se de uma única unidade formadora de colônia (UFC) da célula adaptada da passagem anterior. A massa celular obtida foi centrifugada, ressuspendida em solução salina, inoculada a uma concentração de 0,4 g/L em um novo frasco contendo meio YMB acrescido de limoneno e incubada por 24 h a 28°C / 200 rpm. A adaptação foi iniciada com concentração de limoneno de 0,03% v/v, sendo que a cada três a cinco passagens a concentração de limoneno foi aumentada em 0,01%. Os cultivos foram realizados em triplicata. Finalizadas as 24 h de incubação, foram retiradas alíquotas do cultivo para quantificação de biomassa celular. Paralelamente, foram realizadas diluições em série do cultivo e plaqueamento em meio YMA com o objetivo de se obter colônias isoladas e de avaliar a viabilidade celular. As amostras de célula de cada passagem foram armazenadas em glicerol 40% v/v e mantidas em *freezer* a -80°C.

Para testar a eficiência das células adaptadas para a bioconversão do limoneno, foram realizados experimentos de bioconversão em condições padronizadas (item 5.3) com as células da 30ª passagem comparativamente às células nativas. Para esse ensaio, ambas as células foram cultivadas em meio YMB, conforme descrito no item 5.2. Foi realizada também, em paralelo,

uma bioconversão utilizando as células da 30ª geração cultivadas em meio YMB acrescido de limoneno 0,02% (v/v). Os sobrenadantes das bioconversões foram armazenados para análise do ácido perílico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os experimentos de bioconversão foram realizados em triplicata.

5.8.1. Avaliação da estabilidade da cepa de *Y. lipolytica* adaptada

Foram realizados experimentos de bioconversão com a finalidade de se avaliar a manutenção das propriedades adquiridas que permitiram uma maior produção de ácido perílico pela cepa de *Y. lipolytica* adaptada após 30 passagens, em relação à cepa selvagem. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados de acordo com o item 5.3, utilizando-se a cepa de *Y. lipolitica* adaptada após ter sido criopreservada em glicerol 20% por um período de até 12 meses.

5.9. Estudos em biorreator instrumentado

Todos os cultivos em biorreator foram conduzidos no equipamento BIOSTAT® B plus (Sartorius AG, Alemanha) com vaso reacional de 2 L e módulos de controle de temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido e agitação. Nesses experimentos, empregou-se a linhagem nativa de Y. lipolytica.

5.9.1. Produção de biomassa celular de *Y. lipolytica*

As células de *Y. lipolytica* foram previamente crescidas em meio YMB em agitador rotatório durante 24 horas a 28°C, 200 rpm. Todo conteúdo do frasco foi transferido ao biorreator contendo 0,7 L de meio de cultura otimizado (MO). A temperatura foi mantida em 28°C e a vazão de ar em 0,5 vvm. O nível de oxigênio dissolvido foi controlado em 30% pela variação da velocidade de agitação entre 200 e 700 rpm. Após 24 h e 42 h de crescimento foram realizadas alimentações por pulsos de 50 mL de meio MO concentrado 10 vezes. Para controlar a formação de espuma, foi utilizado o antiespumante A-Sigma (Sigma Aldrich, EUA).

5.9.2. Bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado com aeração convencional

A biomassa celular foi obtida conforme descrito no item 5.9.1. Após o período de crescimento máximo da levedura (33 horas), todo o meio reacional foi retirado do biorreator. Uma fração de 100 mL foi reservada para ensaios de bioconversão em frascos agitados,

descritos a seguir. O restante do meio reacional (cerca de 1600 mL) foi centrifugado a 3000 x g/15 min e a biomassa celular (*pellet*) foi empregada para os ensaios de bioconversão no biorreator, também descrito a seguir.

a) Bioconversão em biorreator

As células crescidas em biorreator, obtidas conforme descrito acima foram ressuspendidas em solução salina, quantificadas e transferidas novamente para o mesmo biorreator. Foram adicionados ao vaso reacional tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0) e água estéril, de forma a se ter uma concentração final de células de 20 g/L e de tampão fosfato de 0,05 M. O limoneno foi adicionado em duas aplicações de 0,16% v/v, nos tempos de 0 e 24 horas. As condições foram 25°C por 48 horas e a concentração de oxigênio dissolvido no meio mantida em 5%, através da variação da agitação (250 a 300 rpm). A vazão de ar foi mantida em 0,2 vvm. As alíquotas retiradas foram centrifugadas por 300 G/15 minutos e o sobrenadante armazenado para quantificação de ácido perílico.

b) Verificação da possibilidade de realizar a bioconversão através da adição direta do limoneno após o crescimento da levedura

Foi realizado, paralelamente, um conjunto de experimentos em frascos agitados nos quais a etapa de bioconversão foi conduzida de duas formas diferentes. Na primeira, foi realizado um ensaio de bioconversão convencional, isto é, após o crescimento da levedura (descrito no item 5.8.2), as células foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão fosfato e utilizadas para a bioconversão do limoneno, de acordo com o item 5.3; este experimento foi denominado controle. Para a segunda bioconversão, foi realizado um ensaio no qual, após o crescimento da levedura, o pH do meio de cultivo foi ajustado a 7,0 através da adição de tampão fosfato 0,05 M e a adição do limoneno foi feita diretamente no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata. Alíquotas foram retiradas, centrifugadas por 3000 x g/15 minutos e o sobrenadante armazenado para quantificação do ácido perílico.

5.9.3 Bioconversão do limoneno em biorreator com aeração de superfície

Foram conduzidos experimentos de bioconversão do limoneno em biorreator nos quais o sistema de aeração convencional(no qual o ar é borbulhado no seio do meio de cultura, a partir

do fundo do reator) foi substituído por aeração de superfície, na qual o ar é inserido a partir do topo do reator, acima do meio de cultura, conforme o esquema apresentado na Figura 9.

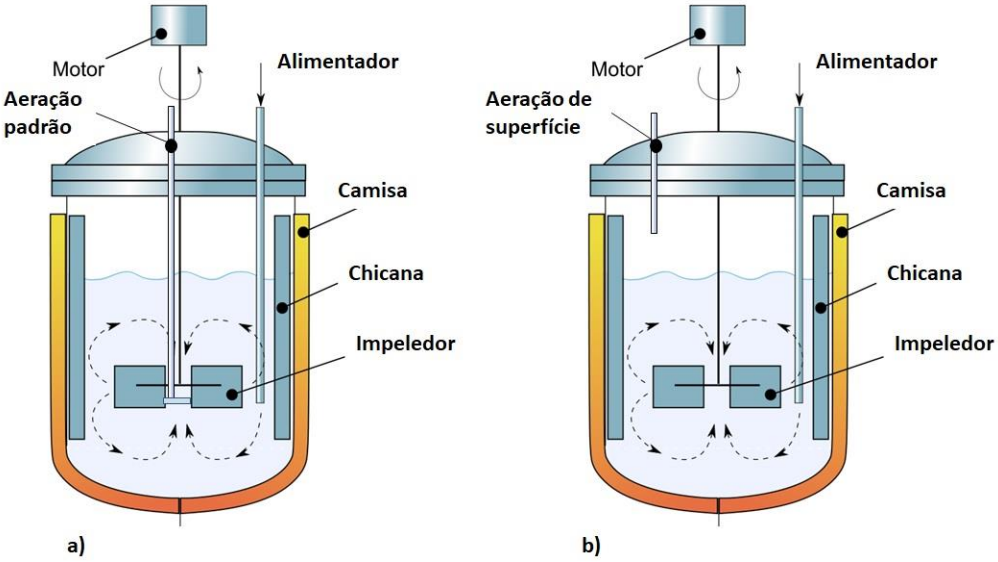


Figura 9. Representação esquemática do vaso de fermentação agitado. No qual (a) representa a forma de aeração convencional e (b) aeração de superfície (adaptado de goo.gl/j2gjGU – acessado em 10/03/2018).

5.10. Produção de ácido perílico utilizando óleo essencial de laranja

O óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*) foi gentilmente cedido pela empresa Tropfruit Nordeste SA, localizada em Distrito Industrial de Estância, Quadra 3/5, bairro Distrito Industrial, Estância, Sergipe.

As condições de bioconversão otimizadas para o *R*-(+)limoneno em frascos agitados e biorreator foram aplicadas para a bioconversão do óleo de laranja.

5.11. Métodos analíticos

5.11.1. Atividade emulsificante

A atividade emulsificante de amostras de sobrenadante da bioconversão do limoneno foi avaliada de acordo com a seguinte metodologia (AMARAL et al., 2006): em um tubo de vidro com tampa de rosca foram adicionados 2 mL de amostra, 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 3,0 e 1 mL de hexadecano; em seguida, a mistura foi agitada em vortex por 2

minutos. A emulsão formada foi deixada em repouso por 10 minutos e, a seguir, mediu-se a densidade ótica espectrofotometricamente a 540 nm (Shimadzu-UV 1601 - Kyoto, Japão). O branco da reação foi preparado utilizando-se 2 mL de tampão fosfato 50 mM e 0,64 µL de limoneno no lugar da amostra.

Uma unidade de atividade emulsificante é definida como a quantidade de emulsificante que faz a densidade ótica da emulsão variar em uma unidade a 540 nm nas condições descritas.

5.11.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)

As análises dos produtos da bioconversão do limoneno, ácido perílico, álcool perílico e aldeído perílico foram realizadas no equipamento Ultimate 3000 (ThermoScientific®, Germany) equipado com um detector de arranjo de fotodiodo DAD-3000 (ThermoScientific®, Germany.) O sistema de colunas utilizado foi composto pela pré-coluna LiChroCART RP-18e (4.0 mm I.D. × 4.0 mm, Merck®, Germany) e coluna analítica Hibar RT Purospher Star RP18 (3 mm I.D. × 125 mm, Merck®, Germany). As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel acetonitrila e água deionizada (grau reagente tipo I, 18,2 Megaohm.cm de resistividade, descarbonatada e filtrada em filtro de 0,2 µm) na proporção 90:10, alcalinizado a pH 9,0 com NH_4OH, com fluxo de 1,0 mL por minuto; temperatura do forno: 30 °C; temperatura do *Post-Column Cooler*: 35ºC; temperatura do amostrador automático: 15 ºC; comprimento de onda: 207 nm; e tempo de corrida: 25 min. Os padrões utilizados foram: *S*-(-)-álcool perílico (96% Aldrich, EUA), aldeído perílico (92%, Aldrich, EUA), *S*-(-)-ácido perílico (95%, Aldrich, EUA) e *R*-(+)-limoneno (97%, Sigma, EUA). Os cromatogramas típicos obtidos para os padrões e para amostras de bioconversão são apresentados no Anexo 1.

5.11.3. Dosagem de glicose

A concentração de glicose nos sobrenadantes dos cultivos celulares foi determinada através do analisador bioquímico YSI 2700 Analyzer (Yellow Spring Instruments, EUA). O método tem como base um procedimento enzimático, no qual a enzima glicose oxidase está imobilizada em membrana de policarbonato, depositada sobre um eletrodo. A glicose presente na amostra se difunde através da membrana e reage com a enzima, produzindo peróxido de hidrogênio. Este é oxidado eletroquimicamente no anodo de prata do eletrodo produzindo um sinal elétrico, o qual é proporcional à concentração do substrato.

5.11.4. Quantificação da massa celular da levedura *Y. lipolytica*

A concentração de massa celular foi determinada através da medida de densidade ótica a 600 nm (Shimadzu-UV 1601 - Kyoto, Japão). Uma unidade de absorbância corresponde a 0,444 g de célula (peso seco)/L (R^2=0,9961; faixa de absorbância: 0,100 a 0,750).

5. RESULTADOS

5.1. Influência de parâmetros do cultivo e operacionais na capacidade de bioconversão de limoneno da levedura *Y. lipolytica*

5.1.1. Considerações iniciais

Conforme já mencionado, o processo anteriormente desenvolvido para a obtenção do ácido perílico a partir da bioconversão do limoneno catalisada por *Y. lipolytica* compreende duas etapas: na primeira, as células são cultivadas visando a obtenção de biomassa de levedura apta para a bioconversão; após separação por centrifugação, a biomassa celular é utilizada para a segunda etapa de bioconversão do limoneno. Os estudos até então realizados foram conduzidos em frascos agitados e focaram na etapa de bioconversão, que foi parcialmente otimizada (FERRARA et al., 2013; TAPPIN et al., 2017). Já a etapa de crescimento celular não foi objeto de estudos, tendo sido realizada de forma padronizada: cultivo em meio YMB (tradicionalmente utilizado para o crescimento de *Y. lipolytica*), na temperatura de 28°C, por um período de 48 h.

Assim, a abordagem inicial do presente trabalho consistiu na investigação de diversos aspectos da etapa de cultivo celular, visando obter células competentes para a bioconversão do limoneno, de forma a alcançar elevados rendimentos de processo

5.1.2 Bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica* colhida em diferentes fases do crescimento

Células a serem utilizadas em reações de bioconversão podem estar viáveis ou não. Em biotransformações envolvendo reações de óxido-redução, como é o caso da conversão do limoneno em ácido perílico, é necessário utilizar células viáveis, que são capazes de regenerar os cofatores utilizados. De acordo com a fase de crescimento dos micro-organismos, diferentes sistemas metabólicos podem ser ativados ou reprimidos, correspondendo a diferentes padrões de expressão de genes, peculiares para as diversas fases do ciclo celular (ISHIGE et al., 2005; STRAATHOF et al., 2002).

Assim, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar se o período de cultivo de *Y. lipolytica* teria influência no seu potencial de bioconversão do limoneno. A Figura 10 (b) apresenta a produção de ácido e de álcool perílico, após 24 h de bioconversão do limoneno, utilizando a levedura cultivada por 12, 20, 24, 42 e 48 horas em meio YMB. De acordo com os dados da Figura 10 (a), estes períodos de cultivo correspondem, respectivamente, às seguintes

fases do crescimento celular: exponencial, final da fase exponencial, início da fase estacionária e fase estacionária.

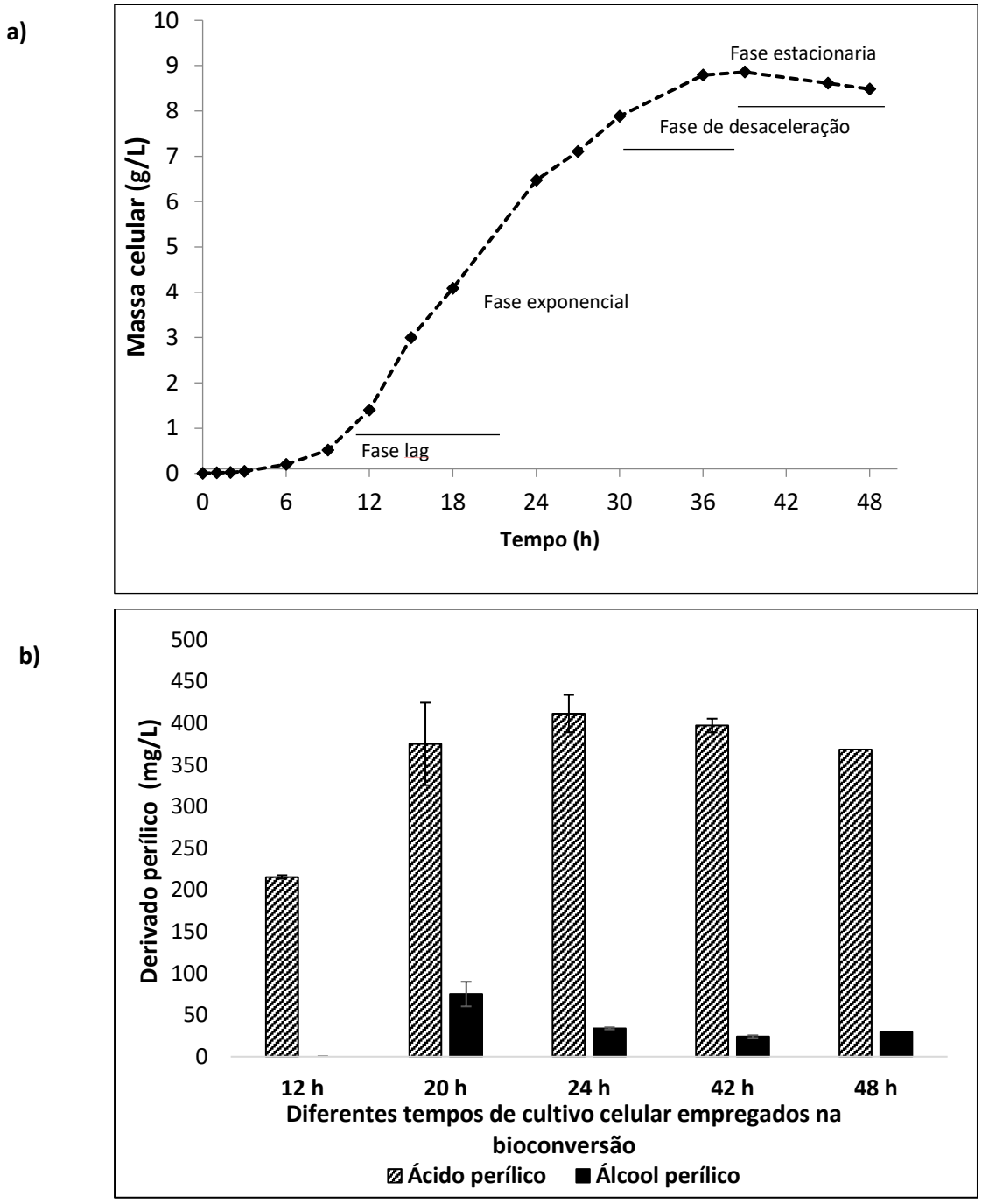


Figura 10. (**a**) Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* em frascos agitados utilizando meio YMB e (**b**) produção de ácido e álcool perílico em 24 h de bioconversão do limoneno. Condições experimentais: limoneno 0,16% v/v, 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, utilizando *Y. lipolytica* cultivada previamente por 12, 20, 24, 42 e 48 h em meio YMB.

A partir de 20 h de crescimento, observa-se que a produção de ácido perílico não variou significativamente em relação às fases de crescimento, situando-se na faixa entre 368,2 a 411,5

mg/L; valores esses próximos aos encontrados por Tappin e colaboradores (2017) para 24 h de bioconversão utilizando células oriundas de 48 h de crescimento (368 mg/L). Esses resultados sugerem que células colhidas a partir do final da fase exponencial de crescimento até a fase estacionária podem ser empregadas para a bioconversão do limoneno. O início da fase estacionária de crescimento seria o estágio indicado para colher as células de *Y. lipolytica* destinadas à bioconversão do limoneno, uma vez que nessa condição se alcançaria a maior concentração de biomassa celular.

Entretanto, este padrão de produção constante não foi observado para o álcool perílico, que geralmente não é detectável após 48 h de biotransformação conduzida com células colhidas com 48 h de cultivo (condições padronizadas). Utilizando-se as células oriundas de 20 h de cultivo, houve produção de 65,5 mg/L de álcool perílico, após 24 h de bioconversão, com redução significativa na sua concentração à medida que foram utilizadas células oriundas de cultivos mais longos. A presença de aldeído perílico não foi detectada em nenhuma das condições testadas. Deve-se salientar, entretanto, que a presença de álcool perílico como produto da bioconversão, detectada por CLAE, deverá ser ainda confirmada por outras técnicas, como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Confirmando a presença de álcool perílico nas amostras, outros experimentos futuros podem ser realizados com tempos de crescimento celular entre 12 e 24 h para verificar se há um aumento na produção de álcool perílico nessas condições.

Cabe ressaltar que as etapas oxidativas necessárias para a bioconversão do limoneno por leveduras ainda não foram identificados, com a exceção, de acordo com a literatura, de que o processo é iniciado por mono-oxigenases P450 (DUETZ et al., 2003). Entretanto, já é relatado na literatura que a oxidação microbiana de alcanos por *Y. lipolytica* envolve uma hidroxilação do carbono terminal catalisada por um sistema de alcano mono-oxigenase dependente de P450, seguida pela ação de enzimas oxidantes do álcool (álcool oxidases ou álcool desidrogenases) e aldeído desidrogenases, resultando no ácido correspondente (FICKERS et al., 2005). Ferrara e colabodores (2013) avaliaram a bioconversão dos compostos perílicos isoladamente por *Y. lipolytica* e verificaram que a levedura reconheceu o álcool perílico como substrato, transformando-o em perilaldeído e ácido perílico; o mesmo ocorreu com o perilaldeído, que foi oxidado a ácido perílico; na ausência de oxigênio molecular, somente o perilaldeído reagiu, sendo reduzido a álcool perílico. Este conjunto de resultados sugeriu que a oxidação do limoneno a ácido perílico é uma via oxidativa multi-enzimática que ocorre passo a passo. Além disso, como os intermediários álcool e aldeído não foram detectados em todas as condições de

bioconversão de limoneno testadas no referido trabalho, os autores sugeriram que o primeiro passo da oxidação, isto é, a oxidação de limoneno para álcool perílico, seria a etapa mais lenta.

Os resultados do presente trabalho sugerem que, para a bioconversão conduzida por um período de 24 h, com a levedura colhida em tempos de cultivo entre 20 e 48 h, há um acúmulo de álcool perílico no meio reacional e que, aparentemente, este é oxidado em duas etapas até ácido perílico.

5.1.3. Reuso das células de *Y. lipolytica* após a bioconversão do limoneno

Em bioprocessos, a etapa que visa à produção de massa celular tem importante contribuição no valor final do produto que se deseja obter, por envolver tanto custos com matéria-prima para o crescimento celular quanto tempo de uso do biorreator A reutilização celular se reveste então de grande importância quando se considera a viabilidade de um bioprocesso e pode ser realizada, por exemplo, sob a forma de bateladas sequenciais após remoção do meio reacional contendo o produto por centrifugação, filtração ou sedimentação celular, seguida de adição de novo substrato (WESTMAN e FRANZÉN, 2015).

Assim, foi estudado neste trabalho o potencial de reutilização das células de *Y. lipolytica* após a bioconversão do limoneno. Para esses experimentos, após o término da bioconversão convencional, as células foram separadas por centrifugação e utilizadas em uma nova bioconversão, empregando-se as mesmas condições reacionais. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

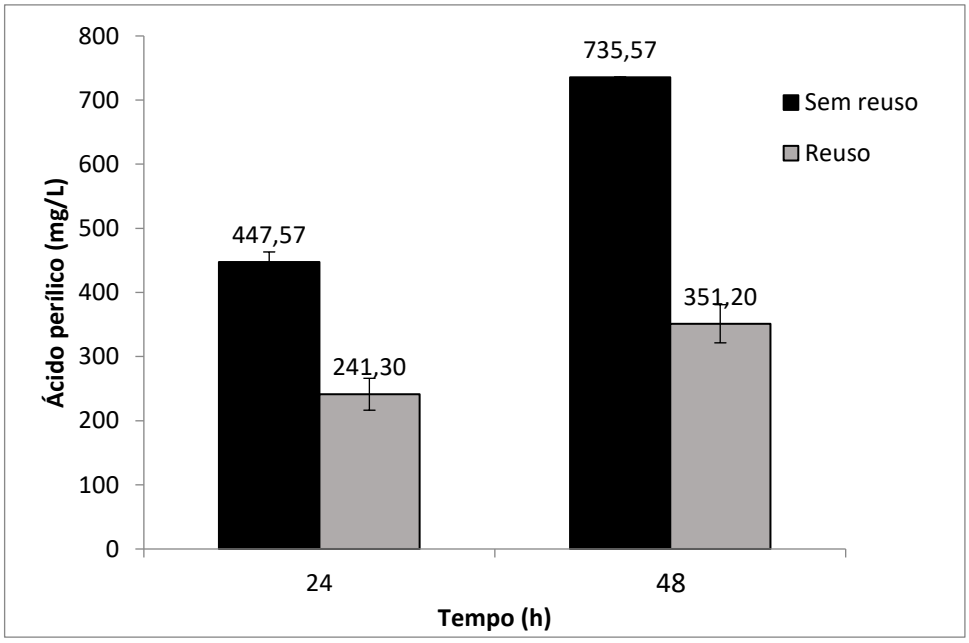


Figura 11. Produção de ácido perílico a partir da bioconversão do limoneno (0,16% v/v) utilizando células da levedura *Y. lipolytica* após 48 h de bioconversão para uma nova etapa de bioconversão do limoneno em frascos agitados.

Observa-se que o reuso das células de levedura provocou uma queda em torno de 50% na concentração de ácido perílico em comparação com o uso de células recém cultivadas. A viabilidade celular, avaliada em 92% após a primeira bioconversão, caiu para 68% após o reuso das células, o que pode explicar a diminuição na produção de ácido perílico.

A literatura não reporta trabalhos sobre o reuso de células de *Y. lipolytica* para produção de ácido perílico. Entretanto, Bubbico e colaboradores (1997) estudaram a produção de ácido cítrico por Y. lipolytica ATCC 20346 em biorreator com reciclagem celular por membranas, tendo observado queda na produção de ácido cítrico associada à redução da viabilidade após o reuso celular, em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho.

Já Wu e colabores (2009) reportaram que *Y. lipolytica* imobilizada em alginato de cálcio pode ser reutilizada por 12 vezes consecutivas para tratamento de água de rejeito, mantendo uma eficiência de degradação de 82%.

Rywinska e Rymovicz (2010) utilizaram duas cepas de *Y. lipolytica* mutantes (Wratislavia AWG7 e Wratislavia 1.31) para produção de ácido cítrico em regime contínuo, verificando estabilidade da produção em até 400 h de processo, para a cepa AWG7. Contudo, tais resultados só puderam ser obtidos através do influxo de peptona, como fonte de nitrogênio.

Com relação à bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica*, estudos de otimização do bioprocesso realizados por Tappin et al. (2017) mostraram que a adição de nutrientes, em

concentrações de até 1,0 g/L de glicose, 0,5 g/L de peptona, 0,3 g/L de extrato de levedura e 0,3 g/L de extrato de malte ao meio reacional de bioconversão não foi significativa para o rendimento em ácido perílico, embora a glicose, quando presente, fosse completamente consumida. Esses resultados indicaram que a presença de fontes de carbono e nitrogênio e de fatores de crescimento, que poderiam ser requeridos para a manutenção da viabilidade celular ou atividade oxidativa da célula, não era necessária para a realização de um ciclo de bioconversão. Por outro lado, os resultados também indicaram que a presença de macro e micronutrientes, nas concentrações testadas, não inibiu ou reprimiu o metabolismo oxidativo da levedura, sugerindo que a adição de nutrientes poderia contribuir para a manutenção da viabilidade celular em bateladas sequenciais de bioconversão. Essa hipótese deverá ser testada em experimentos futuros.

5.1.4. Otimização da composição do meio de cultura para crescimento da levedura *Y. lipolytica*

5.1.4.1. Avaliação da formulação do meio por delineamento Plackett-Burman

Como próximo passo, buscou-se otimizar o meio de cultivo de forma a se reduzir o custo de produção de biomassa com concomitante aumento da produtividade. Com o intuito de avaliar a contribuição de cada componente do meio de cultivo YMB, tradicionalmente utilizado para o crescimento celular da levedura *Y. lipolytica*, foi realizado um planejamento experimental Placket-Burman (planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}). Na avaliação da formulação de um meio de cultivo com vários componentes, o delineamento de Plackett-Burman (Plackett e Burman, 1946) é a ferramenta estatística mais indicada, permitindo selecionar as variáveis mais importantes do sistema e ajustar suas faixas de estudo.

A Tabela 7 apresenta os valores de concentração das variáveis em cada ensaio assim como os resultados obtidos em termos de produção de biomassa celular nos tempos de 24 e 48 h. Pode-se verificar que o ensaio 8, que continha todos os componentes com a maior concentração, nível 1, resultou na maior produção de biomassa (12,34 g/L). O ensaio 1 apresentou a menor produção de massa celular, 4,39 g/L, entre os ensaios avaliados; este ensaio foi realizado com os níveis inferiores dos componentes do meio de cultura, demonstrando que estes valores mínimos poderiam ser aumentados nos experimentos posteriores de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para determinar as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultivo. Entretanto, a produção de massa celular do ensaio 5, que continha o menor nível das fontes de nitrogênio extrato de levedura e extrato de malte, foi muito

próxima à do ensaio 8, indicando que não há necessidade de empregar esses componentes nos níveis máximos testados.

Tabela 7. Resultados do planejamento Plackett-Burman no estudo da influência das concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, peptona e glicose na produção de biomassa em 24h e 48h no cultivo de *Y. lipolytica*.

Ensaio	Níveis dos componentes (g/L)				24 h	48 h
	Ext. de levedura	Ext. de Malte	Peptona	Glicose	Massa celular (g/L)	Massa celular (g/L)
1	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (3,0)	-1 (5,0)	4,48	4,39
2	1 (5,0)	-1 (1,0)	-1 (3,0)	1 (15,0)	6,47	11,21
3	-1 (1,0)	1 (5,0)	-1 (3,0)	1 (15,0)	6,07	9,22
4	1 (5,0)	1 (5,0)	-1 (3,0)	-1 (5,0)	6,55	6,32
5	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (7,0)	1 (15,0)	7,38	12,17
6	1 (5,0)	-1 (1,0)	1 (7,0)	-1 (5,0)	6,63	5,05
7	-1 (1,0)	1 (5,0)	1 (7,0)	-1 (5,0)	5,85	7,02
8	1 (5,0)	1 (5,0)	1 (7,0)	1 (15,0)	6,79	12,34
9	0 (3,0)	0 (3,0)	0 (5,0)	0 (10,0)	6,13	9,06
10	0 (3,0)	0 (3,0)	0 (5,0)	0 (10,0)	6,66	9,52
11	0 (3,0)	0 (3,0)	0 (5,0)	0 (10,0)	6,57	8,54

Os valores do teste t-student (tcalc) e as variáveis estatisticamente significativas no nível de significância de 10% estão apresentados no diagrama de Pareto (Figuras 12 e 13). De acordo com a análise estatística, os componentes glicose, peptona e extrato de levedura apresentaram influência positiva significativa na produção de biomassa em 24 h. Em 48 h de crescimento, apenas as concentrações de glicose e de peptona apresentaram significância, também com efeito positivo. A variação da concentração de extrato de malte não apresentou efeito no crescimento da levedura em 24 h ou 48 h, sendo este componente fixado na concentração de 1 g/L (nível -1) nos experimentos seguintes, nos quais visou-se otimizar as concentrações de glicose, peptona e extrato de levedura através da metodologia de DCCR.

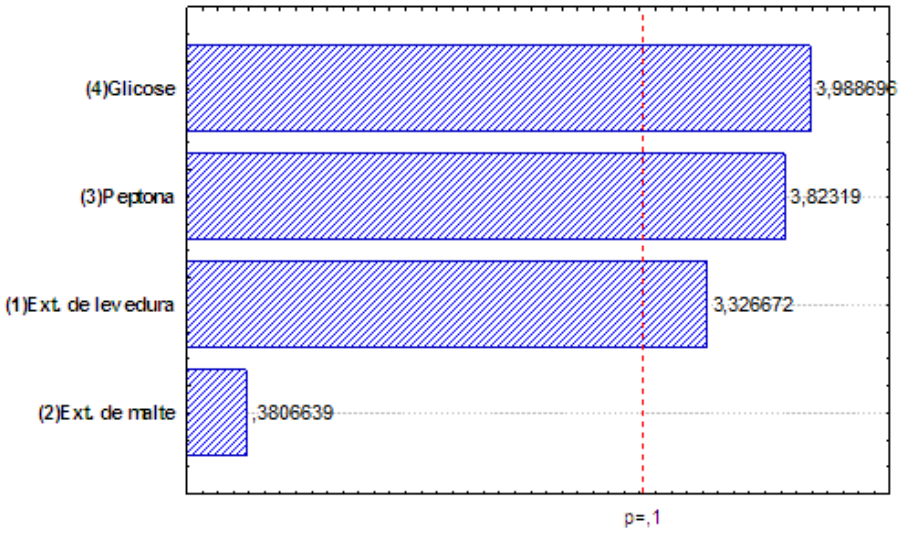


Figura 12. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 24 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,1.

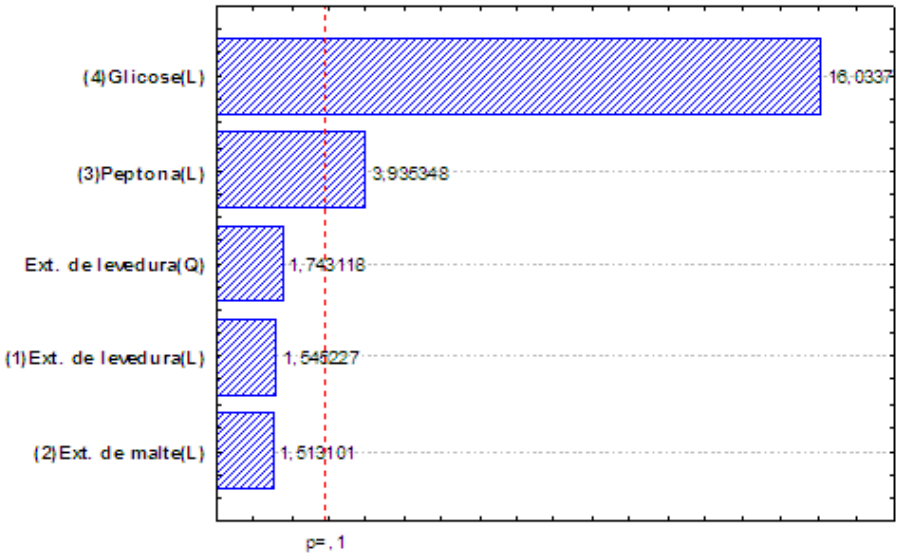


Figura 13. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 48 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,1.

5.1.4.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultivo na levedura *Y. lipolytica*

Após a seleção das variáveis que apresentem influência nas respostas analisadas, usualmente são utilizados delineamentos mais detalhados que permitem otimizar o processo, como o delineamento composto central rotacional (DCCR). O DCCR é um delineamento fatorial simétrico de segunda ordem que possui características interessantes para a busca de um ponto que forneça a resposta ótima: um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e o fato de poderem ser realizados sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema. No presente trabalho, foi realizado um delineamento fatorial completo 2^{4-1}, incluindo seis pontos axiais e mais seis repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios. As concentrações estudadas das variáveis independentes estão apresentadas na Tabela 8, bem como a concentração celular alcançada e o pH final após 54 h de cultivo para cada ensaio do DCCR. O tempo de 54 h foi escolhido por possibilitar o consumo total da glicose presente no meio, resultando no máximo de concentração celular em cada condição estudada.

Tabela 8. Valores codificados e variáveis de resposta concentração celular (g/L) e pH dos ensaios de cultivo da levedura *Y. lipolytica*. A concentração de extrato de malte foi fixada em 1 g/L em todos os ensaios.

Ensaio	Níveis dos componentes (g/L)			Variáveis de resposta (g/L)	
				54 h	
	Glicose	Peptona	Ext. de levedura	Concentração celular	pH
1	-1 (17,0)	-1 (4,2)	-1 (1,8)	11,35	5,03
2	-1 (17,0)	-1 (4,2)	1 (4,1)	11,16	3,80
3	-1 (17,0)	1 (7,7)	-1 (1,8)	14,17	4,82
4	-1 (17,0)	1 (7,7)	1 (4,1)	14,41	3,96
5	1 (22,9)	-1 (4,2)	-1 (1,8)	13,77	5,30
6	1 (22,9)	-1 (4,2)	1 (4,1)	14,97	5,77
7	1 (22,9)	1 (7,7)	-1 (1,8)	13,35	6,43
8	1 (22,9)	1 (7,7)	1 (4,1)	15,61	5,21
9	-1,68 (15,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	12,09	6,97
10	1,68 (25,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	15,24	4,88
11	0 (20,0)	-1,68 (3,0)	0 (3,0)	12,44	4,15
12	0 (20,0)	1,68 (9,0)	0 (3,0)	15,72	4,87
13	0 (20,0)	0 (6,0)	-1,68 (1,0)	13,45	3,70
14	0 (20,0)	0 (6,0)	1,68 (5,0)	16,20	5,06
15	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	13,77	4,60
16	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	14,33	4,68
17	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	14,57	4,67
18	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	14,20	4,47
19	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	14,79	4,68
20	0 (20,0)	0 (6,0)	0 (3,0)	14,97	4,37

Com relação ao pH dos cultivos, o valor inicial, para todos os ensaios, situou-se na faixa de 6,4 a 6,6. Observa-se na **Tabela 8** que os valores finais se situaram entre 3,8 (ensaio 2) e 7,1 (ensaio 9). De acordo com a literatura, a taxa específica de crescimento da levedura *Y. lipolytica* cultivada em glicose não é afetada em variações de pH na faixa de 4,5 a 7,5 (MOELLER et al., 2007). Assim, acredita-se que a variação de pH observada nos ensaios não influenciou a produção de massa celular.

Através dos resultados obtidos para a concentração de massa celular em 54 h de cultivo, foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na **Tabela 9**.

Verifica-se que foram significativos os termos lineares de glicose, peptona e extrato de levedura, todos com p<0,15.

Tabela 9. Coeficientes de regressão e testes de hipóteses para os efeitos obtidos para produção de massa celular em 54 h pelo DCCR.

Variáveis	Coefic. de regressão	Erro padrão	t_{calc}*	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	14,45	0,17	0,00	82,02	14,00	14,91
(1) Ext. de Levedura (L)	0,82	0,12	0,00	7,03	1,04	2,24
Ext. de Levedura (Q)†	0,01	0,11	0,90	0,13	-0,56	0,62
(2) Peptona (L)	0,86	0,17	0,00	7,39	1,13	2,33
Peptona(Q) †	-0,25	0,11	0,08	-2,18	-1,08	0,09
(3) Glicose (L)	0,64	0,11	0,00	5,51	0,69	1,89
Glicose (Q)	-0,39	0,11	0,02	-3,47	-1,37	-0,20
1L x 2L	-0,73	0,15	0,00	-4,79	-2,25	-0,68
1L x 3L	0,42	0,15	0,04	2,79	0,07	1,64
2L x 3L†	0,18	0,15	0,28	1,22	-0,41	1,16

*t_{calc} é o valor encontrado no teste T-student do programa Statistica 7.0. % de variação explicada. (Q) representa os coeficientes quadráticos e (L) os efeitos lineares.

(R^2) = 91,97%. † Variável não significativa.

Pode-se observar que, para a faixa estudada, todas as variáveis foram significativas, excetuando-se o coeficiente quadrático da glicose (Q) e as interações lineares entre as variáveis estudadas. Os coeficientes lineares das variáveis foram os parâmetros positivos mais significativos para a produção de biomassa de *Y. lipolytica.*

Os valores do teste t-student (tcalc) e as variáveis estatisticamente significativas no nível de significância de 10% estão apresentados no diagrama de Pareto **(Figura 14)**.

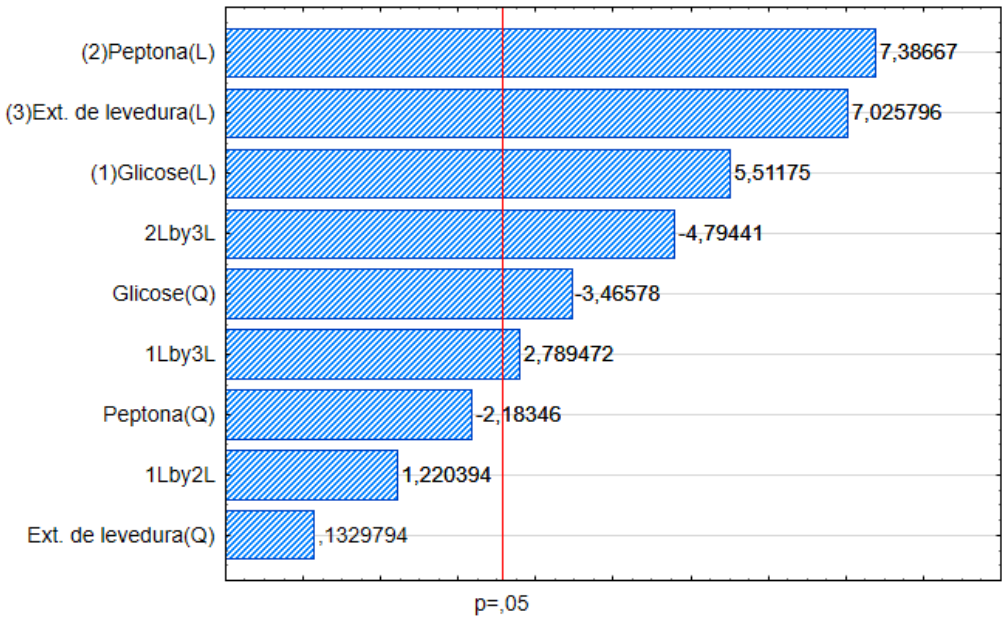


Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados na produção de massa celular em 54 h, valor de alfa (nível de significância) igual a 0,05. (Q) representa os coeficientes quadráticos das variáveis e (L), os lineares.

Os coeficientes lineares das variáveis foram os parâmetros positivos mais significativos para a produção de biomassa de *Y. lipolytica*. Esses resultados estão graficamente representados através da curva de contorno e da superfície de resposta geradas pelo modelo para a influência das variáveis glicose, peptona e extrato de levedura na produção de biomassa (**Figura 15)**.

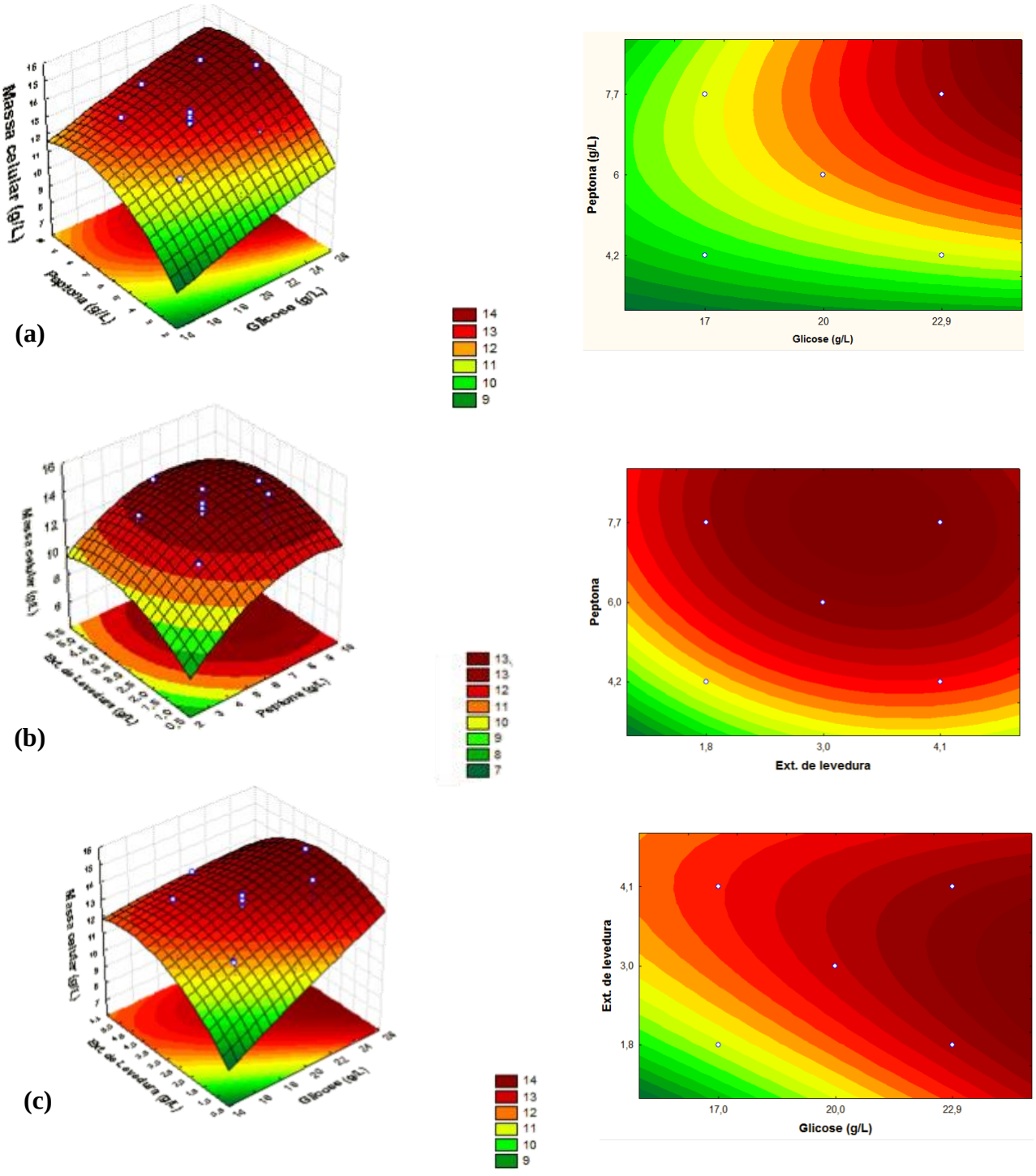


Figura 15. Superfícies de resposta e curva de contorno para o crescimento celular após 54 h em função da concentração peptona e glicose (a), extrato de levedura e glicose (b) e extrato de levedura e peptona (c). A concentração do extrato de malte foi mantida em 1,0 g/L.

As três superfícies de resposta **(Figuras 15a, 15b** e **15c**) mostram que as concentrações dos nutrientes utilizadas nos níveis analisados proporcionaram a determinação da região de tendência ao ótimo para a produção de biomassa por *Y. lipolytica*. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados no resíduo. Os parâmetros significativos do modelo permitiram elaborar as superfícies de resposta e um modelo de segunda ordem que representa a produção de biomassa com as variáveis codificadas a seguir:

$$\text{Produção de biomassa} = 14{,}45 + 0{,}64\ \text{glicose} - 0{,}39\ \text{glicose}^2 + 0{,}86\ \text{peptona} + 0{,}82\ \text{de ext. de levedura} + 0{,}42\ \text{glicose x ext. lev.} - 0{,}73\ \text{peptona x ext. levedura}$$

Com os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, foram determinadas as concentrações ótimas dos componentes, sendo: 22,9 g/L de glicose; 4,1 g/L de extrato de levedura e 7,7 g/L de peptona. Foi realizado um experimento em triplicata para validação e comparação dos modelos previstos para a maior produção de massa celular, utilizando todas as variáveis nos níveis ótimos. Os valores experimentais encontrados foram 12,89 ± 0,9 g/L de células, muito próximos ao valor predito pelo modelo nessas condições (14,32 g/L).

Os dados obtidos pela análise de variância (ANOVA) estão apresentados na **Tabela 8**. Através do teste de hipóteses, foi possível verificar a validade do modelo a partir da comparação dos valores de F calculado (Fcalc) e tabelado (Ftab) previstos dentro de um nível de significância. A análise de variância (teste F) mostrou que a falta de ajuste do modelo obtido não foi significativa, e este pode ser utilizado para predizer a produção de massa celular em diferentes concentrações das variáveis.

Tabela 10. Teste ANOVA para produção de massa celular (g/L) considerando todos os termos do modelo obtido no DCCR.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcalc*	Ftab
Regressão	20,50	1	41,10	6,09	2,30
Resíduos	9,41	9	0,67		
Total	29,92	10			

*Se Fcalc > Ftab, o modelo é válido. Nível de significância (α) igual a 0,1. SQ – Soma dos quadrados; GL – graus de liberdade; QM – Quadrados médios. R^2= 91,97%

Segundo Casas e Garcia-Ochoa (1999), a produção de biomassa celular por levedura do gênero *Candida* é favorecida em concentrações elevadas de extrato de levedura, o que causa a diminuição na produção de outros produtos de interesse industrial como biossurfactantes. De

acordo com Alonso et al. (2001) e Li et al. (2004), o extrato de levedura favorece o crescimento da levedura, já que não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas.

5.1.4.3. Comparação da produção de massa celular em meio YMB, meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) e meio otimizado (MO)

Os resultados dos estudos de otimização da composição do meio de cultura para crescimento da levedura mostraram que a presença do extrato de malte no meio não era significativa para a produção de massa celular nas condições avaliadas, podendo este componente ser utilizado nos níveis inferiores estudados. Com a finalidade de avaliar experimentalmente a contribuição do extrato de malte na produção de massa celular, foram realizados experimentos de cultivo da levedura no meio tradicionalmente utilizado (YMB), no meio otimizado (MO), no qual a concentração de extrato de malte é de 1,0 g/L, e no meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) (Tabela 5). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 16**.

Observa-se que, nas primeiras 24 horas de cultivo, a levedura cresceu de maneira semelhante nos três meios, indicando que a elevada concentração de nutrientes presente nos meios MO e MOsM não inibiu o crescimento celular. Estes resultados estão de acordo com as características fisiológicas de *Y. lipolytica*, para a qual concentrações acima de 20 g/L de determinadas fontes de carbono, como a glicose, não afetam sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou suas propriedades mitocondriais (FLORES et al., 2000).

A partir de 48 horas, o cultivo em meio YMB atingiu a fase estacionária, o que pode ser atribuído ao esgotamento de um ou mais nutrientes no meio, resultando em uma concentração máxima de biomassa de 6,28 g/L. O crescimento da levedura nos meios MOsM e MO, os quais contêm concentrações mais elevadas de todos os nutrientes (com exceção do extrato de malte), atingiu o platô com 96 e 72 h de cultivo, respectivamente, obtendo-se concentração celular máxima de 12,19 g/L com o meio MOsM e de 13,02 g/L com o meio MO. Embora as concentrações de massa celular obtidas tenham sido semelhantes nesses dois meios, o meio MO apresentou maior produtividade, de 0,18 $g.L^{-1}h^{-1}$, quando comparado ao meio MosM, em que a produtividade foi de 0,15 $g.L^{-1}h^{-1}$. A produtividade do meio YMB, por sua vez, foi de 0,13 $g.L^{-1}h^{-1}$ (**Tabela 9**).

A comparação da composição dos três meios de cultivo (tabela 5) mostra que, quando se normaliza o teor de nutrientes em relação à glicose, o uso do meio otimizado (MO) para crescimento celular proporcionaria uma economia de 32% de peptona, 39% de extrato de

levedura e 85% de extrato de malte em relação ao uso do meio YMB; significando uma diminuição significativa do custo de produção de biomassa celular. No caso do uso do meio MOsM, a economia seria ainda maior.

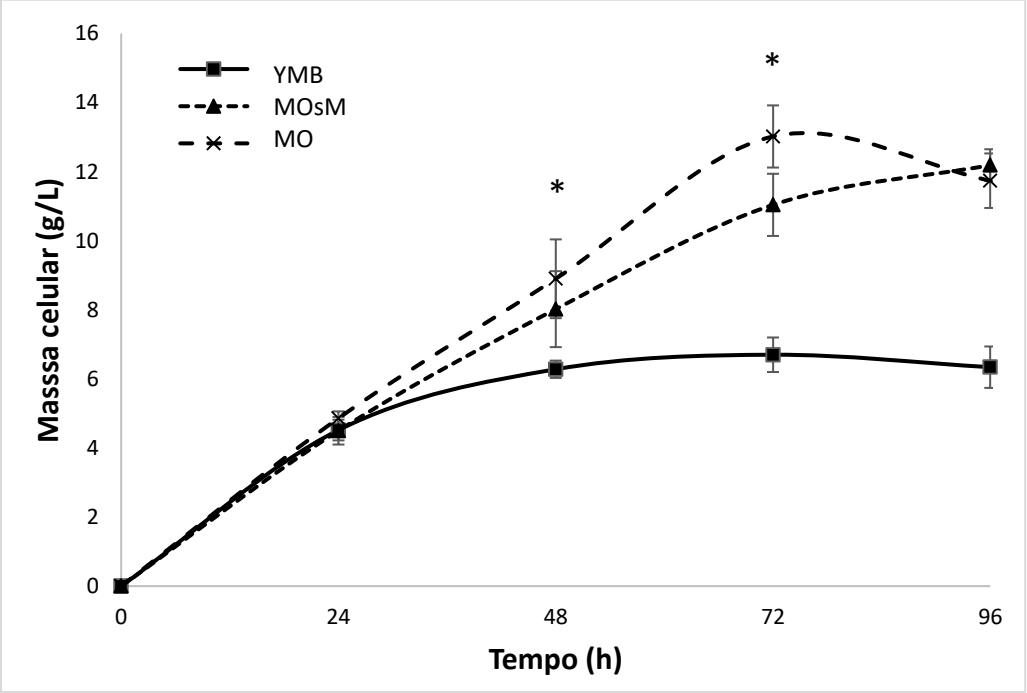


Figura 16. Perfil de concentração de massa celular nos meios de cultivo YMB (controle), MO e MOsM otimizados pelo DCCR. Os asteriscos acima dos pontos nas curvas significam diferença estatisticamente significativa, entre os três fatores, de acordo com o teste ANOVA de fator único, seguido de teste de Tukey, ($p > 0,05$). A barra de erros significa o desvio padrão da média.

Tabela 11. Comparação entre as maiores produtividades de massa celular de Y. lipolytica entre os meios YMB, MOsM e MO.

Meio de cultivo	Tempo (h)	Massa celular (g/L)	Produtividade ($g.L^{-1}h^{-1}$)
YMB	48	6,28	0,13
MOsM	72	11,04	0,15
MO	72	13,02	0,18

5.1.4.4. Bioconversão do limoneno e produção de surfactantes utilizando *Y. lipolytica* cultivada previamente em meio YMB, meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) e meio otimizado (MO)

Para verificar se a remoção, completa ou parcial, do extrato de malte do meio de cultivo poderia afetar o desempenho celular durante a bioconversão do limoneno, foi realizado um experimento de bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica* cultivada em MOsM, MO e o meio padrão YMB. As células para o ensaio de bioconversão foram colhidas no início ou próximo à fase estacionária do crescimento, isto é, 48 h para o meio YMB e 72 h para os meios MOsM e MO. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 17**.

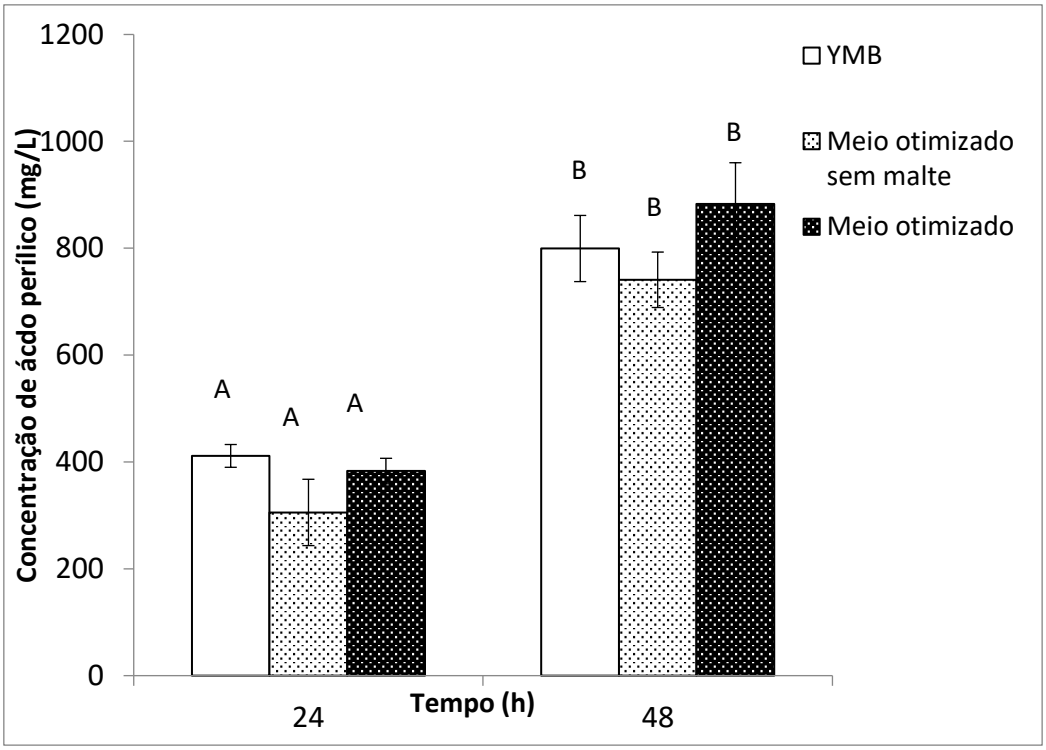


Figura 17. Comparação da concentração de ácido perílico produzido por *Y. lipolytica* cultivada nos meios de cultura YMB, MOsM e MO, com duas aplicações de R-(+)-limoneno 0,16% (v/v) e concentração celular inicial de 20 g/L em tampão fosfato de sódio pH 7,0 50 mM. As letras iguais acima das barras significam diferença insignificante de acordo com o teste ANOVA de fator único, seguido de teste de Tukey ($p<0,05$). A barra de erros significa o desvio padrão da média.

De acordo com o teste ANOVA de fator único, seguido de teste de Tukey ($p<0,05$), as células produzidas a partir dos diferentes meios não apresentaram diferenças significativas para a produção do ácido perílico.

Assim, levando-se em conta os resultados de crescimento celular (item 5.1.4.3), os meios mais adequados para obtenção de biomassa destinada à bioconversão seriam os meios MOsM e MO. Uma seleção mais criteriosa entre esses dois meios deve envolver uma análise econômica do processo, tendo em vista a diferença na produtividade de massa celular verificada.

Este é o primeiro trabalho de otimização da produção de biomassa de *Y. lipolytica* visando a produção de ácido perílico através da bioconversão do limoneno. Entretanto, há muitos trabalhos de otimização utilizando *Y. lipolytica* em bioprocessos de interesse industrial, como produção de lipases, ácido cítrico, bioemulsificantes e estudos em biorremediação.

Segundo Casas e Garcia-Ochoa (1999), a produção de biomassa celular por levedura do gênero *Candida* é favorecida em concentrações elevadas de extrato de levedura, o que causa a diminuição na produção de outros produtos de interesse industrial como biossurfactantes. De acordo com Alonso et al. (2001), que estudaram a produção de lipase, o extrato de levedura favorece o crescimento da levedura, já que não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas.

No presente trabalho foi avaliada adicionalmente a produção de surfactantes durante a bioconversão com as diferentes células estudadas, uma vez que esses agentes emulsificantes podem desempenhar algum papel na dissolução do limoneno e nos seus produtos de bioconversão, auxiliando no processo. A literatura tem reportado a produção de substância com atividade surfactante por *Y. lipolytica* em diferentes estágios de crescimento, bem como com diversos substratos, como hidrocarbonetos, glicerol e glicose (AMARAL et al., 2006). Entretanto, não há relatos, até o momento, de produção de surfactantes durante o processo de bioconversão do limoneno utilizando *Y. lipolytica*.

A **Figura 18** apresenta a produção de surfactantes, medida como atividade emulsificante, durante a bioconversão do limoneno, utilizando a levedura *Y. lipolytica* cultivada em meio YMB, MOsM e MO. Após 48 h de bioconversão, a atividade emulsificante foi bastante próxima para os três ensaios, na faixa de 0,38 unidades. Esses valores são relativamente baixos quando comparados com os dados de literatura, que reportam produção de até 2,63 unidades do surfactante durante o cultivo celular de *Y. lipolytica* em glicose (AMARAL et al., 2006).

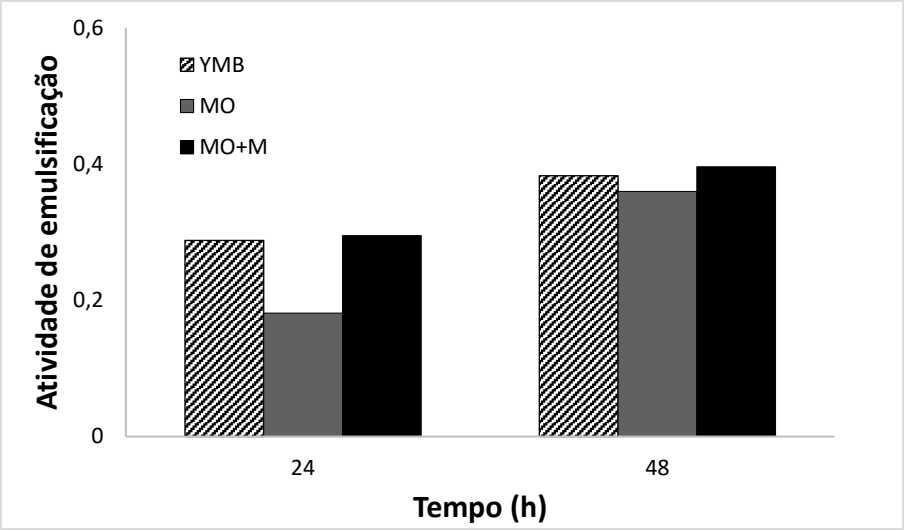


Figura 18. Perfil de produção de surfactante durante a etapa de bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica* em até 48 h, utilizando *Y. lipolytica* cultivada previamente em YMB, MOsM e MO Condições experimentais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (em 0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM. Experimento em duplicata.

Segundo Souza et al. (2012) somente houve uma produção satisfatória de surfactantes por *Y. lipolytica* quando o cultivo, utilizando óleo diesel como fonte de carbono, foi suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo. A ausência destes suplementos durante a bioconversão do limoneno no presente trabalho pode justificar a baixa produção de surfactantes por *Y. lipolytica*.

Em relação à produção de surfactantes em presença de substratos hidrofóbicos, Fickers et al. (2005) descrevem duas rotas prováveis de interação entre o substrato hidrofóbico e a parede celular da levedura, etapa tida como crucial para o transporte deste substrato do meio líquido para o interior da célula. A primeira faz referência à solubilização (ou pseudo-solubilização) na presença de compostos ativos de superfície p. ex., um transporte mediado por um surfactante; o conhecimento de que *Y. lipolytica* sintetiza surfactantes reforçaria essa hipótese. A segunda está relacionada à interação direta entre a superfície celular e o substrato, mediado por micro protrusões que fariam a comunicação entre a superfície e o interior celular, alterando de forma expressiva a polaridade da superfície da célula e, deste modo, sua afinidade por substratos de diferentes graus de hidrofobicidade.

5.2. Otimização das condições reacionais para a bioconversão de limoneno

Em trabalhos anteriores, foi realizado um planejamento fatorial fracionado para estudar o efeito das variáveis concentração de massa celular (5 a 20 g/L), concentração de limoneno

(0,1 a 0,5% v/v), pH (6,2 a7,2), temperatura (20 a 25°C) e adição de nutrientes (0 a 10% v/v) na concentração final de ácido perílico e no rendimento molar de bioconversão. Os resultados obtidos indicaram que a concentração de massa celular foi a variável que apresentou o maior efeito sobre os rendimentos em ácido perílico, sendo este muito superior, nas faixas estudadas, em comparação aos efeitos dos demais parâmetros avaliados. Um novo planejamento experimental fixando esta variável em 20 g/L mostrou que os parâmetros relevantes são a concentração de limoneno (maior influência) e o pH; e que a bioconversão pode ser realizada sem a adição de nutrientes. O processo de bioconversão foi a seguir otimizado por DCCR usando esses dois fatores e os resultados indicaram que a utilização de 0,44% (v/v) de limoneno e pH 6,9 forneceu a máxima de produção ácido perílico, de 868 mg/L, correspondendo a 20,4% de rendimento molar (que considera a produção de ácido perílico em relação à quantidade de limoneno adicionada), com 48 h de bioconversão. No entanto, o rendimento molar máximo da bioconversão obtido foi de 23,1% (368 mg/L de ácido perílico) utilizando-se 0,16% limoneno, pH 6,9 e 24 h de processo. Uma nova estratégia de processo foi então proposta, iniciando a bioconversão com baixa concentração de limoneno (0,16 % v/v) seguido de sua realimentação após 24 h de reação. Com esta estratégia, a concentração de ácido perílico aumentou cerca de duas vezes, passando para 793 mg/L, e o rendimento molar foi mantido (TAPPIN et al., 2017).

No presente trabalho, buscou-se dar continuidade aos experimentos de otimização da bioconversão do limoneno, com o intuito de determinar os pontos ótimos das variáveis concentração da massa celular de *Y. lipolítica* e concentração de limoneno. Para isto, foi realizado um delineamento fatorial completo 2^{3-1}, incluindo três pontos axiais e mais três repetições no ponto central, totalizando onze ensaios. As variáveis independentes, com as concentrações estudadas, e os resultados obtidos estão apresentadas na **Tabela 12.**

Tabela 12. Níveis para cada parâmetro estudado e as variáveis de respostas: concentração de ácido perílico, rendimento molar de ácido perílico (%) em 24 h de reação.

Ensaios	Massa celular (g/L)	Limoneno v/v (%)	Ácido perílico (mg/L)	Rendimento molar (%)
1	12,9 (-1)	0,16 (-1)	263,8	16,56
2	27,1 (1)	0,16 (-1)	512,7	32,19
3	12,9 (-1)	0,44 (1)	226,9	5,18
4	27,1 (1)	0,44 (1)	471,3	10,76
5	10,0 (-1,41)	0,30(0)	218,8	7,33
6	50,0 (1,41)	0,30 (0)	536,2	17,96
7	20,0 (0)	0,10(-1,41)	255,4	25,66
8	20,0 (0)	0,50 (1,41)	533,6	10,72
9	20,0 (0)	0,30 (0)	516,9	17,31
10	20,0 (0)	0,30 (0)	510,8	17,11
11	20,0 (0)	0,30 (0)	549,2	18,39

Inicialmente, a fim de se determinar qual o melhor tempo de reação para obtenção do maior rendimento molar da bioconversão, a cinética de bioconversão nas diferentes condições estudadas foi acompanhada, com amostras retiradas após 3, 6, 24 e 48 horas (**Figura 19)**.

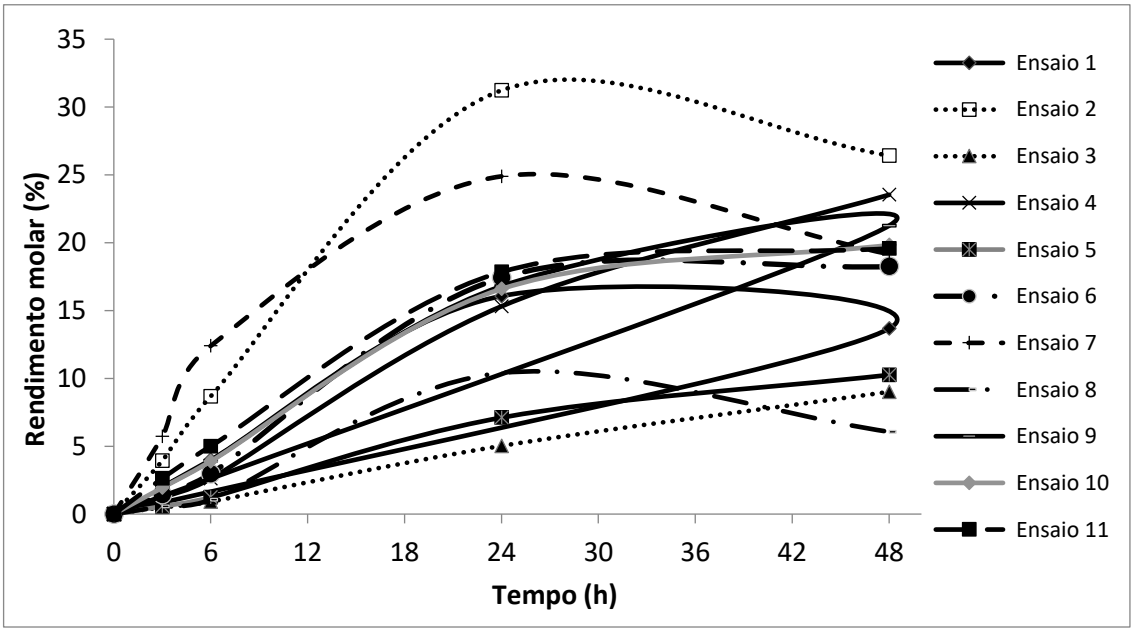


Figura 19. Perfil do rendimento molar ácido perílico/limoneno em até 48 horas de bioconversão para os 11 ensaios do DCCR.

Verifica-se que o ensaio 2, após 24 h, apresentou o maior rendimento (32,19%) dentre os experimentos realizados. Desta forma, foram utilizados os valores da produção do ácido

perílico em 24 h de processo para a determinação dos dados estatísticos de otimização da bioconversão. A **Tabela 12** apresenta as repostas obtidas para as diferentes condições avaliadas e a **Tabela 13** apresenta os efeitos das variáveis sobre o rendimento molar da bioconversão nesse tempo de processo.

A concentração de massa celular apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo em relação ao rendimento da bioconversão (p=0,002). Já a concentração de limoneno apresentou também efeito estatisticamente significativo, entretanto de forma negativa em relação ao rendimento. Este resultado sugere a sensibilidade de *Y. lipolytica* a altas concentrações de limoneno, corroborando a necessidade de adição gradual do substrato, conforme apontado no estudo anterior (Tappin et al., 2017). Adicionalmente, deve-se ressaltar a elevada volatilidade do limoneno, que contribui para diminuir os rendimentos da reação, especialmente em tempos prolongados.

Tabela 13. Estimativa dos efeitos do DCCR para o rendimento de ácido perílico.

Fator	Rendimento ácido perílico (%)			
	Efeito	**Erro padrão**	**t(2)**	**p-valor**
Média	17,59	0,39	44,27	0,0002
Massa celular (g/L) (L)	9,08	0,48	18,61	0,001
Massa celular (g/L) (Q)	-4,60	0,58	-7,90	0,014
Concentração de limoneno (mg/L) (L)	-13,52	0,48	-27,70	0,001
Concentração de limoneno (mg/L) (Q)**	NS	NS	NS	NS
1Lx2L	-5,02	0,68	-7,30	0,01

*t_{calc} é o valor encontrado no teste T-student do programa Statistica 7.0. % de variação explicada

** Variável não significativa (NS). R^2= 0,96

Através dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes de regressão de um modelo de segunda ordem para as variáveis codificadas e verificar a validade do modelo em função das variáveis estudadas através da análise de variância apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Teste ANOVA para rendimento de ácido perílico (%) considerando todos os termos do modelo obtido no DCCR.

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F_{calc*}
Regressão	512,07	3	170,69	33,28
Resíduos	35,91	7	5,13	
Total	547,97	10		

Rendimento: R^2=96,17%; F_{tab} (3;7; 0,05;) = 4,34

*Se F_{calc}>F_{tab}, o modelo é válido. Nível de significância (α) igual a 0,05. SQ – Soma dos quadrados; GL – graus de liberdade; QM – Quadrados médios

Verifica-se que, para a produção de ácido perílico, foram significativos os termos lineares e quadráticos de massa celular e concentração de limoneno, todos com p<0,05%. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados no resíduo, e os parâmetros significativos permitiram elaborar um modelo com as variáveis codificadas que representam o comportamento de rendimento de ácido perílico:

Rendimento de ácido perílico (%) = 17,60 + 9,07 massa celular – 4,59 massa celular² – 13,50 concentração de limoneno + -5,02 massa celular x concentração de limoneno.

Os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos de acordo com o teste F, com 95% de confiança. De acordo com os dados apresentados na **Tabela 12**, os valores de F calculados para as variáveis rendimento de 33,28 foi maior do que o Ftab (4,34). Assim, foi possível construir as superfícies de resposta definindo as regiões de interesse, as quais possuem os valores de resposta positivos para o rendimento molar em ácido perílico. Os gráficos de superfície de resposta e contorno, apresentados na **Figura 20**, nos permitem determinar a faixa ótima de concentração celular e de limoneno para a obtenção de maiores rendimentos.

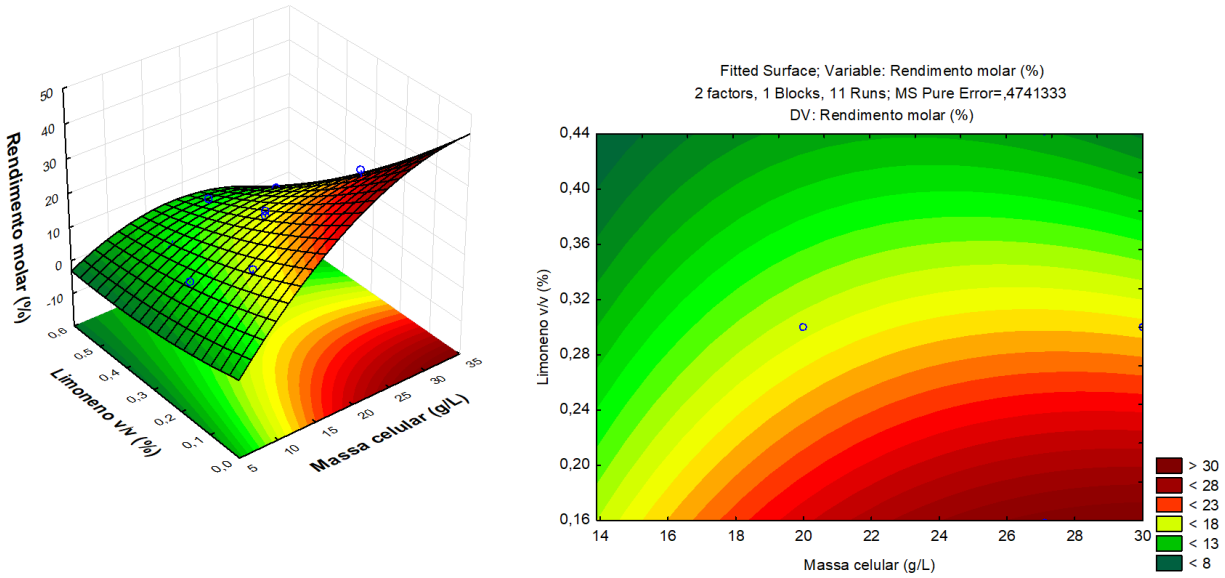


Figura 20. Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento molar da produção de ácido perílico (%) em função das concentrações de limoneno (% v/v) e de massa celular (g/L).

Os maiores valores de rendimento molar (32,19%), entretanto, foram obtidos na concentração mínima estudada para a variável independente concentração de limoneno (0,16% v/v) e na máxima para a variável massa celular (27,1 g/L). O rendimento molar encontrado nas condições ótimas determinadas é maior em relação ao atingido anteriormente, de 23,1% (TAPPIN et al. 2017).

Esses resultados corroboram com estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa e indicam que o rendimento da bioconversão e a concentração final de ácido perílico podem ser maximizados iniciando-se o processo com concentrações baixas de limoneno, seguido de sua realimentação em tempos adequados. Ensaios com concentrações menores de limoneno acompanhando a cinética do processo para determinar o tempo adequado de realimentação deverão ser realizados para confirmar essa possibilidade.

5.3. Adaptação evolutiva da levedura *Y. lipolytica* visando à obtenção de uma linhagem adequada à bioconversão com elevada concentração de limoneno

5.3.1. Adaptação da levedura *Y. lipolytica* a concentrações crescentes de limoneno

A engenharia evolutiva se baseia no cultivo de micro-organismos em meios específicos que exercem uma pressão seletiva levando a uma evolução. Trabalhos de engenharia evolutiva têm sido de grande importância para indústria, cujo objetivo é selecionar uma população

microbiana com características vantajosas, do ponto de vista de rendimento de um produto de interesse econômico (SAUER, 2001).

Neste trabalho foram realizados experimentos de adaptação evolutiva a fim de selecionar uma população de *Y. lipolytica* resistente à toxicidade do limoneno, permitindo assim um aumento na produção de ácido perílico. Esta adaptação se tornou necessária, pois estudos anteriores verificaram que o crescimento de *Y. lipolytica* foi inibido quando limoneno na concentração de 0,1% v/v foi adicionado ao meio YMB, indicando a toxicidade do limoneno às células da levedura (FERRARA et al., 2013).

Assim, a levedura *Y. lipolytica* foi exposta a concentrações crescentes de limoneno durante o cultivo no meio convencional YMB. A **Tabela 15** apresenta o número de passagens efetuadas, com as respectivas concentrações de limoneno utilizadas e ainda o crescimento e a viabilidade celular obtidos.

Tabela 15. Crescimento e viabilidade celular da levedura *Y. lipolytica* exposta a concentrações crescentes de limoneno. Tempo de cultivo: 48 h em frascos agitados contendo meio YMB.

Passagem	Limoneno v/v (%)	Massa celular (g/L)	Viabilidade celular UFC/mL
1	**0**	**4,52**	**16,8 x 10^6**
2	0,03	2,40	4,7 x 10^6
4	0,03	5,66	3,8 x 10^6
5	0,04	7,50	3,8 x10^6
6	0,04	6,99	6,9 x 10^6
7	0,04	7,51	0,98 x 10^6
8	0,05	6,35	0,6 x 10^6
9	0,05	5,39	5,1 x 10^6
10	0,05	5,55	6,7 x 10^6
11	0,06	6,62	2,1 x 10^6
12	0,06	5,54	18,3 x 10^6
13	0,06	5,32	11,8 x 10^6
14	0,08	5,66	7,9 x 10^6
15	0,08	4,74	0,97 x 10^6
16	0,08	2,53	1,3 x 10^6
17	0,08	4,38	0,9 x 10^6
18	0,08	5,12	7,3 x 10^6
19	0,10	3,27	4,1 x 10^6
20	0,10	4,10	24,3 x 10^6
21	0,10	4,96	22,4 x 10^6
22	0,11	4,50	6,8 x 10^6
23	0,11	3,72	8,3 x 10^6
24	0,11	2,12	15,9 x 10^6
25	0,11	1,47	7,1 x 10^6
26	0,12	0,07	< 10^5
27	0,12	1,52	12,7 x 10^6
28	0,12	1,69	16,2 x 10^6
29	0,12	1,86	5,5 x 10^6
30	0,12	1,25	23,2 x 10^6

Após 30 passagens, foi obtida uma cepa de *Y. lipolytica* com características fenotípicas de resistência à concentração de até 0,12% v/v de limoneno durante o cultivo, contrastando com a linhagem original de *Y. lipolytica*, que não apresentou crescimento quando cultivada na presença de limoneno 0,1% v/v (FERRARA et al., 2013). Após os experimentos de engenharia evolutiva para adaptação ao limoneno, foram realizados experimentos de bioconversão do limoneno em condições padronizadas com as células da 30ª passagem a fim de avaliar seu potencial de produção de derivados perílicos, em comparação às células nativas. Para esse ensaio, ambas as células foram cultivadas em meio YMB, conforme descrito no item 4.2. Para avaliar se as células adaptadas da 30ª passagem seriam capazes de aumentar a produção de

ácido perílico quando induzidas através do crescimento em presença de limoneno, foi realizado, em paralelo, um ensaio de bioconversão utilizando as células da 30ª passagem cultivadas em meio YMB acrescido de limoneno 0,02% (v/v).

A **Figura 21** apresenta os resultados obtidos de bioconversão, a linhagem adaptada de *Y. lipolytica* produziu 902,6 mg/L de ácido perílico após 48 h (rendimento molar de 28,34 %), enquanto a linhagem selvagem produziu 728,9 mg/L (rendimento de 22,9%), correspondendo a um aumento na produção de ácido perílico de 23,8%. Quando se utilizou a linhagem adaptada, desta vez induzida previamente com limoneno durante o seu crescimento, foram produzidos 1308,8 mg/L de ácido perílico (rendimento molar de 41,1%), o que corresponde a um acréscimo de 79,5% em comparação à cepa de origem. Além da maior produção de ácido perílico, uma das vantagens da utilização da levedura adaptada (30 passagens), chamada a partir deste ponto neste trabalho de *Y. lipolytica* adaptada, seria permitir a realização de bioconversões com elevadas concentrações de limoneno, com a finalidade de aumentar o rendimento e produtividade do processo, já que esta população é mais tolerante ao limoneno. Outra vantagem seria a possibilidade de reutilização das células da levedura adaptada em repetidos ciclos de bioconversão. Essas possibilidades deverão ser testadas em experimentos futuros.

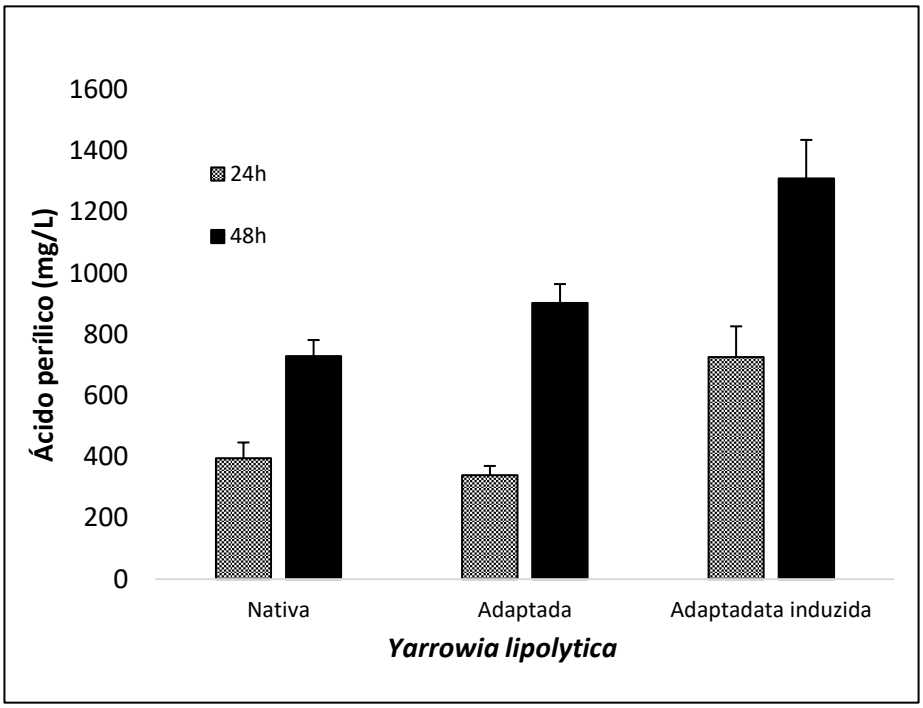


Figura 21. Bioconversão do limoneno em 48 h, utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* nativa, adaptada (30ª passagem) e adaptada induzida durante o cultivo pela adição de limoneno 0,02 % (v/v). Condições reacionais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, 48 h.

A obtenção de linhagens de levedura evoluídas em laboratório é uma estratégia comprovadamente eficiente para diversas finalidades. Como exemplos, podem ser citados a otimização do transporte de maltose em cultivos anaeróbios longos em quimiostato (SAUER, 2001), metabolização de xilose e arabinose por linhagens de *S. cerevisiae* engenheiradas (KUYPER et al., 2005; WISSELINK et al., 2009), produção de lipídeos por *S. cerevisiae* (REYES et al., 2014), entre outros. A literatura relata diversos trabalhos em que a metodologia da adaptação evolutiva foi empregada com a finalidade de se obter cepas de *Y. lipolytica* com diferentes características de interesse melhorada, como aumento da produção de lipídeos, tolerância ao estresse osmótico e halo-tolerância (REYES et al., 2014; LIU et al., 2015 e Hellgren, 2017). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura sobre estudos de adaptação de *Y. lipolytica* para a produção de derivados perílicos a partir de terpenos. No presente trabalho a adaptação evolutiva foi realizada com sucesso, obtendo-se uma linhagem com um fenótipo de maior resistência ao limoneno do que a linhagem nativa.

A toxicidade celular dos monoterpenos é geralmente atribuída à interferência dessas moléculas hidrofóbicas na membrana celular (BRENNAN et al., 2013), sendo o mecanismo específico de interação física ainda incerto. Brennan et al. (2013) utilizaram engenharia evolutiva para isolar fenótipos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a limoneno, demonstrando, a nível genético, as alterações evolutivas frente à presença de limoneno. Nesse estudo, a evolução adaptativa foi realizada empregando a metodologia de passagem serial, assim como no presente trabalho, resultando em cepas com maior tolerância à presença do limoneno. É interessante notar que o sequenciamento do genoma de cepas de *S. cerevisiae* adaptadas permitiu analisar algumas alterações genotípicas. Mutações no fator de transcrição PDR3 foram detectadas em todas as cepas adaptadas. Os genes da dioxigenase e oxirredutase *JLP1* e *OYE3*, por exemplo, foram altamente regulados positivamente. Além disso, houve aumento na indução dos genes de biossíntese de glutationa e de proteção de peróxido *CTT1* e *GPX1*.

A literatura relata que bombas de efluxo acopladas à membrana celular desempenham um papel crítico na tolerância ao limoneno em *Pseudomonas putida* (KIEBOOM et al., 1998). A expressão das proteínas de efluxo AcrAB-TolC em *Escherichia coli* levou a uma maior tolerância ao ciclohexano (AONO et al., 1998) e ao α-pineno e limoneno (DUNLOP et al., 2011). De forma semelhante ao sistema de bombeamento bacteriano, a detoxificação celular em leveduras é originada primariamente por bombas relacionadas à resistência pleiotrópica a drogas, que são uma subfamília das proteínas transportadoras ABC da levedura (BAUER et al. 1999).

5.3.2. Morfologia das células de *Y. lipolytica*

Determinadas espécies de levedura exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar entre duas formas morfológicas: células ovoides e hifas bastante alongadas. Esta característica está associada a fator de virulência em algumas espécies de levedura, e está relacionada às condições nutricionais, como fonte de nitrogênio, pH e temperatura do cultivo (BARTH e GAILLARDIN, 1997). *Y. lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de levedura, pseudohifas e hifas septadas. Essa alteração de morfologia pode impactar o processo fermentativo em função de alterações reológicas e, consequentemente, promover alterações de transferência de massa e de calor no biorreator (Coelho et al., 2010). Tal dimorfismo não foi observado durante o crescimento em meio YMB para as células de *Y. lipolytica* nativas, ou para as células adaptadas induzidas ou não com 0,02% v/v de limoneno (**Figura 22**).

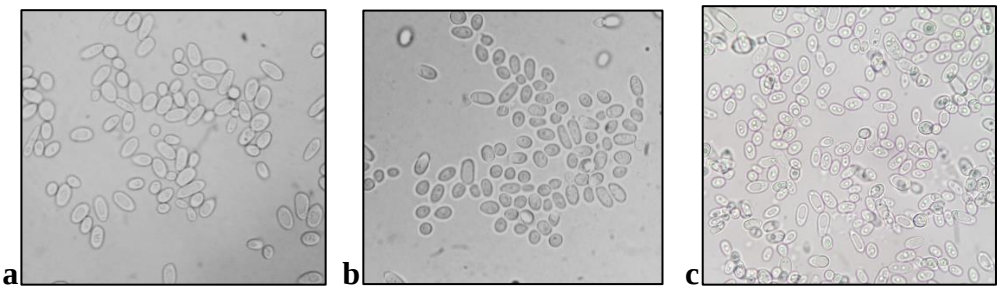


Figura 22. Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* nativa (**a**), adaptada (30ª passagem) (**b**) e adaptada (30ª passagem) induzidas com 0,02% de limoneno (**c**), após cultivo por 48h em meio YMB. Aumento de 1000x utilizando microscópio ótico Nikon modelo Eclipse E200.

5.3.3. Avaliação da estabilidade da linhagem de *Y. lipolytica* adaptada

As linhagens obtidas através de experimentos de adaptação evolutiva, seja em cultivo contínuo (quimiostato) ou por culturas sucessivas, podem apresentar baixa estabilidade genética no que diz respeito à manutenção das novas características adquiridas, sendo a queda de produtividade de micro-organismos adaptados um grande problema para a indústria que utiliza bioprocessos (GRESHAM e HONG, 2015).

Visando avaliar a estabilidade da linhagem de *Y. lipolytica* adaptada ao limoneno (30ª. passagem), as células foram testadas para a bioconversão do limoneno após estocagem a -80 ºC durante 10 meses. O experimento foi conduzido com células ativadas ou não durante o

crescimento com *R*-(+) limoneno 0,02%, comparando-se com a levedura nativa mantida sob as mesmas condições. Os resultados são apresentados na figura 23.

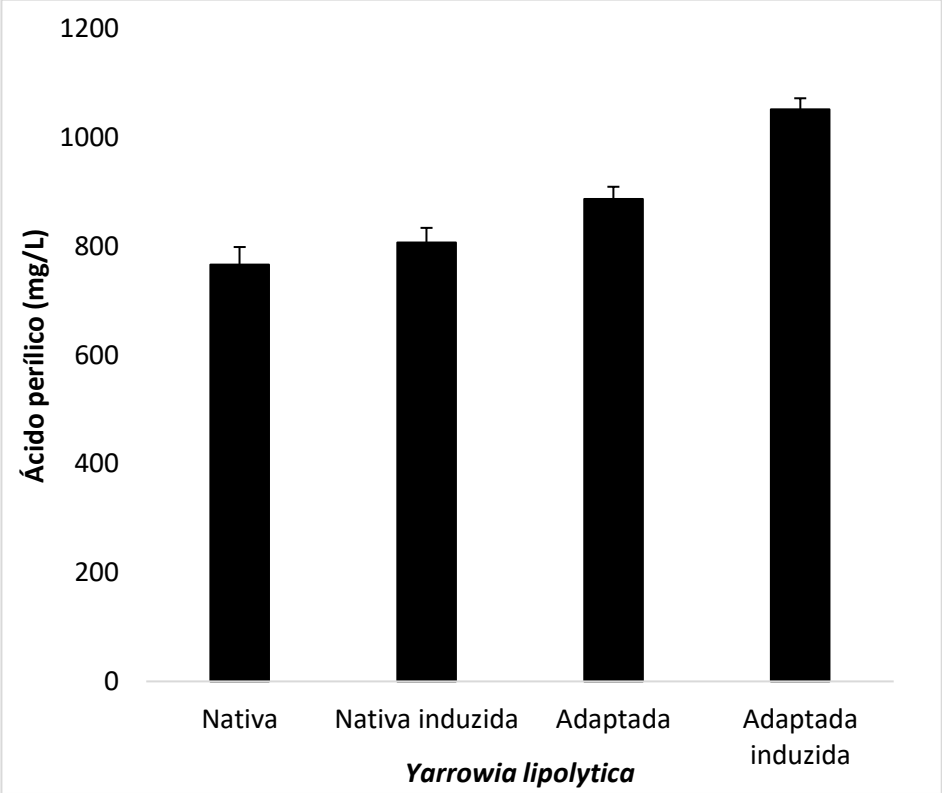


Figura 23. Bioconversão do limoneno em 48 h, utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* nativa, *Y. lipolytica* nativa induzida durante o cultivo pela adição de limoneno 0,02 % (v/v), adaptada (30ª passagem) e adaptada induzida, após estocagem a -80°C por 10 meses. Condições reacionais: duas aplicações de limoneno 0,16% v/v (0 e 24 h), 20 g/L de massa celular, tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM, 48 h.

De acordo com os dados apresentados na figura 23, as células adaptadas ao limoneno, quando induzidas, produziram 1052,2 mg/L de ácido perílico, valor significativamente maior do que o obtido pelas células nativas porem representando uma redução de 19,6% em relação ao obtido na bioconversão com as células adaptadas antes da estocagem (1308,4 mg/L-Figura 22). Tal perda não foi observada para a linhagem nativa armazenada sob as mesmas condições. Uma alternativa para se mitigar este problema seria realizar constantes cultivos dos micro-organismos adaptados utilizando o agente transformador, mantendo-se a pressão seletiva necessária para a estabilidade do genótipo microbiano. Como já mencionado, a literatura relata diversos trabalhos em que a metodologia da adaptação evolutiva em *Y. lipolytica* é utilizada (LIU et al., 2015 e HELLGREN, 2017); contudo não foram encontrados estudos sobre a

avaliação da manutenção das características de interesse obtidas pela linhagem de *Y. lipolytica* adaptada.

5.4. Produção de biomassa celular e bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado

5.4.1. Produção de biomassa celular

O cultivo em biorreator instrumentado permite um controle maior dos parâmetros operacionais, como pH, temperatura e oxigenação, proporcionando condições ambientais mais adequadas ao metabolismo celular, levando consequentemente a maiores rendimentos e produtividade do processo. A operação em batelada alimentada, na qual um ou mais componentes do meio de cultura são alimentados de forma intermitente ou contínua, por sua vez, permite manter a concentração dessas substâncias em níveis sub-inibitórios, com implicações diretas no desempenho celular.

No presente trabalho, a produção de massa celular em biorreator foi realizada com a linhagem de *Y. lipolytica* nativa, empregando-se o meio de cultivo otimizado (MO); o modo de operação foi a batelada alimentada, visando-se a obtenção de densidade celular na faixa de 27 g/L a ser utilizada na etapa posterior de bioconversão do limoneno. Este valor foi indicado nos experimentos de otimização para a obtenção de maiores rendimentos molares de bioconversão (item 5.2). A **Figura 24** apresenta a cinética de crescimento e consumo de glicose pela levedura durante o cultivo.

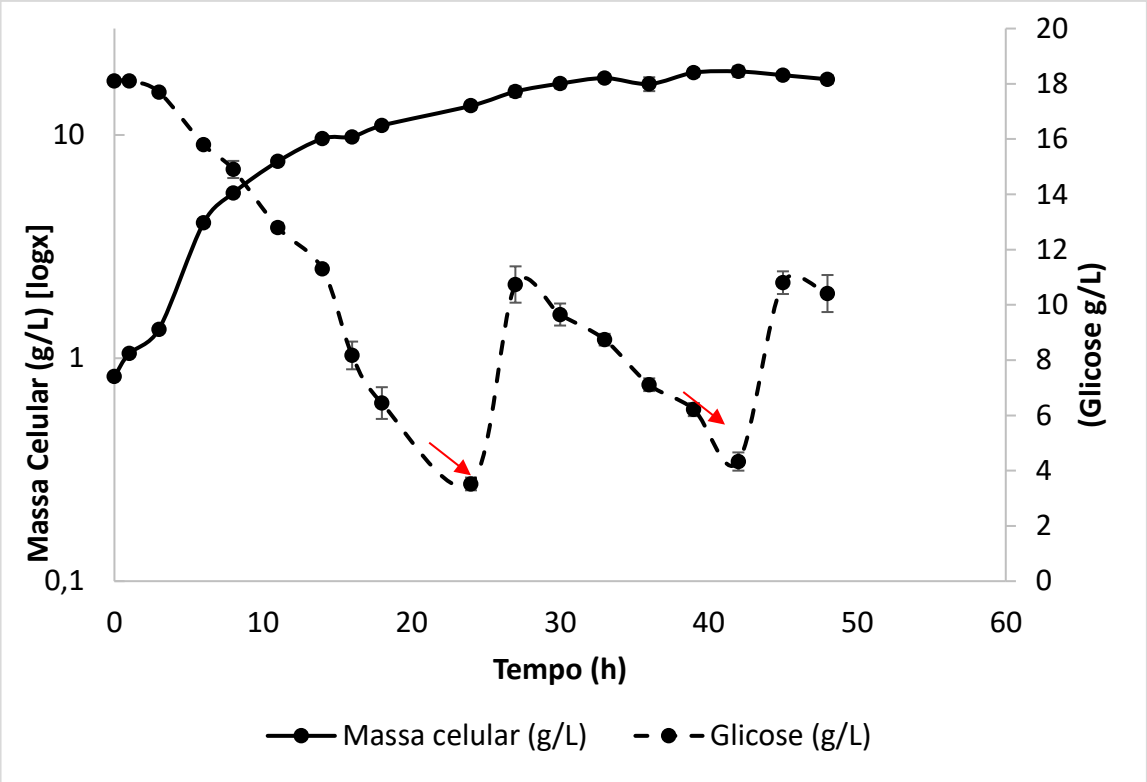


Figura 24. Cinética da produção de massa celular de *Y. lipolytica* e concentração de glicose em meio otimizado em biorreator por batelada alimentada em pulsos. Nos tempos assinalados pelas setas, foram adicionados 50 mL de meio otimizado concentrado 10 vezes.

Observa-se um crescimento celular exponencial durante as primeiras 10 h de cultivo, com uma taxa específica de crescimento (μ) de 0,20 h^{-1}, tempo de geração (Tg) de 3,47 h e uma taxa de consumo média de glicose de 0,68 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Quando a concentração da fonte de carbono residual se aproximou de 10% da concentração inicial, após 24 h de cultivo, adicionou-se ao meio reacional um pulso de 50 mL de meio MO concentrado 10 vezes. Durante a batelada alimentada, a taxa de crescimento da levedura foi reduzida para 0,18 h^{-1} e o tempo de geração aumentou para 3,85 h. A concentração celular atingiu 18,0 g/L com 33 h de cultivo, valor este próximo ao valor empregado no procedimento padronizado de bioconversão, conforme descrito no item 4.3 (20 g/L). Com mais 6 horas de cultivo, a concentração celular aumentou em apenas 1 g/L, permanecendo nesta faixa mesmo após a alimentação de mais um pulso de meio MO concentrado 10 vezes, indicando que a cultura atingiu seu limite para as condições empregadas.

Workman e colaboradores (2013) estudaram o cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator instrumentado, utilizando glicose como fonte de carbono, vazão de ar de 1 vvm, agitação a 600 rpm e pH controlado em 4,5 a 30 ºC. Os autores reportaram uma taxa de crescimento de 0.24 h^{-1}, similar às obtidas no presente trabalho.

A maior velocidade específica máxima de crescimento (µMáx) reportada para uma linhagem de *Y. lipolytica*, durante o crescimento com glicose como única fonte de carbono, foi 0,36 h^{-1}, para a linhagem Wratislavia K1 (RYWIŃSKA et al., 2010). Também foram reportadas velocidades entre 0,1 e 0,26 h^{-1} para cultivos utilizando glicerol como única fonte de carbono para esta mesma linhagem (RYWIŃSKA et al., 2010).

A concentração de massa celular obtida no presente estudo está muito próxima à reportada por Machado Junior et al. (2015), que estudaram a produção de lipídeos por *Y. lipolyitica* NRRL YB-423 utilizando glicerol como fonte de carbono em biorreator instrumentado, obtendo uma concentração de massa celular de 19,14 g/L em condições otimizadas de agitação e vazão de ar por planejamento estatístico (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - K_La de 8,29 h^{-1}).

Galvagno et al. (2011) em estudo de otimização para produção de lipases em meio contendo glicerol, obtiveram uma produção máxima de 16,1 g/L em 48 h, em biorreator de 5 L.

Juszczyk et al. (2013) selecionaram, entre 21 cepas de *Y. lipolytica* oriundas de diferentes ambientes, uma linhagem com maior capacidade de crescimento em meio contendo glicerol como fonte de carbono. Esta linhagem foi cultivada em biorreator de 5 L com taxa de aeração de 1 vvm e agitação de 550 rpm atingindo uma concentração de 12,3 g/L de massa celular, correspondendo a uma produtividade de 1,37 $g.L^{-1}h^{-1}$.

A concentração de biomassa de levedura utilizando como substratos resíduos líquidos de origem vegetal ou melaço (CHANDA e CHAKRABARTI, 1996; SHOJAOSADATI et al., 1999) foi semelhante aos resultados apresentados no presente estudo.

Por sua vez, Taccari e colaboradores (2012) demonstraram que o uso de glicerol para o cultivo de *Y. lipolytica* resultou em um nível similar da produção de biomassa quando comparado com cultivos tendo glicose como fonte de carbono. Além disso, como resultado da otimização do processo, a produção de biomassa aumentou de 17 para 25,7 g/L.

Pode-se constatar a partir dos dados da literatura apresentados acima e dos resultados do presente trabalho, que a otimização do meio de cultivo em frascos agitados e a aplicação do meio otimizado (MO) em biorreator foi capaz de promover um aumento satisfatório na produção de biomassa de *Y. lipolytica* com o objetivo de ser empregada na bioconversão do limoneno, representando o primeiro estudo de otimização de produção de biomassa de *Y. lipolytica* para esta aplicação.

5.4.2. Bioconversão com aeração convencional

A grande maioria dos estudos de biotransformação de monoterpenos descritos até o momento não apresenta um processo aplicável em larga escala, sendo inviáveis do ponto de vista industrial, devido aos baixos rendimentos obtidos, atribuídos à volatilidade e toxicidade do substrato aos micro-organismos (Chatterjee e Bhattacharyya 2001).

Em experimentos de bioconversão do limoneno em biorreator conduzidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), foi utilizado o sistema de aeração convencional, no qual o ar é borbulhado no seio do meio de cultura, a partir do fundo do reator. Nesses experimentos, optou-se por adicionar o limoneno diretamente ao meio de cultura após a etapa de crescimento da levedura, ajustando-se previamente o pH ao valor adequado (7,0). Desta forma, seriam eliminadas as etapas de separação das células por centrifugação e adição de novo meio reacional (como realizado quando o crescimento e a bioconversão são realizados em frascos agitados), significando vantagens operacionais. Entretanto, o rendimento da etapa de bioconversão observado foi muito menor do que o alcançado em frascos agitados. Esta menor produção de ácido perílico em biorreator poderia estar relacionada a diversos fatores: presença de inibidores produzidos pela levedura durante o crescimento; presença de antiespumante no cultivo em biorreator; alterações morfológicas da célula de levedura ocasionadas pelas diferentes condições de agitação e aeração do cultivo em biorreator em relação ao cultivo em frascos agitados e/ou pela presença do antiespumante; volatilização do limoneno causada pela aeração forçada no biorreator. Com relação a este último fator, o borbulhamento de ar no seio do meio de cultura poderia causar o arraste do limoneno, já que se trata de substância de elevada volatilidade e praticamente insolúvel em água.

Assim, como tentativa de elucidar essas questões, no presente experimento as células foram inicialmente crescidas em meio MO em biorreator em batelada alimentada, conforme descrito no item anterior; na etapa de bioconversão, optou-se por realizar o processo em fermentador de forma semelhante à realizada em frascos agitados, isto é, separando-se as células do meio de cultivo, após a etapa de crescimento, por centrifugação e ressuspendendo-as em tampão fosfato pH 7,0, para então iniciar a etapa de bioconversão. Para minimizar a possível volatilização do limoneno, na etapa de bioconversão a concentração de oxigênio dissolvido no meio foi diminuída de 30% para 5%; a agitação, de 250-700 rpm para 250-300 rpm; e a vazão de ar, de 0,5 para 0,2 vvm. A temperatura foi mantida em 25°C.

Em paralelo, foram efetuados dois ensaios de bioconversão em triplicata, em frascos agitados, com as células crescidas no biorreator: no primeiro conjunto deles, a bioconversão foi realizada de forma convencional (controle), isto é, centrifugando as células e ressuspendendo-as em tampão fosfato pH 7,0, conforme descrito no item 4.3; no segundo conjunto, o pH do meio de crescimento foi ajustado a 7,0 e, a seguir, o limoneno foi diretamente adicionado à cultura. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 25**.

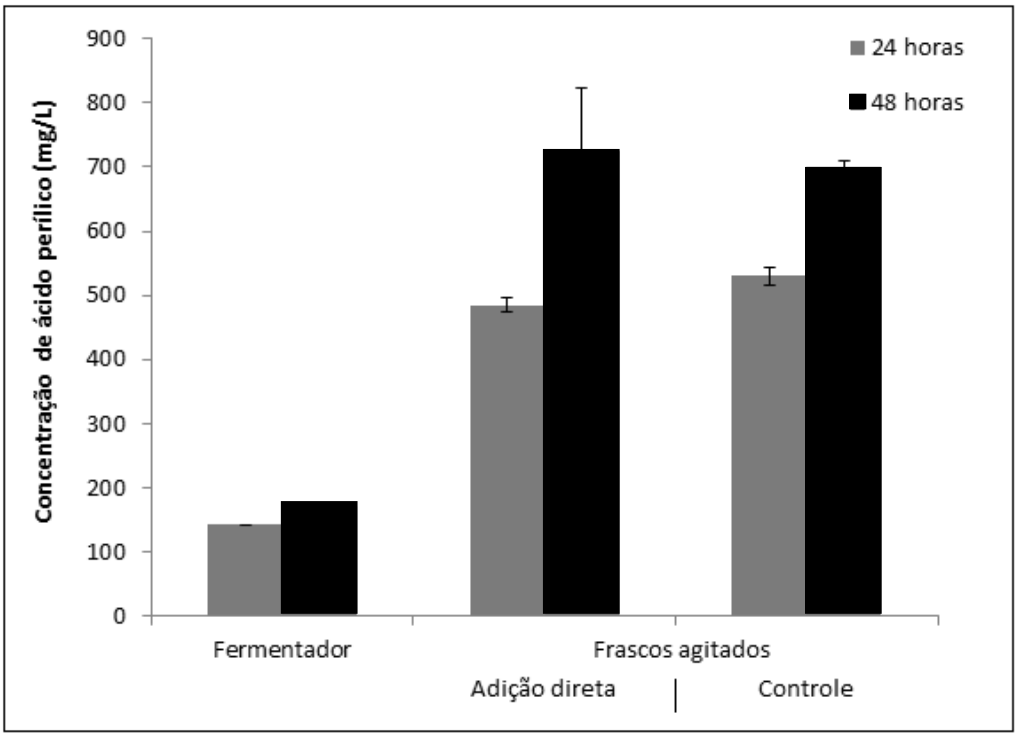


Figura 25. Produção de ácido perílico pela levedura *Y. lipolytica* crescida em biorreator instrumentado (meio MO, em batelada alimentada). Fermentador: bioconversão conduzida em biorreator, a partir da centrifugação das células e ressuspensão em tampão fosfato pH 7,0; Controle: corresponde a bioconversão convencional; Adição direta de limoneno: corresponde a bioconversão realizada sem a centrifugação das células, ou seja, o limoneno foi adicionado diretamente ao meio de cultura após ajuste do pH do meio a 7,0.

Na bioconversão conduzida em fermentador a concentração de ácido perílico atingiu 142,5 mg/L com 24 h e 170,9 mg/L com 48 h, valores estes muito menores do que os obtidos quando as duas etapas, crescimento celular e bioconversão, são realizadas em frascos agitados, 405,60 mg/l com 24 h e 757,7 mg/L com 48 h, de acordo com os resultados médios obtidos no presente trabalho.

Nos ensaios de bioconversão realizados em agitador rotatório observa-se que em 24 horas, foram obtidas concentrações de ácido perílico de 485 mg/L na bioconversão controle e 530 mg/L no experimento com adição direta de limoneno ao meio de cultura. Já em 48 horas, a concentração de ácido perílico apresentou valor de 725 mg/L no controle e 700 mg/L no ensaio de adição direta de limoneno ao meio. Os rendimentos das bioconversões foram muito próximos, não se observando diferenças estatisticamente significativas para as duas condições testadas. Por outro lado, esses resultados foram equivalentes aos usualmente obtidos na bioconversão utilizando as células crescidas em frascos agitados, indicando que a levedura produzida em biorreator está apta a converter o limoneno com a mesma eficiência do que a produzida em agitador rotatório, evidenciando assim que a exposição ao antiespumante e possíveis mudanças na morfologia da célula não influenciaram em seu desempenho. Os dados obtidos mostram também que a presença do sobrenadante do cultivo celular não influenciou a etapa de bioconversão, indicando que é possível eliminar uma etapa do processo de bioconversão, o que é bastante interessante em termos de produtividade global do processo e de custos.

Os resultados globais obtidos nestes ensaios indicam que os baixos rendimentos de bioconversão observados até o momento em biorreator podem ser atribuídos ao arraste do limoneno causado pelo sistema de aeração utilizado.

5.4.3. Bioconversão em biorreator com aeração de superfície

Com a finalidade de minimizar a perda do substrato por volatilização durante o processo de bioconversão do limoneno em biorreator, foram testados cultivos em biorreator nos quais, durante a etapa de bioconversão, o sistema de aeração convencional (borbulhamento de ar no seio do meio de cultura, a partir do fundo do reator) foi substituído por aeração de superfície, na qual o ar é inserido a partir da parte superior do reator, acima do meio de cultura, conforme esquema apresentado na Figura 9.

Nestes experimentos a etapa de obtenção de biomassa celular foi realizada com aeração convencional, utilizando-se o meio otimizado (MO) e as condições descritas nos itens 4.9.1 e 4.9.2, respectivamente. Atingida a concentração de massa celular na faixa de 20 g/L, a etapa de bioconversão foi iniciada mudando-se o modo de injeção de ar para aeração de superfície. Os parâmetros operacionais foram ajustados (temperatura de 25°C, pH 7,0, velocidade de agitação entre 300 e 600 rpm, taxa de aeração e concentração de oxigênio dissolvido nos valores

estipulados) e a alimentação de limoneno foi iniciada, injetando-se o substrato (0,16% v/v) a cada 24 h.

Foram testadas três diferentes condições de aeração, variando-se a concentração de oxigênio dissolvido (pO_2) e a taxa de aeração (vvm). A tabela 16 apresenta as concentrações de ácido perílico obtidas em cada experimento com 48 h de bioconversão; para fins de comparação, foi incluído o resultado obtido com aeração convencional. Observa-se que a aeração de superfície foi muito mais eficiente do que a convencional, uma vez que valores semelhantes de parâmetros de aeração resultaram em um aumento de 2,6 vezes na concentração do produto. A maior concentração de ácido perílico (840,0 g/L) foi alcançada com os maiores valores de pO_2 (1,0%) e taxa de aeração (0,5 vvm) testados, mostrando a importância da oxigenação do meio reacional para a formação do produto de interesse. Isso já era esperado, uma vez que o sistema enzimático P450, ao qual é atribuída a oxidação do limoneno por leveduras (DUETZ et al., 2003) é dependente de oxigênio molecular. A concentração de produto obtida na melhor condição de aeração testada foi quase 5 vezes maior do que a alcançada no experimento anterior em biorreator com aeração convencional (170,9 mg/L) e equivalente aos valores obtidos quando da bioconversão em frascos agitados no mesmo período.

Tabela 16. Influência de parâmetros operacionais na bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica* em biorreator. Tempo de bioconversão: 48 h.

Tipo de aeração	**Oxigênio dissolvido (pO_2) (%)**	**Taxa de aeração (vvm)**	**Ácido perílico (mg/L)**
Convencional	0,5	0,2	170,9
Superfície	0,5	0,2	449,7
Superfície	1,0	0,2	618,1
Superfície	1,0	0,5	840,0

A figura 26 apresenta a cinética de produção de ácido perílico em biorreator com aeração de superfície na melhor condição testada. Observa-se que com 24 h de bioconversão, a concentração de ácido perílico estava em 596,6 mg/L, atingindo 839,9 mg/L com 48 h. Esses valores são cerca de 47% e 11% superiores, respectivamente, aos obtidos em frascos agitados (405,6 mg/L com 24 h e 757,7 mg/L com 48 h; média dos resultados do presente trabalho). Após mais 48 horas, a concentração de produto atingiu 1223,6 mg/L. Os rendimentos molares (calculados em relação à quantidade adicionada de limoneno) para cada tempo foram de, respectivamente, 37,5%, 26,4% e 19,1%. A queda acentuada no rendimento da bioconversão

com o tempo, visualizada também através do perfil cinético (Figura 26), que mostra uma queda na velocidade da reação, sugere perda de viabilidade celular e/ou ainda uma possível inibição por produto. Com 96 horas de bioconversão, a viabilidade celular era de 76,8%, valor este razoável, considerando-se que não foram acrescentados nutrientes ao meio reacional durante esse período.

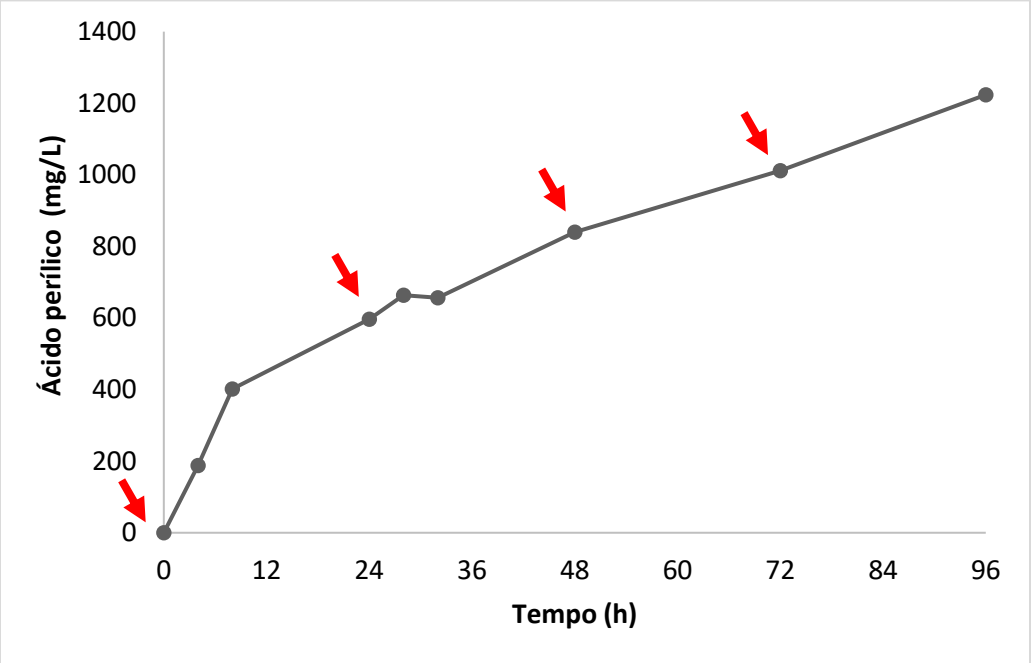


Figura 26. Bioconversão do limoneno em biorreator instrumentado com aeração de superfície. Condições operacionais: 20 g/L de massa celular, pH 7,0, 1% de saturação de oxigênio, pO2 de 1%, taxa de aeração de 0,5 vvm e com adição de 0,16% (v/v) de limoneno a cada 24 h (indicada pelas setas vermelhas). Média dos resultados do experimento realizado em duplicata.

O presente trabalho reporta pela primeira vez a bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica* em biorreator instrumentado. Os resultados obtidos mostraram que a estratégia de modificar o modo de areação durante a etapa de bioconversão, passando-se a injetar o ar a partir do topo do vaso reacional, acima do meio de cultura, propiciou uma perda do limoneno muito menor, favorecendo a obtenção de taxas de bioconversão expressivamente maiores do que as obtidas com aeração convencional.

A disponibilidade de oxigênio dissolvido (pO_2) é um fator muito importante em processos biotecnológicos que empregam microrganismos estritamente aeróbios, assim como *Y. lipolytica*, pois pode afetar não só o crescimento celular como também a produtividade do metabólito de interesse (Gomes et al., 2007). Muitos estudos comprovam uma melhora na produção do produto de interesse, associada à melhora da transferência de oxigênio para o meio

de cultura. Kamzolova e colaboradores (2003), Kamzolova e colaboradores (2017), Rywin'ska e colaboradores (2012), Kamzolova e colaboradores (2013). Morgunov e colaboradores (2013) demonstraram que uma melhor aeração do meio de cultivo aumentou a produção de ácido cítrico por estirpes de *Y. lipolytica*.

No caso de biotransformações de monoterpenos, no entanto, disposições adicionais devem ser tomadas para lidar com a volatilidade e a toxicidade do substrato (Peschek e Mirata, 2009). Assim como no presente trabalho, Pescheck e colaboradores (2009) observaram que modificações na forma de aeração poderiam minimizar os efeitos das perdas via saída de ar, devido à volatilidade do limoneno, quando aplicado em processo em biorreator. No referido trabalho, foi desenvolvido um processo de produção de (+)-α-terpineol pela bioconversão do limoneno por *Penicillium digitatum*, em biorreator do tipo *closed gas loop*, no qual a aeração é realizada em um sistema fechado pressurizado, no qual o gás circulante está saturado com limoneno, em uma concentração não inibitória. A concentração de O_2 foi mantida ente 5% e 10% pela adição de oxigênio puro, com taxa de 0,05 vvm; a adição de limoneno foi realizada a cada 24 horas.

Com relação a um possível efeito inibitório do ácido perílico, Mirata e colaboradores (2009), estudando a bioconversão do limoneno por *Pseudomonas putida* DSM 12264, reportaram que o ácido perílico inibiu o crescimento e a atividade de biotransformação da bactéria em concentrações acima de 2,5 g/L e 0,3 g/L, respectivamente, Os autores desenvolveram um bioprocesso integrado para remoção e recuperação do produto *in situ* através da recirculação contínua do meio reacional em uma coluna com resina de troca aniônica em leito fluidizado, acoplada ao biorreator. Essa estratégia, aliada à alimentação de ar saturado com limoneno (para evitar a volatilização do substrato), resultou em uma concentração acumulada de ácido perílico de 31 g/L após 7 dias de processo, além de facilitar a etapa de separação do produto.

Os resultados de Mirata e colaboradores (2009) sugerem que a remoção do ácido perílico durante a bioconversão do limoneno por *Y. lipolytica* em biorreator com aeração superficial poderia aumentar ainda mais os rendimentos e a produtividade encontrados no presente trabalho.

5.5. Produção de ácido perílico a partir do óleo de óleo essência de laranja

5.5.1. Bioconversão do óleo de laranja em frascos agitados

Testes preliminares de produção de ácido perílico a partir do óleo essencial de laranja, contendo 89,1% de limoneno (perfil cromatográfico apresentado no anexo 3), foram conduzidos em frascos agitados. Para isto, foram utilizadas as condições padronizadas de obtenção de massa celular de *Y. lipolytica* e de bioconversão do limoneno, descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Com 48 horas de bioconversão, ocorreu um acúmulo de 822,8 ±71,3 mg/L de ácido perílico, correspondendo a 28,7% de rendimento molar. Estes valores são superiores aos observados para o uso de limoneno de grau analítico, podendo-se atribuir o aumento do rendimento a uma melhor dispersão do substrato, conforme observado visualmente. De fato, o óleo de laranja bruto apresenta uma grande variedade de componentes, como derivados oxidados de outros monoterpenos e sesquiterpenos (NEGRO et al., 2016; KRINGEL et al., 2017; GALVÃO et al., 2015) que, embora em quantidades mínimas, poderiam contribuir para aumentar a disponibilidade da molécula de limoneno para as células de levedura.

Por outro lado, alguns desses compostos, como por exemplo os aldeídos alifáticos (KUNJAPUR e PRATHER., 2015), poderiam inibir o processo de bioconversão microbiana. Entretanto, os resultados do presente trabalho indicam que a levedura *Y. lipolytica* não foi afetada pela presença de tais substâncias.

A literatura não reporta até o presente momento, estudos de bioconversão de óleo essencial de laranja para a produção de derivados perílicos. Entretanto, Marostica Junior e Pastore (2007) avaliaram a produção de *R*-(+)-α-terpineol por biotransformação deste resíduo agrícola utilizando os fungos filamentosos *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium oxysporum*. Esta última linhagem foi capaz de produzir 450 mg/L de (+)-α-terpineol a partir de aplicações a cada 24 h de 1 mL/L de substrato, em 72 h de processo.

5.5.2. Bioconversão do óleo de laranja em biorreator

Em seguida, foram realizados experimentos de bioconversão do óleo essencial de laranja em biorreator instrumentado. Para isto, as células de levedura (linhagem nativa) foram crescidas em meio otimizado (MO) nas condições descritas no item 4.9.1 e a etapa de bioconversão foi realizada empregando-se aeração de superfície, conforme descrito no item 4.9.3. Os resultados obtidos, apresentados na figura 10, mostram que, com 24 h de bioconversão, a concentração de ácido perílico foi de 675 mg/L, chegando a 806,4 mg/L com

48 h e 1061,7 mg/L com 96 h, correspondendo a rendimentos molares de 46,2%, 27,6% e 18,1%, respectivamente. Com exceção do ponto de 24 h, que apresentou valor 23% maior, os rendimentos molares foram semelhantes aos encontrados para a bioconversão do *R*-(+)-limoneno puro. O perfil da curva é bastante semelhante ao observado para o substrato de alto grau de pureza (figura 27).

Não foram encontrados dados na literatura sobre a bioconversão de óleo essencial de laranja por *Y. lipolytica* para produção de ácido perílico. Entretanto, Palmerín-Carreño e colabores (2016) estudaram o uso de *Y. lipolytica* para a bioconversão de (+)- valenceno, um composto minoritário do óleo essencial de laranja, em biorreator de particionamento em três fases para produção de (+)-nootcatona. As condições experimentais foram relativamente similares às do presente trabalho: agitação de 200 rpm, taxa de aeração de 0,5 vvm e temperatura de 30 °C. O maior rendimento de (+)-nootcatona foi de. 773 mg/L em 96 h de conversão.

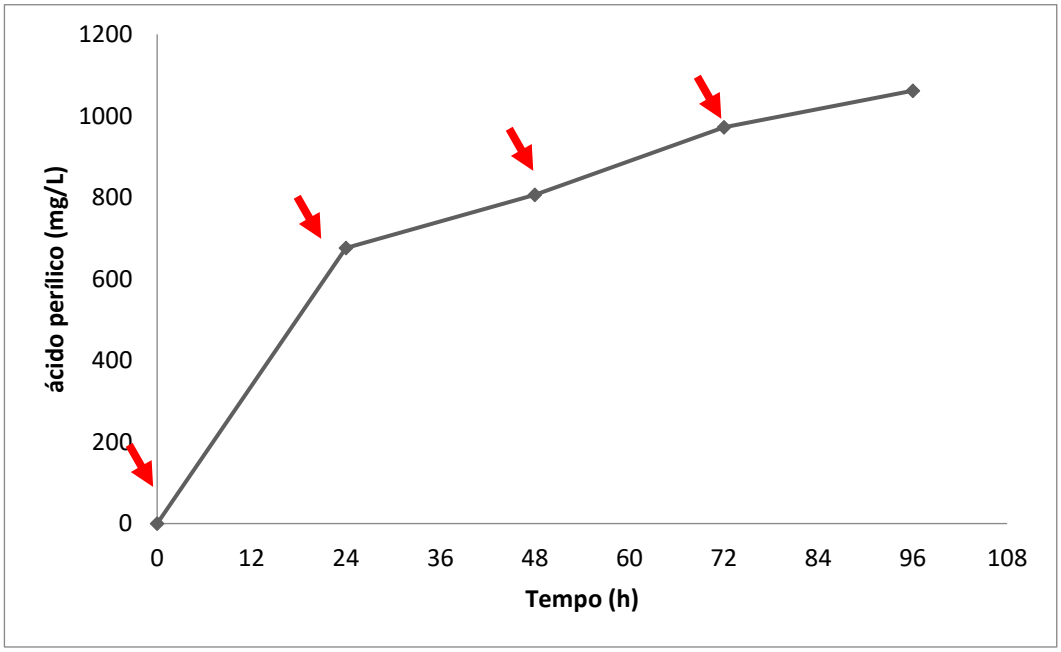


Figura 27. Bioconversão do óleo essencial em biorreator instrumentado com aeração de superfície. Condições operacionais: 20 g/L de massa celular, pH 7,0, 1% de saturação de oxigênio, pO2 de 1%, taxa de aeração de 0,5 vvm e com adição de 0,16% (v/v) de limoneno a cada 24 h (indicada pelas setas vermelhas).

Os resultados obtidos no presente trabalho são de grande relevância devido ao cenário recente, no qual matérias-primas industriais de baixo custo são particularmente interessantes para as indústrias de química fina (KRUHNE et al.,2014). O óleo essencial de laranja está

amplamente disponível devido à produção mundial de laranjas de 70 milhões de toneladas por ano (FAOSTAT, 2018). A indústria de laranja (28 milhões de toneladas / ano) por si só gera resíduos correspondentes a 50% da fruta processada, sendo que o óleo de laranja representa aproximadamente 5% (em base seca) (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Neste cenário, a grande disponibilidade de óleo essencial de laranja acoplada a um processo ambientalmente amigável, com base em uma levedura segura, para a produção de ácido perílico poderia ser explorada para estabelecer uma síntese econômica de moléculas valiosas do ponto de vista farmacêutico.

6. CONCLUSÕES

- Células de *Y. lipolytica* colhidas a partir do final da fase exponencial de crescimento até a fase estacionária podem ser empregadas para a bioconversão do limoneno sem alteração significativa na concentração de ácido perílico. O início da fase estacionária de crescimento seria o estágio indicado para colher as células de levedura, uma vez que nessa condição se alcançaria a maior concentração de biomassa celular.
- O uso do planejamento experimental para a otimização do meio de cultivo de produção de massa celular permitiu: (i) a diminuição do custo de produção da massa celular através da adequação da composição de nutrientes (redução da quantidade de peptona, extrato de levedura e extrato de malte ou até mesmo a eliminação deste último); (ii) o aumento da produtividade do processo de produção de massa celular; (iii) o aumento da produção da massa celular de 6-7 g/L para 12-13 g/L; (iv) a validação de modelos preditivos para produção de massa celular de *Y. lipolytica*.
- As bioconversões utilizando *Y. lipolytica* cultivada nos meios YMB, meio otimizado (MO) e meio otimizado sem extrato de malte (MOsM) não geraram diferenças estatisticamente significativas na concentração de ácido perílico nas condições utilizadas, indicando que os meios otimizados podem ser utilizados para obtenção de massa celular apta para a bioconversão.
- Não houve produção significativa de surfactantes durante a bioconversão do limoneno utilizando células crescidas nos meios YMB, MO e MOsM.
- O uso do planejamento estatístico DCCR para a otimização do rendimento molar de ácido perílico indicou que os maiores valores de rendimento (32,19%) foram obtidos na concentração mínima estudada de limoneno (0,16% v/v) e na máxima de massa celular (27,1 g/L). Não obstante, de acordo com o modelo experimental obtido no DCCR, iniciando-se o processo com concentrações baixas de limoneno, seguido de sua realimentação em tempos adequados, gera aumento no rendimento da bioconversão e a concentração de ácido perílico.
- A utilização de engenharia evolutiva permitiu obter, após 30 passagens, uma linhagem de *Y. lipolytica* capaz de ser cultivada em presença de limoneno (0,12% v/v). A linhagem adaptada produziu 902,6 mg/L de ácido perílico após 48 h, correspondendo a um aumento de 23,8% quando comparado à cepa nativa. Quando se utilizou a linhagem adaptada, desta vez induzida previamente com limoneno durante o seu crescimento,

foram produzidos 1308,7 mg/L de ácido perílico, correspondendo a um acréscimo de 79,5% em comparação com a cepa de origem.

- O período de estocagem afetou de forma pouco significativa a levedura *Y. lipolytica* adaptada ao limoneno (30ª passagem), visto que esta, quando induzida produziu 1052,5 m/L de ácido perílico, uma redução de apenas 19,6%, indicando que esta cepa pode ser utilizada com segurança em relação à estabilidade da produtividade em bioprocessos industriais.
- Fazendo-se uso do meio otimizado (MO) para cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L, foi possível obter 18,0 g/L de massa celular com 33 h de cultivo com uma alimentação, em 10 etapas, de MO concentrado.
- A modificação na forma de aeração no fermentador (alimentação do ar a partir do topo do vaso reacional, conhecida como aeração de superfície) durante a etapa de bioconversão resultou em um aumento expressivo na produção de ácido perílico em comparação com a aeração convencional (alimentação do ar a partir da base do reator, borbulhando-se o ar no meio de cultura), obtendo-se concentração de 839,9 mg/L (26,4% de rendimento molar) em 48 h, semelhante a encontrada em frascos agitados.
- As condições desenvolvidas para bioconversão do limoneno de alto grau de pureza e a estratégia de aeração superficial foram aplicadas ao óleo essencial de laranja, com sucesso, obtendo-se 806,4 mg/L de ácido perílico (27,56% de rendimento molar) em 48 h, mostrando a robustez da levedura *Y. lipolytica* em relação ao uso de um substrato industrial.

7. TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização do sistema enzimático envolvido na biotransformação do limoneno por *Y. lipolytica*,
- Otimização da biotransformação por engenharia metabólica;
- Estudos de genômica das células adaptadas ao limoneno;
- Aumento do rendimento e da produtividade do processo através da adaptação da levedura em processos de bioconversão com concentrações mais elevadas de limoneno e estudar o uso do reciclo de células.
- Estudos de cinética do processo de bioconversão utilizando concentrações de limoneno menores do que 0,16%, com realimentação do limoneno;
- Avaliação da inibição da levedura pelo ácido perílico e, caso positivo, remoção do produto durante a etapa de bioconversões visando aumentar os rendimentos e a produtividade do processo.

8. REFERÊNCIAS

ALI, S. S.; MEENU, J., BR, A. Vascular mimicry: the next big glioblastoma target. **Biochem Fisiol**.; 4:1-5, 2015.

Aliceweb - Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Web, Brasil. **Disponível em: http://aliceweb.mdic.gov.br/, acessado em agosto de 2015**, 2015.

ALONSO, F. O. M.; OLIVEIRA, E. B. L.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian J Chem Eng**. 22:1, 9-18, 2005.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I.; NETO, M. R.; NETO, P. F., MOURA, B. A.; DE MELO, C. T. DE ARAUJO, F. L.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, P. F.; DE VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Antinociceptive effect of the monoterpene *R*-(+)-limonene in mice. **Biol Pharm Bull**. 30:7, 1217-20, 2007.

AMARAL, P. F. F; da SILVA, J. M.; LEHOCKY, M.;, BARROS-TIMMONS, A. M. V.; Coelho, M. A. Z.;. MARRUCHO, I. M.; J. A. P. Coutinho; Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochem**. 41:8, 1894–1898, 2006.

ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVÁ, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cell Mol Life Sci**. 58(5-6):737-47, 2001.

AONO, R.; TSUKAGOSHI, N.; YAMAMOTO, M. involvement of outer membrane protein organic solvents tolerance of *E. coli* **J. Bacteriol.** 180, 4938-4955, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CÍTRICOS. http://www.abecitrus.com.br/, acessada em dez de 2016.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiol Rev Amsterdam**. 19:4, 219-237, 1997.

BASE DE DADOS AMERICANA COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics Database) http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_l1Code%3a34, acessado em fev de 2018.

BATHAIE SZ, TAMANOI F, organizadores. **Natural Products and cancer signaling: isoprenoids, polyphenols and flavonoids**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press; 2014. p 7-32.

BAUER, B.-E.; WOLFGER, H.; KUCHLER K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. **Biochim**. **Biophys**. Acta 1461, 217 – 236. 1999.

BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. **Food Flavour Technology**. ed. aylor A.J. cap. 3, 2002.

BERNHARDT R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **J Biotechnol**. 124:128–145**,** 2006.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v.124, p.128-145, 2006.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE C. M. Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives. **Quím. Nova** vol.32 no.3, 2009.

BOIK, J. Natural Compounds in Cancer Therapy, 1st ed., Princeton, **Oregon Medical Press LLC**, 2001.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. **John Wiley**, 1978.

BRAUN, A.; GEIER, M.; BÜHLER, B; SCHMID, A.; MAUERSBERGER, S.; GLIEDER, A. STEROID. Biotransformations in biphasic systems with Yarrowia lipolytica expressing human liver cytochrome P450 genes. **Microb Cell Fact**. 11:106, 2012.

BRENNAN, T. C. R.; KRÖMER, J. O.; NIELSEN, L. K. Physiological and Transcriptional Responses of Saccharomyces cerevisiae to d-Limonene Show Changes to the Cell Wall but Not to the Plasma Membrane. **Appl Environ Microbiol**. 79(12): 3590–3600, 2013.

BUBBICO, R.; LO PRESTI, S.; BRAVI, M.; MORESI, M.; SPINOSI, M. Repeated batch citrate production by *Yarrowia lipolytica* using yeast recycling by cross-flow microfiltration. **Agro-Food Industry Hi-Tech**, 1996, vol. 7, no. 2, p. 35-38, 1997.

CADWALLADER, K. R.; BRADDOCK, R. J.; PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Bioconversion of (+)-Limonene by *Pseudomonas gladioli* **J. Food Sci**., 54, 1241, 1989.

CALADO, D.C.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de Experimentos usando Statistica. **E-Papers Editora Serviços Editoriais**, 2003.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of Terpenes, **Biotechnology Advances**. 24, 134-142, 2006.

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. G. Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. **J Biosci Bioeng**. 88:5, 488-494, 1999.

CHANDA, S.; CHAKRABARTI, S. Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. **Bioresour**. **Technol**. 57, 51–54,1996.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K.; Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida.* **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 2001, 55, 541, 2001.

CHAUDHARY, S. C., ALAM, M.S., SIDDIQUI, M.S., ATHAR, M. Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis. **Chem Biol Interact**. 179:145-53, 2009

CHEN, W.; LEE, M.; JEFCOATE, C.; KIM, S.; CHEN, F.; YU, J. Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. **Genome Biol Evol**. Jul; 6(7): 1620–1634, 2014.

CHOW, H. H. S.; SALAZAR, D.; HAKIM, I. A. Pharmacokinetics of Perillic Acid in Humans after a Single Dose Administration of a Citrus Preparation Rich in d-Limonene Content. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 11, 1472–1476. 2002.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica***, Appl. Environ. Microbiol**., 48 (4), 747-750, 1984.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. **Curr Topics Res, Technol and Edu Topics in Applied Microbiol and Microbial Biotech**. 930–944, 2010.

CROTEAU, R. Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenoids. **Chemical Reviews**. U.S.A., v.87, n.5 p.929-954, 1987.
TYLER, V. E.; ROBBERS, J. E. SPEEDIE, M.K. **Pharmacognsy and pharmacobiotecnology**. William e Wilkins, USA, 1996.

CULL, S. G, HOLBREY, J.D.; VARGAS-MORA, V., SEDDON, K.R., LYE, G.J. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. **Biotechnology and Bioengineering**. 69(2):227-33, 2000.

Da FONSECA, C. O.; FISCHER, J. S. G.; MASINI, M. M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R.; QUIRICO-SANTOS. T. Oligodendrogliomas: a genética molecular e o desenvolvimento de estratégia terapêutica adjuvante. **Arq Bras Neurocir**. 26:1, 8-15, 2007.

Da FONSECA, C. O.; LANDEIRO, J. A.; CLARK, S. S.; QUIRICO-SANTOS, T.; CARVALHO, M. G. C.; GATTASS, C. R. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. **Surg Neurol.** 65, 2–9, 2006a.

Da FONSECA, C. O.; MASINI, M. M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R. AND QUIRICO-SANTOS, T. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. **Surg Neurol**. 66, 611- 615. 2006b.

Da FONSECA, C. O.; QUÍRICO-SANTOS, T. F., J.; M.; CARVALHO G. C. C.; GATAS, C. R. Biologia molecular dos glioblastomas: perspectivas terapêuticas do monoterpeno álcool perílico. **J. Bras. Neurocirurg.,** 14(2), 46-54, 2003.

De María, P. D.; Maugeri, Z. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. **Curr Opin Chem Biol.** 15:2, 220-225, 2011.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N.; **J. Mol. Catal. B: Enzym**. 2001, 11, 265.

DENISOV, G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G.; SCHLICHTING I. Structure and chemistry of cytochrome P450. **Chem. Rev**. 105, 2253–2278, 2005.

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

DHAVALIKAR, R. S.; BHATTACHARYYA, P. P. K. Microbiological transformations of terpenes. IX. Pathways of degradation of limonene in a soil pseudomonad. **Indian J Biochem** Sep;3(3):158-64.1966.

DUETZ, W. A.; BOUWMEESTER, H.; VAN BEILEN, J. B.; WITHOLT, B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Appl Microbiol Biotechnol.** 61, 269-277, 2003.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVE´GLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; AIGLE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J.M.; BEYNE, E.; BLEYKASTEN, C.; BOISRAME, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIOLERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY-DUMAZET, H.; GROPPI, A.; HANTRAYE, F.; HENNEQUIN, R.; JAUNIAUX, N.; JOYET, P.; KACHOURI, R.; KERREST, A., KOSZUL; R., LEMAIRE, M.; LESUR, I.; MA, L., MULLER, H., NICAUD; J.M., NIKOLSKI, M.; OZTAS, S.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; PELLENZ, S.; POTIER, S.; RICHARD, G.F.; STRAUB, M.L.; SULEAU, A.; SWENNEN, D.; TEKAIA, F.; WESOLOWSKI-LOUVEL, M.; WESTHOF, E.; WIRTH, B.; ZENIOU-MEYER, M.; ZIVANOVIC, I.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; THIERRY, A.; BOUCHIER, C.; CAUDRON, B.; SCARPELLI, C.; GAILLARDIN, C.; WEISSENBACH, J.; WINCKER, P; SOUCIET, J. L. "Genome evolution in yeasts", **Nature**, v. 430, p. 35–44. 2004.

DUNLOP, M. J.; DOSSANI, Z. Y.; SZMIDT, H. L.; CHU, H. C.; LEE, T. S.; KEASLING, J. D. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. **Mol. Syst. Biol.** 7, 487–493, 2011.

ERICKSON, L. E.; NAKAHARA, T.; PROKOP, A. Growth in cultures with 2 liquid-phases – hydrocarbon uptake and transport, **Process Biochem**., v.10 (5), 9, 1975.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Home Page**. http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E. Acessado em 20 de fev. de 2018.

FARKAS, J., MOHÁCSI-FARKAS, C. In: MOTAJERMI, Y. (ed). 1° Ed. **Safety of foods and beverages: spices and seasonings. Encyclopedia of Food Safety**. Volume 3: Foods, Materials, Technologies and Risks. Elsevier, p. 324-330, 2014.

FELIPE, L.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais**. Quím. nova esc** v. 39, nº 2, 2016.

FERNANDES, J., DA FONSECA, C.O., TEIXEIRA, A., GATTASS, C.R. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. **Oncol Rep**. 2005; 13: 943-7, 2005.

FERRARA M. A.; LACERDA P. S. B.; FREITAS A., BON E. P. S. Microbial bioconversion for pharmaceuticals and chiral intermediates. **Curr Topics Biotechnol.** 3, 57-65, 2007.

FERRARA, M. A.; ALMEIDA, D. S.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI L.; LACERDA, P.S.; FREITAS, A., Tappin, M. R.; Bon, E.P. Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica***. Braz J Microbiol**. 44:4, 1075-80, 2013.

FERRARA, M. A.; SIANI, A. C.; BON, E. P. da S. **Processos de bioconversão aplicados à obtenção de fármacos e intermediários**. In: Rodrigo Ribeiro Resende. (Org.). Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. 1ed. São Paulo: Editora Blucher, v. 4, p. 137-172, 2017.

FERREIRA-LEITAO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A., NEPOMUCENO, A. L; MOLINARI, H. B. C.;BON, E.P.S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valorization**, 1, 65-76, 2010.

FICKERS, P; FUDALEJ, F.; JEAN-MARC NICAUD, J. M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*, **Journal of Biotechnology**, 115(4), pp. 379–386, 2005.

FLORES, C. L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiol. Rev. Amsterdam**. 24:4, 507-529, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin**. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf, acessado em 02/02/2018.

GALVAGNO, M. A.; IANNONE1, L. J.; BIANCHI1, J.; KRONBERG, F.; Rost, E.; CARSTENS, M. R.; CERRUTTI, P. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. **Rev Argent Microbiol.** 43:3, 2011.

GALVAO J. G.; SILVA, V. F.; FERREIRA, S. G.; FRANÇA, F.R. M.; SANTOS, D. A.; FREITAS, L. S.; ALVES, P. B.; ARAUJO, A. A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R.

S., β-cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae, **Thermochimica Acta**, (608), 14-19, 2015.

GELB, H. B.; TAMONOI, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASCHI, F.; ESSEN, K.; GOULD, M. N. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol, **Cancer let,** v. 91, Issue 2, 8 May 1995, Pages 169-175, 1995.

GIRVAN, H. M.; MUNRO, A. W Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. **Curr Opin Chem Biol.** 31:136-45, 2016.

GIRVAN, H. M; MUNRO, A. W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, 31:136-45, 2016.

GOMES, N.; AGUEDO, M.; TEIXEIRA, J.; BELO, I. Oxygen Mass Transfer in a Biphasic Medium: Influence on the Biotransformation of Methyl Ricinoleate Into γ-Decalactone by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemical Engineering Journal,** 35(3):380-386, 2007.

GRAMSTRÖM, T.; ARISTIDOU, A. A.; LEISOLA, M. Metabolic Flux Analysis of *Candida tropicalis* Growing on Xylose in an Oxygen-Limited Chemostat. **Metabolic Engineering**, 4:3, 248-256, 2002.

GRESHAM, D. HONG, J. The functional basis of adaptive evolution in chemostats. **FEMS Microbiol Rev**. 39(1):2-16, 2015.

GUTIERREZ, J. R.; ERICKSON, L. E. Hydrocarbon Uptake in Hydrocarbon Fermentations, **Biotechnol. Bioeng**., 19, 1331-1349, 1977.

HAAG, J.D., GOULD, M.N. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. **Cancer Chemother Pharmacol**. 1994; 34: 477-483, 1994.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, Appl. **Environ. Microbiol**., v. 41(1), 173-178, 1981.

HANSON, J.R. Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Products Reports**. v. 30, n° 10, p. 1346-1356, 2013.

HELLGREN, J. **Adaptive evolution of *Yarrowia lipolytica* for osmotic and saline tolerance. Improving tolerance towards osmotic and saline stress for sustainable production of biodiesel**. Gotenburgo, Suécia. Dissertação (Mestrado em de mestrado em Biotecnologia), Department of Biology and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, 2017.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Curr Opin Chem Biol**. 9:2,174-80, 2005.

ISMAIL, S. A. S.; DEAK, T.; EL-RAHMAN, H. A. ABD.; YASSIEN, M. A. M. e BEUCHAT, L. R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. International Journal of Food Microbiology, 64(28), 13-19, 2001.

JANSEN, M. L.; DIDERICH, J. A.; MASHEGO, M.; HASSANE, A.; de WINDE, J. H.; DARAN-LAPUJADE P.; Prolonged selection in aerobic, glucose-limited chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae causes a partial loss of glycolytic capacity. **Microbiology**. 151(Pt 5):1657-69, 2005.

JONES, C. W.; POOLE, R. K. The analysis of cytochrome P-450. **Methods in microbiology**, v.18, p.285-328, 1985.

JUSZCZYK, P.; TOMASZEWSKA, L.; a, KITA, A.; Rymowicz, W. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource Technology** 137:124–131, 2013.

KAMZOLOVA S. V.; DEDYUKHINA, E. G.; SAMOILENKO, V.A.; LUNINA, J. N.; PUNTUS, I. F.; ALLAYAROV, R. L.; CHIGLINTSEVA, M. N.; MIRONOV, A. A.; MORGUNOV, I. G. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**.; 97(20):9133-44, 2013.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. **Bioresour Technol**. 243:433-440, 2017.

KAMZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V; MORGUNOV, I. G.; FINOGENOVA, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica.* **FEMS Yeast Res**. 3(2):217-22, 2003.

KAWASAKI, K.; KOKAI T. K. perfume composition for oral cavity and oral cavity composition containing the same, japão JP, **JP2004018431**, 2004.

KELLY D. E.; KRASEVEC N.; MULLINS J; NELSON, D. R. The CYPome (cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol. 2009;46:S53–S6, 2009.

KIEBOOM, J.; DENNIS, J. J.; ZYLSTRA, G. J.; de BONT, J. A. M. Active efflux of organic solvents in *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. **J Bacteriol**, 180:6769–6772, 1998.

KIM, B. S; HOU, C. T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*, **Bioprocess Biosyst**. **Eng**., 29, 59-64, 2006.

KITAOKA, N., Lu, X., YANG, B., PETERS, R. J. The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. **Molecular Plant**. v. 8, n° 1, p. 6-16, 2015.

KRAIDMAN, G.; MUKHERJEE, B. B.; Hill, I. D**.; Bacteriol. Proc**. 69, 63, 1969.

KREGER-VAN-RIJ, N.J.W. (1984) **The Yeasts: a taxonomic study**. 3rd edn Amsterdam: Elsevier, 1984.

KRINGEL, D. H.; ANTUNES, M. D.; KLEIN, B. CRIZEL, L. R.; WAGNER, R.; OLIVEIRA, R. P.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE., E. R. Production, Characterization, and Stability of Orange or Eucalyptus Essential Oil/β-Cyclodextrin Inclusion Complex. J Food Sci 82 (11), 2598-2605, 2017.

KRIVORUCHKO, A., NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 35, p. 7-15, 2015.

KRUHNE, U.; HEINTZ, S.; RINGBORG, R.; ROSINHA, I. P.; TUFVESSON, P., GERNAEY, K.V.; WOODLEY, J.M. Biocatalytic Process Development Using Microfluidic Miniaturized Systems. Green Processing and Synthesis, 3, 23-31, 2014.

KUNJAPUR, A. M.; PRATHER, K. L. J. Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis. **Appl Environ Microbiol**. 81(6): 1892–1901, 2015.

KURTZMAN C.P., FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**, 5th edn. Elsevier, Amsterdam, 2011.

KUYPER, M.; HARTOG, M. M. P; TOIRKENS, M. J.; ALMERING. M. J. H; WINKER, A. A.; van DIJKEN, J. P. Metabolic engineering of xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Res**. 5, 399-409, 2005.

LAH, L.; KRAŠEVEC, N.; TRONTEJ, P.; R., KOMEL, R. High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. **Fungal Genet Biol**. 45(4):446-58, 2008.

LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochem Eng J**. 19, 25–31, 2004.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Industrial Biotransformations. Second, Completely revised and Extended Edition – **Wiley-VCH**, 2006.

LIU, L.; PAN, A.; SPOFFORD, C.; ZHOU, N.; ALPER, H. S. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**. 29:36–45. 2015.

LOUTRARI, H. et al. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. **J Pharmacol Exp**.; 311: 568-75, 2004

MACHADO JUNIOR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **Int Food Res J**. 22:3, 1253-1260, 2015.

MAROSTICA JR, M. R. E PASTORE, G. M. Biotransformation of limonene: a review of the main metabolic pathways. **Quím. Nova** vol.30 no.2, 2007.

MARS, A. E., GORISSEN, J. P. L., van DER BELD, I., EGGINK, G., Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pesudomonas putida* GSI in a fed-bach reactor. **Appl Microbiol Biotechnol**. 56, 101-107, 2001.

MCMURRY, J.; **Química Orgânica**, 7ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2011.

MIRATA, M. A.; HEERD, D.; SCHRADER, J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. **Process Biochem**. 44, 764–771. 2009.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G.; PERDUE, E.M.; ARAUJO, R. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 6, p. 831-838, 1996.

MOELLER, L.; STREHLITZ, B.; AURICH, A., ZEHNSDORF; A., BLEY, T. Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. **Eng Life Sci.** 7:5, 504–511, 2007.

MONCADA, J.; TAMAYO, J. A.; CARDONA, C. A. Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Citronella (*Cymbopogon winteriana*) and Lemongrass (*Cymbopogon citrus*): A Colombian case to evaluate different extraction technologies. **Industrial Crops and Products** Volume 54, Pages 175-184, 2014.

MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V. LUNINA, J. N. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. **Appl Microbiol Biotechnol**. 97(16):7387-97, 2013.

MULLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P.; DALBOGE, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*, Yeast, 14, 1267-1283, 1998.

MUNHOZ, S. R.; MORABITO, R. Otimização no Planejamento Agregado de Produção em Indústrias de Processamento de Suco Concentrado Congelado de Laranja. **Gestão & Produção** 17(3), 2010.

NEGRO, V.; MANCINI, G.; Ruggeri, B.; FINO, D. Citrus Waste as Feedstock for Bio-Based Products Recovery: Review on Limonene Case Study and Energy Valorization. **Bioresource Technology**, 214, 806-815, 2016.

NICAUD, J-M., FABRE, E. e GAILLARDIN, C.. "Expression of invertase activity in Yarrowia lipolytica and its use as a selective marker", Curr. Genet., v.16, p.253-260, 2002.

NONINO, E. A. Where is the citrus industry going? **Perf. Flav.**, 22(2):53, 1997.

OMURA T.; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. **J. Biol. Chem**. 237, 1375–1376, 1962.

ONKEN, J.; BERGER, R. G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus* **J. Biotechnol**, 69:163, 1999.

ORTIZ de MONTELLANO, P. R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. **Chem rev**. 110, 932-948, 2010.

ORTIZ de MONTELLANO, P. R. **Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry**. 3rd ed. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Press; 2005. pp. 377–531, 2005.

PALMERÍN-CARREÑO, D. M.; RUTIAGA-QUIÑONES, O. M.; VERDE-CALVO, J. R.; PRADO-BARRAGÁN, A.; HUERTA-OCHOA, S. Whole Cell Bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone in 100 % Organic Phase using *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, V. 29, 5, 36-45, 2016.

PALMQVIST, E. A.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology** 74(1):25-33, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biom Bioeng**. 32, 60-71, 2008.

PAPANIKOLAU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; GEORGE AGGELIS, MARC, I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. **Journal of General and Molecular Microbiology** 80, 215–224, 2001.

PARK, J; LEE, S.; CHOI, J.; AHN, K.; PARK, B.; PARK, J.; KANG, S.; LEE, Y. H. Fungal cytochrome P450 database. **BMC Genomics**. 2008; 9:40, 2008.

PARSHIKOV, I. A. **Microbial conversions of terpenoids**. Publisher: Editus, 2015.

PESCHECK, M.; · MIRATA, M. A. BRAUER, B.; KRINGS, U.; BERGER, R. G.; SCHRADER, J. Improved monoterpene biotransformation with Penicillium sp. by use of a closed gas loop bioreactor. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 36(6):827–836, 2009.

PIRES, T. C. M.; RIBEIRO, M.T.C.; MACHADO A. S. C. Extração do r-(+)-limoneno a partir das cascas de laranja: avaliação e otimização da verdura dos processos de extração tradicionais. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 3, 355-365, 2018.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika London**. 33, 305-325. 1946.

REYES, L. H.; GOMEZ, J. M.; KAO, K. C. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. **Metab Eng.** 21, 26-33, 2014.

RYWIŃSKA, A.; MUSIAŁ I., RYMOWICZ, W.; ŻAROWSKA, B.; BORUCZKOWSKI, T. effect of agitation and aeration on the citric acid production by *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. Pages 279-291, 2013.

RYWIŃSKA, A.; RYMOVICZ, W. Continuous production of citric acid from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* in cell recycle cultivation. **Chemical Papers**. 65 (2) 119–123, 2011.

BATHAIE, S.; TAMANOI, F., In book: **Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids**, Chapter: Two, Publisher: Elsevier, 2014.

SAKAKI, T.; INOUYE, K. Practical application of mammalian cytochrome P450. **J Biosci Bioeng.** 90:583–590, 2000.

SANCHEZ S, DEMAIN AL. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research and Development**. 2011;15(1):224-30.

SAUER, U. **Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes In: Nielsen J. et al. (eds) Metabolic Engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, vol 73. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001.

SAWAMURA, M. **Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance**. John Wiley and Sons, 2010.

SELISKAR, M.; ROZMAN, D. Mammalian cytochromes p450 –importance of tissue specificity**. Biochimica at Biophysica Acta**, v.1770, p.458-466, 2007.

SHOJAOSADATI, S. A.; KHALILZADEH, R.; JALILZADEH, A.; SANAEI, H. R. Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. **Resour**. **Conserv**. **Recycl**. 27, 125–138, 1999.

SILVA, J. C. T. S. **Correlação da localização topográfica e do edema peritumoral em pacientes com glioma recidivo com a resposta terapêutica ao álcool perílico**, Rio de

Janeiro, Faculdade De Medicina Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas Universidade Federal Fluminense, Dissertação de mestrado**,** 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SONDEREGGER, M.; e SAUER, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. **Appl Environ Microbiol** 69(4):1990-8, 2003.

SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Braz J Chem Eng**. 29:1, 2012.

STRAATHOF, A. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Curr Opin Biotechnol**.13:6, 548-56, 2002.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. **Folia Microbiologica** 44(1):19-24, 1999.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANIM. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresour Technol**. 110:488-95, 2012.

Tan, Q.; Day, D. F. Bioconversion of limonene to α-terpineol by immobilized Penicillium digitatum **Appl. Microbiol. Biotechnol**., 49, 96, 1998.

TAPPIN, M. R. R.; KNOPP, F. M.; CARDOSO, I. C.; SANTOS, R. T.; DRUMMOND, B. S.; SIANI, A. C.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Synthesis of the Prospective Anticancer Molecule Perillic Acid from Orange Essential Oil by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Green and Sustainable Chemistry*, 7, 172-184, 2017.

TEITEN, M. H.; GAASCHT F.; DICATO, M., Targeting the wing-less signaling pathway with natural compounds as chemopre-ventive or chemotherapeutic agents. **Curr Pharm Biotechnol**, 13:245–254, 2012.

Van BEILEN, J. B.; HOLTACKERS, R.; LÜSCHER, D.; BAUER, U.; WITHOLT B; DUETZ, W. A. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel Mycobacterium sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida.* **Appl Environ Microbiol**. 71, 1737–1744, 2005.

Van RANTWIJK F.; MADEIRA, L. R., SHELDON, R. A. Biocatalytic transformations in ionic liquids. **Trends in Biotechnology**. 21(3):131-8, 2003.

VAN RENSBURG E.; MOLEKELI, N; VAN DER WALT, J. P.; BOTES P. J.; VAN DYK, M. S. Biotransformation of (+) limonene and (−) piperitone by yeasts and yeast-like fungi. **Biotechnol Lett**. 19, 779–782, 1997.

WESTMAN, J. O.; FRANZÉN, J. C. Current progress in high cell density yeast bioprocesses for bioethanol production**. Biotechnol. J**. 10, 1185–119, 2015.

WISSELINK, H. W.; TOIRKENS, M. J.; BERRIEL, M. D. F.; WINKLER, A. A.; van DIJKEN J. P.; PRONK, J. T.; van MARIS, A.J. A. Engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. **Appl Environ Microbiol** 73: 4881–4891, 2007.

WISSELINK, H. W.; TOIRKENS, M. J.; Wu, Q.; PRONK, J. T; van MARIS, A. J. A. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose and arabinose mixture by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl Environ Microbiol.** 75, 907-14, 2009.

WORKMAN, M.; Holt, P.; THYKAER, J. Comparing cellular performance *of Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. **AMB Express**. 3:58, 2013.

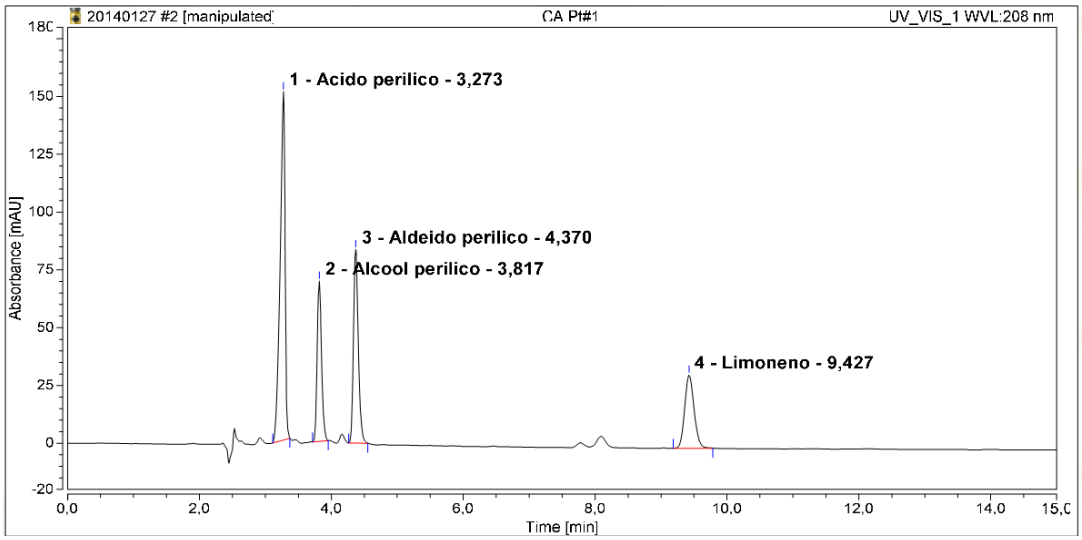
WU, L.; GE, G.; WAN, J. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. **J Environ Sci (China).** 21(2):237-42, 2009.

XU, M.; FLOYD, H. S.; GRETH, S. M.; CHANG, W. C. L.; LOHMAN, K.; STOYANOVA, R.; KUCERA, G. L.; KUTE, T. E.; WILLINGHAM, M. C.; MILLER, M. S. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicol Appl Pharmacol**. 195, 232– 246, 2004.

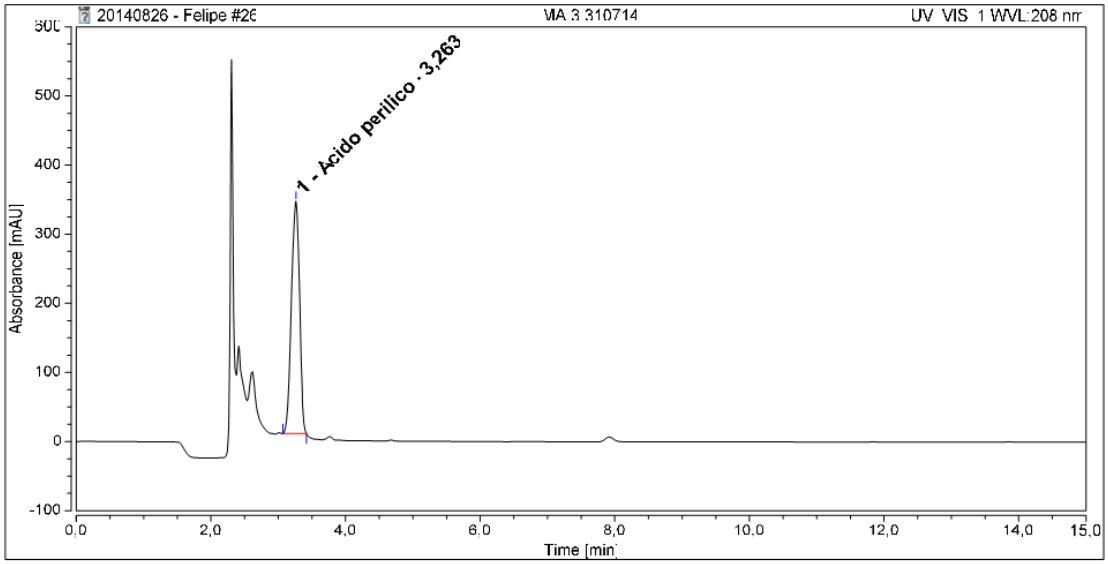
YERUVA, L.; PIERRE, K. J., ELEGBEDE, A., WANG, R. C.; CARPER, S. W. Carper. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, Vol. 257, Issue 2, p216–226, 2007.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** Vol. 6, Issue 2, 2002.

Anexos



Anexo 1. Perfil cromatográfico de CLAE do limoneno e seus derivados perílicos: ácido perílico, aldeído perílico e aldeído perílico utilizando fase móvel acetonitrila água (90:10) com detecção a 208 nm.



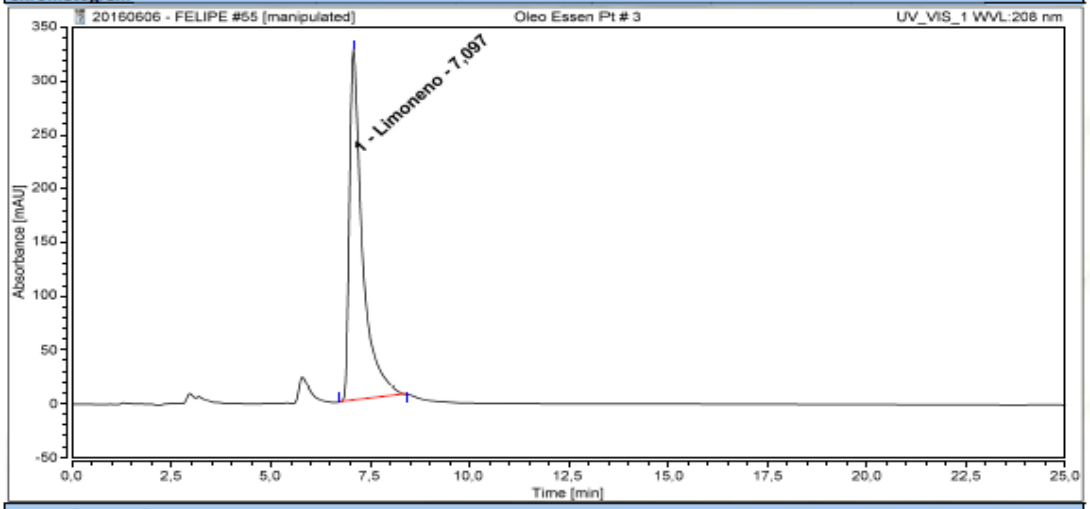
Anexo 2. Perfil cromatográfico de CLAE típico de uma amostra de 48 horas de bioconversão do limoneno utilizando fase móvel acetonitrila água (90:10) com detecção a 208 nm.

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	Oleo Essen Pt # 3	*Run Time (min):*	25,00
Vial Number:	RC4	*Injection Volume:*	10,00
Injection Type:	Unknown	*Channel:*	UV_VIS_1
Calibration Level:		*Wavelength:*	208,0
Instrument Method:	terpenos agua acn 25	*Bandwidth:*	4
Processing Method:	Terpenos C-18	*Dilution Factor:*	1,0000
Injection Date/Time:	08/jun/16 16:29	*Sample Weight:*	1,0000
Curva Analitica	CA 03 Bioconv		

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount (ppm)
n.a.	Acido perilico	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	Álcool perílico	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1	Limoneno	7,097	123,141	326,169	100,00	100,00	959,8337
Total:			**123,141**	**326,169**	**100,00**	**100,00**	

LDQ:	Limite de quantificação
LDD:	Limite de detecção
n.a.:	Não detectado

Peak Name	R2	LDQ (ppm)	LDD (ppm)
Acido perilico	0,99839	29,55	9,75
Alcool Perílico	0,99555	61,2358	20,2078

Anexo 3. Perfil cromatográfico de CLAE, típico de uma amostra de óleo essencial de laranja utilizando fase móvel acetonitrila água (90:10) com detecção a 208 nm.