



(21) BR 102014029813-4 A2

(22) Data do Depósito: 28/11/2014

(43) Data da Publicação: 31/05/2016



* B R 1 0 2 0 1 4 0 2 9 8 1 3 A

(54) **Título:** BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA

(51) **Int. Cl.:** C12P 5/00; C12R 1/645

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) **Inventor(es):** CARLOS RICARDO SOCCOL, ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS, MÁRIO CESAR JUCOSKI BIER

(57) **Resumo:** BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA A presente invenção trata de um processo para a produção de derivados de limoneno por fermentação sólida e líquida a partir do biotransformação resultando em limoneno-1,2-diol, carvono, (-)-mentol e o-terpineol. O processo envolve a elaboração de meios naturais para fermentação e produção do inóculo. O bioprocessamento tecnológico é alternativo para a obtenção de aromas e flavors naturais derivados de limoneno, uma vez que todo o processo é verde e não gera resíduos tóxicos, possui baixo custo devido à utilização de resíduos e subprodutos baratos. Outra vantagem do processo é a não dependência de fontes naturais selvagens ou escassas como a extração vegetal. O processo utiliza microrganismos isolados do meio ambiente, e produtos e subprodutos que contêm terpenos como os do processamento de laranja e cítricos, para a realização da fermentação em estado sólido e submerso, além de outros materiais-primos tais como vegetais, cascas, farelos, sementes e resíduos líquidos de distintas naturezas, como fontes de terpenos.



BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR *DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de um processo para produção de derivados do limoneno utilizando o fungo *Diaporthe sp (Phomopsis)* e suas espécies e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Os processos de produção de derivados de limoneno por fermentação sólida e submersa utilizam meios naturais ricos em terpenos como os produtos, subprodutos e resíduos da agroindústria de processamento de laranja e frutos cítricos; incluem-se outras matérias-primas tais como vegetais, cascas, farelos, sementes e matérias-primas e resíduos líquidos de qualquer natureza contendo fontes de terpenos. A presente invenção inclui o preparo do inóculo utilizado e o preparo dos meios para a fermentação.

[002]. A presente invenção também contemplará a aplicação dos compostos produzidos nas seguintes situações:

- Aromas para alimentos processados;
- Produtos com propriedades bioativas.
- Redução de toxicidade dos terpenos presentes em materiais utilizados como substratos da fermentação;

[003]. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação no estado sólido (FES) e fermentação líquida (submersa) para produção de compostos derivados de terpenos por linhagens de *Diaporthe sp* e *R. mucilaginosa*. O processo de produção por FES é uma alternativa para a obtenção de bioaromas a partir de materiais naturais ricos em terpenos em comparação aos produtos obtidos por extração com solventes ou sintetizados

quimicamente. A maioria absoluta dos trabalhos envolvendo a biotransformação de limoneno e terpenos faz utilização de compostos puros padrões como o R-(+)-limoneno como substrato de fermentação. Ao passo que algumas, utilizam substratos sintéticos com adição de óleo essencial de laranja, o qual é rico em limoneno. A grande maioria dos trabalhos, também utiliza cepas de origem conhecida e utilizadas em trabalhos envolvendo aromas, enquanto que, no Brasil, há uma biodiversidade enorme de microorganismos com possibilidades para utilização nas mais diferentes áreas sendo que apenas uma pequena parte destes microorganismos já foi pesquisada.

[004]. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo fermentativo em que meios naturais, baratos e sem a utilização de produtos sintéticos, são utilizados como fontes de terpenos – principalmente o limoneno - na obtenção de derivados de interesse comercial a partir de microorganismos isolados. Os substratos utilizados são ricos em terpenos e são excedentes do processamento de cítricos. Estes, muitas vezes acabam se tornando resíduos. O limoneno-1,2-diol é um dos compostos obtidos como resultado do presente processo descrito nesta invenção e apresentou-se em uma concentração bastante elevada, além de outros compostos como mentol e alfa-terpineol.

Histórico da Invenção

[005]. Hoje, centenas de diferentes substâncias são produzidas com a ajuda de microorganismos. Várias espécies de leveduras, fungos, bactérias e actinomicetos são utilizadas em processos de fabricação. A fermentação, como uma técnica para produção biotecnológica de aromas e fragrâncias naturais têm grandes perspectivas de aplicação na alimentação humana e animal, cosméticos, produtos químicos e

farmacêuticos. Ela é responsável por mais de um quarto do mercado mundial de aditivos alimentares (LONGO; SANRÓMAN, 2006).

[006]. Desde o começo dos tempos, aromas e "flavors" possuem importante papel na vida do homem. Até o século 20, muitos "flavors" naturais eram obtidos de animais e plantas superiores. Porém as fontes destes materiais reduziram-se devido a aspectos sociais, econômicos, políticos, conservacionistas, de proteção da vida selvagem e de crescimento industrial (SCHARPF et al., 1986).

[007]. A demanda mundial de aromas e fragrâncias - incluindo misturas de sabores, misturas de fragrâncias, óleos essenciais, produtos químicos e aroma - vai subir 4,4 por cento ao ano até 2016, chegando a 26,5 bilhões dólares americanos. O crescente interesse global em produtos que promovem benefícios à saúde irá impulsionar a demanda em gêneros alimentícios e bebidas, cosméticos e produtos de higiene, sabores e fragrâncias são empregados em conjunto com antioxidantes e vitaminas para reduzir gostos e odores indesejáveis. Além disso, os esforços dos países desenvolvidos de reduzir as calorias, sal e gordura nos alimentos vão incrementar a procura de flavors e aromas para melhorar o sabor desses produtos (THE FREEDONIA GROUP, 2012).

[008]. Devido a seu valor no mercado mundial, o interesse sobre os componentes de aroma direciona a atenção das indústrias em busca de produtividade e qualidade de voláteis produzidos (SANTOS, SERAFINI e CASSEL, 2003). Lactonas, cetonas, vanilina, benzaldeído, álcoois, ésteres, terpenos e outros compostos podem ser produzidos por vários microorganismos (FERON; BONNARME; DURAND, 1996).

[009]. Em adição a características sensoriais, os compostos de aroma possuem outras características desejáveis como atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, atividade antioxidante, efeito

reductor de gordura, reguladores da pressão arterial e propriedades anti-inflamatórias (BERGER, 2009).

Limoneno

[010]. O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, um monoterpreno monocíclico está presente na estrutura de mais de 300 vegetais (BURDOCK 1995). Podem-se citar alguns de seus derivados mais notáveis como os compostos oxigenados α -terpineol, álcool perílico, carveol, carvona e mentol. Mentol e carvona são compostos de aroma extensivamente utilizados, sendo que o álcool perílico vem ganhando destaque crescente devido às comprovações relacionadas a seu poder de prevenção de doenças degenerativas (MARÓSTICA JÚNIOR, 2006). Frutas cítricas possuem elevadas concentrações de limoneno (ARCE et al., 2007; DIAZ, ESPINOSA e BRIGNOLE; 2004; YADAVA et al., 2004; STEINBRECHER et al., 1999), por conseguinte, seus resíduos podem ser de grande interesse.

[011]. No caso dos óleos essenciais dos cítricos em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente mais expressivo, atingindo concentrações de 90 a 96%. Aproximadamente 50 mil toneladas de R-(+)-limoneno são recuperadas ao ano como subproduto da indústria cítrica mundial. O limoneno é geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência à autoxidação e polimerização, e formação de "off-flavors", tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial (BERGER; KRINGS, 2002).

[012]. Para que o óleo essencial de laranja, que é altamente rico em limoneno, possa ser obtido é necessário que este seja separado. A partir do momento em que este óleo é extraído na indústria ele obtém valor comercial e passa a ter potencial para comercialização,

deixando, para muitas indústrias, de ser um resíduo e assim torná-se um subproduto. Entretanto, há ainda indústrias e pequenas empresas em que a casca e o bagaço de laranja são descartados, sem que o óleo essencial seja extraído. O resíduo proveniente dessas fontes poderá ser utilizado como substrato em fermentação no estado sólido, além dos subprodutos de origem industrial que poderão ser utilizados em conjunto com outros resíduos e subprodutos ricos em terpenos.

[013]. Apesar da existência de várias rotas metabólicas para a biotransformação do limoneno, muitos estudos revelam o efeito inibidor do limoneno em vários micro-organismos. Segundo Maróstica Júnior e Pastore (2007a), seis rotas principais de conversão do limoneno podem ser distinguidas (Figura 1): oxidação do substituinte metila a compostos perílicos; conversão da dupla ligação do anel ao diol correspondente; oxidação alílica a cis, trans carveóis e carvona; epoxidação da ligação dupla na unidade isoprenil a α -Terpineol; oxidação alílica a isopiperitenol e epoxidação da ligação 8,9 a limoneno-8,9-epóxido.

α -pineno e β -pineno

[014]. O pineno, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, é um terpeno bicíclico que pode ser encontrado nos óleos essenciais de alecrim, cipreste, cominho, lavanda e também na terebentina, um líquido incolor obtido a partir da destilação da resina de algumas coníferas – especialmente de *Pinus eliottii* aqui no Brasil. Pouco solúvel em água, trata-se de um componente que apresenta dois isômeros ópticos ativos: o alfa e o beta pineno, ambos com massa molar de 136,24 g/mol e com 88,16% de carbono e 11,84% de hidrogênio. São termicamente instáveis, como diversas outras substâncias dos óleos essenciais, inflamáveis e podem ser obtidos (por biossíntese) a partir do geranyl pirofosfato, um precursor dos terpenos (AZAMBUJA, 2009).

[015]. O α -pineno e β -pineno são monoterpenos largamente distribuídos na natureza, além de também serem resíduos industriais com valor comercial reduzido (YOO; DAY, 2002). Coníferas como as diferentes espécies de *Pinus* possuem elevadas concentrações destes terpenos (LUDLEY et al., 2009).

Uso de resíduos

[016]. No Brasil, existe uma abundância de resíduos/ subprodutos agroindustriais que poderão ser utilizados como substratos naturais para a produção de derivados de terpenos, e que muitas vezes não encontram aplicação econômica.

[017]. O processamento de sucos cítricos representa uma importante indústria de alimentos no mundo, no entanto gera resíduos que consistem em: cascas, polpa, sementes e melaço cítrico. A quantidade de resíduos obtidos a partir de frutas cítricas é de 50% da fruta original. O resíduo permanece após a extração do suco e do óleo essencial. Em 2014, o Brasil deverá colher 16.452.150 t de laranja (IBGE, 2014). O valor de produção é cerca de R\$ 5 bilhões, o que representa 29,3% do valor da produção brasileira alcançado pelas frutíferas. A cultura está concentrada em São Paulo, responsável por cerca de 80 % da produção brasileira, e onde estão localizadas as maiores empresas processadoras de laranja, tornando o estado o maior produtor da fruta no mundo, e também o maior produtor e exportador de suco (IBGE, 2009). O processamento de suco de laranja produz uma enorme quantidade de resíduo de processo (TING; ROUSEFF; 1983). Isto constitui aproximadamente 50% do peso e provê excelentes modelos para produtos de valor agregado. A casca e outros bioprodutos são secos e comercializados como ração animal, entretanto o preço de venda do produto é baixo e a evaporação da água consome largas quantidades

de calor. (GROHMANN; BALDWIN, 1992). De acordo com Ashbell (1992) o bagaço da laranja compreende cerca de 42% do total da fruta. Mahmood, Greenman, e Scragg (1998) verificaram a existência de 46% de bagaço, casca e sementes, recuperando 54% de suco.

Qualidade e Tecnologia

[018]. O aumento na utilização de aromatizantes faz com que as empresas busquem fontes alternativas. As rotas convencionais de síntese química e o isolamento de plantas continuam sendo viáveis, mas a produção biotecnológica se apresenta como uma nova opção, pois permite a obtenção de aromas naturais.

[019]. A produção biotecnológica se desenvolve como opção atrativa, pelo fato dos aromas produzidos por fermentação serem considerados naturais. Além disto, a Biotecnologia oferece vantagens em relação à extração tradicional de materiais botânicos, com as vantagens de alta especificidade dos produtos finais, garantia de suprimento durante todo o ano e a possibilidade de utilização de matérias-primas alternativas, como resíduos agroindustriais (SOARES, 1998).

[020]. A biotransformação de terpenos representa uma alternativa muito atrativa para produção de aromas, pois se torna possível em condições brandas, não gera resíduos tóxicos e permite a produção de aromas naturais que podem ser utilizados como flavors e fragrância na indústria (DIONÍSIO et al., 2009).

Estado da Arte

[021]. Aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais. Entenda-se por isso os produtos de origem animal ou

vegetal normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como torrefação e fermentação, entre outros. Os aromas naturais são subdivididos em: óleos essenciais; extratos; bálsamos; oleorresinas; oleogomarrésinas e isolados (PEREIRA, 2007).

[022]. As legislações norte-americana e europeia referem-se aos compostos de aroma naturais àqueles obtidos por processos físicos (extração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados na natureza, sendo que o composto obtido deve ser idêntico ao já existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como natural (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

[023]. R-(+)- α -Terpineol tem um odor tipicamente de Lilás (*Syringa* L), enquanto (S)-(-)- α -Terpineol tem um odor de fragrâncias mais coníferas. α -Terpineol é um dos compostos de aroma mais comumente utilizados. É em sua maioria produzido quimicamente e está comercialmente disponível em baixo custo (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007b). O α -Terpineol é um produto comercialmente importante. Apenas pequenas quantidades são isoladas de óleo essencial.

[024]. O α -Terpineol é um álcool geralmente estável produzido por síntese química ácido-catalisada a partir de α -pineno ou óleo de terebentina. É um importante produto comercial, normalmente aplicado em sabonetes, cosméticos e preparações de flavor (BAUER; GARB; SUBURG, 2001). A biotransformação de limoneno para α -Terpineol como principal produto já foi descrita por fungos *Cladosporium* sp, *Penicillium digitatum*, *Oxysporum* e *Fusarium*. Para as bactérias, este

caminho de conversão tem sido relatado em *Pseudomonas gladiolos*, um recombinante de *Escherichia coli* e *P. fluorescens* (BICAS et al., 2008).

[025]. A produção de α -Terpineol por meio da biotransformação tem sido registrada por alguns autores, tendo sua concentração máxima descrita de 3,2 g/L (Tabela 1).

Tabela 1: Trabalhos relatando a obtenção do α -Terpineol por biotransformação

Referência	Substrato da biotransformação	Concentração obtida	Microorganismo
Maróstica Júnior Pastore (2007b)	Óleo essencial de laranja	450 mg /L	<i>Fusarium oxysporum</i>
an, Day e Cadwallader, (1998)	R-(+)-Limoneno	3200 mg/L	<i>Penicillium digitatum</i>
Bicas et al., (2008)	R-(+)-Limoneno	2400 mg/L	<i>Fusarium oxysporum</i>

[026]. De acordo com Maróstica Júnior e Pastore (2007b), há relatos anteriores de Limoneno-1,2-diol ser o produto de biotransformação majoritário em leveduras e fungos filamentosos e um produto minoritário obtido através de biotransformação com linhagens de bactérias. Uma linhagem de *Cladosporium* sp também se mostrou capaz de atacar a ligação 1,2 do limoneno resultando em cis- e transdiol como produtos principais, gerando concentrações finais de 0,2 e 1,5 g/L (VAN DER WERF; SWARTS; DE BONT, 1999).

[027]. Segundo informações do site da empresa The Good Scents Company (2011) o limoneno-1,2-diol ou limoneno glicol é um composto que possui odor de menta fresca, de aplicação em alimentos. O limoneno-1,2-diol é um composto que já teve sua aplicação reportada em alimentos, porém tem suas propriedades e toxicidade pouco estudada (FDA, 2013). São poucos os trabalhos focando em limoneno-1,2-diol como um produto majoritário de fermentação.

[028]. O mentol é um álcool de monoterpenos cíclicos, que possuem características bem conhecidas de refrescância e um cheiro mentolado. Devido a estas propriedades é um dos mais importantes aditivos aromatizantes, além de baunilha e de citrinos. Devido a esta razão, é utilizado em uma variedade de produtos de consumo, que variam a partir de produtos de confeitaria tais como chocolate e goma de mascar a produtos de cuidados orais, tais como pasta de dentes, assim como em produtos medicinais devido a sua refrescância e os efeitos biológicos. Mentol natural é isolado a partir de *Mentha canadensis*, mas também podem ser sintetizadas quimicamente numa escala industrial por meio de vários processos (KAMATOU *et al.*, 2013).

[029]. O mentol é o principal constituinte do óleo de hortelã-pimenta, uma preparação de ervas comumente usado para tratar náuseas, espasmos durante irritações intestinais e espasmos durante colonoscopia (AMATO; LIOTTA; MULÈ, 2014).

[030]. A demanda mundial de mentol é alta e foi estimado anteriormente em 30.000 a 32.000 toneladas métricas por ano. O mentol não é um composto predominante dos óleos essenciais, uma vez que ele só pode ser encontrado como um constituinte de um número limitado de plantas aromáticas. Estas plantas são conhecidas por apresentar atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, tais como agentes antibacterianos, antifúngicos, anti-prurido, anti-cancro e analgésicos, e

é também um fumigante eficaz. Além disso, o mentol é um dos terpenos mais eficazes utilizados para aumentar a penetração dérmica de fármacos (KAMATOU *et al.*, 2013).

[031]. Carvona é definido por Carvalho e Fonseca (2006) como tendo odor de hortelã doce. Carvona tem grande importância como fragrância e sabor, relevância na área médica e outras aplicações.

[032]. O terpeno carvona tem sido utilizado há vários séculos como fragrância e sabor através da utilização das sementes de alcarávia e hortelã-comum. As suas sementes, cujo óleo contém entre 50% e 70% de (4S)-(+)-carvona, têm sido utilizadas como aromatizante de pão (rye), queijo, chucrute, doces, carne, molhos e licores. A carvona tem sido utilizada ultimamente, sobretudo nos Países Baixos, no armazenamento em longo prazo de batatas. A carvona impede de forma mais eficaz do que os produtos químicos utilizados habitualmente para que as batatas grelem, ao mesmo tempo em que apresenta uma menor toxicidade para o ser humano. Além disso, este terpeno apresenta propriedades anti-fúngicas e anti-bacterianas (CARVALHO; FONSECA, 2006).

[033]. Pouquíssimos trabalhos registraram a produção de carvona. A produção biotecnológica de carvona usando limoneno como precursor já foi descrita em alguns estudos (CARVALHO; FONSECA, 2003; VANEK; VALTEROVA; VALSAR, 1999), porém publicações a respeito do assunto são bastante escassas.

Vantagens do uso de resíduos agroindustriais

[034]. A utilização ou o aproveitamento destes resíduos apresenta uma importante solução ambiental porque esses podem ser destinados aos bioprocessos industriais como matérias-primas e que geram desta forma novos produtos. Como os resíduos apresentam baixo custo, apresentam vantagem econômica porque se inserem em bioprocessos

como insumos alternativos, reduzindo custos de processos e desta forma viabilizam a produção de um determinado bioproduto de interesse. Além disso, formam uma cadeia de produção, porque resíduos são subprodutos de determinado processo que passam a ser insumo de um novo processo (bioprocessos). Em suma, os resíduos agro-industriais são de baixo custo, apresentam boa disponibilidade e podem conter muitas substâncias de alto valor, ou ser convertidos em produtos de importante valor econômico, e ao mesmo tempo, promover a redução da disposição de resíduo no meio ambiente, diminuindo assim a poluição ambiental.

[035]. Resíduos agro-industriais tais como farelos, cascas, palha, bagaços, resíduos de frutas e sementes usados como matéria-prima em bioprocessos comportam-se como excelentes substratos para o crescimento de microorganismos, pois fornecem nutrientes essenciais (Pandey e Radhakrishnan, 1992; Pandey et al., 1994; Pandey e Soccol, 1998; Pandey et al. , 2000). Sua aplicação em bioprocessos também oferece vantagens em biorremediação e detoxicação biológica de compostos tóxicos (Ramachandran, 2000).

[036]. Partindo desse conhecimento, e através de inúmeros estudos e experimentos, verificou-se que a utilização dos resíduos agroindustriais tais como cascas, polpas, bagaços e resíduos líquidos contendo terpenos possuem grande potencial para a produção pelas espécies de *Diaporthe sp.* e *R. mucilaginoso* de compostos derivados de interesse na indústria, seja como, componente de aromas ou fragrâncias.

Descrição Resumida da Invenção

[037]. A presente invenção tem como objetivo prover um processo para a produção dos derivados de limoneno e terpenos, tais como: Limoneno-1,2-diol, carvona, α -terpineol e mentol, utilizando

resíduos agroindustriais sólidos e líquidos, bem como outros meios formulados a partir de substratos naturais e/ou sintéticos, tais como da indústria de processamento de frutos cítricos como laranja.

[038]. Mais especificamente, a presente invenção tem como objetivo o processo de produção de derivados da biotransformação do limoneno com o fungo isolado do gênero *Diaporthe sp. (Phomopsis)* e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* a partir de produtos de descarte e subprodutos do processamento frutos cítricos e matérias-primas e resíduos líquidos de qualquer natureza contendo fontes de terpenos. Portanto, a presente invenção tem por objetivo reaproveitar produtos e subprodutos cítricos ou não, ricos em terpenos para produção de novos produtos naturais (bioaromas) de interesse na indústria alimentícia e de aplicação cosmética ou farmacêutica como o mentol, α -terpineol, limoneno-1,2-diol e carvona.

Citação das Figuras

[039]. Na figura 1, apresenta-se o fluxograma da produção de compostos de aromas derivados de terpenos por fermentação no estado sólido.

[040]. Na figura 2, apresenta-se o fluxograma da produção de compostos de aromas derivados de terpenos em fermentação submersa.

Descrição Detalhada da Invenção

[041]. As matérias-primas utilizadas nos estudos e experimentos do processo da presente invenção foram adquiridas no comércio local do estado do Paraná, Brasil.

Preparo do substrato resíduo de laranja

[042]. O resíduo da extração do suco de laranja, consistindo em casca e bagaço, foi utilizado como substrato para os processos

fermentativos. Os substratos sólidos "in natura" (casca + bagaço) foram cortados em fragmentos e secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60 °C com a finalidade de evitar contaminação durante sua armazenagem, além de facilitar posterior moagem. Foram triturados em moinho de facas e classificados granulometricamente entre 2 e 3 mm; entre 2 mm e 0,8 mm e abaixo de 0,8 mm.

Composição média do resíduo da laranja

[043]. O resíduo de laranja (casca + bagaço) é oriundo do comércio local, sendo constituído de uma mistura de bagaço e casca de laranja. A quantidade de óleo essencial no resíduo de laranja atinge um valor máximo de 6,56% ou 65,6g/kg de resíduo para um total de cinco lavagens na extração e um valor de 5,36% ou 53,6g/kg para duas lavagens. As concentrações dos produtos foram analisadas após extrações com duas lavagens e tomaram como base em sua análise uma quantidade de óleo essencial de 5,36%.

Tabela 2: Composição físico-química do resíduo (casca+bagaço) de laranja.

Constituintes	Resíduo de laranja
Umidade (%)	14,2 ± 0,14
Açúcares redutores (%)	10,13 ± 0,99
Açúcares totais (%)	21,13 ± 1,57
Proteínas (%)	5,69
Cinzas (%)	3,20 ± 0,12
Lipídios (%)	2,89 ± 0,15
Carbono/Nitrogênio (%)	31,70

Tabela 3: Porcentagem de limoneno, α -pineno e β -pineno no resíduo de laranja.

R-(+)-Limoneno (%)	β -pineno (%)	α -pineno (%)
95,32 \pm 0,94	0,4 \pm 0,04	0,235 \pm 0,005

Preparo do meio para inóculo

[044]. O inóculo em forma de *pellets* é obtido através do cultivo do fungo por um período de 5 dias em um meio natural a base de extrato de laranja. O extrato é preparado em banho-maria sob fervura por 20 minutos, na concentração de 1kg de resíduo seco/L de água. O extrato é filtrado e separado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL em cada um deles. Após adição de sulfato de amônio (5g/L), o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. O pré-inóculo provém suspensão aquosa do cultivo da cepa em meio PDA por 7 dias. São utilizados 2 frascos de PDA a cada 25 mL de água, uma vez que o fungo *Diaporthe* sp (*Phomopsis*) não apresenta produção de esporos nestas condições. O volume de inóculo é fixado em 3 mL.

Preparo do meio sólido e fermentação em estado sólido

[045]. O resíduo de laranja (casca + bagaço) foi selecionado como substrato para fermentação em estado sólido considerando maior quantidade de óleo extraído (5,36%) e que apresentou 95% de limoneno em detrimento ao baixo teor de terpenos dos outros substratos testados. O teor de água inicial é ajustado de acordo com a capacidade máxima de absorção do substrato em 80%, a qual mostrou a melhor condição para o processo. Após os experimentos, o pH inicial do meio para o processo foi ajustado ou não, na faixa de 4,5 a 6,0 com hidróxido de sódio. A temperatura foi fixada em 30°C, a razão de inóculo para o meio extrato de laranja foi fixada em 6 mL e a granulometria entre 2mm e 3mm. Os meios de cultivo são esterilizados

em autoclave a 121°C por 15 minutos. O processo fermentativo é de 5 a 8 dias.

Fermentação submersa

[046]. Após o preparo do meio extrato de laranja e sua inoculação, os microorganismos crescem por 5 dias (*Diaporthe sp.*), quando então há a adição de 0,5% de limoneno para a batelada única ou 0,125%/dia durante 4 dias para a batelada alimentada. O processo fermentativo dura de 10 a 12 dias. O processo mais vantajoso é o de batelada única, com uma produção de limoneno-1,2-diol que atinge o dobro da batelada alimentada. Para o processo utilizando a cepa (*R. mucilaginosa*), o inoculo é preparado em caldo YM ou extrato de laranja durante 48h. A fermentação pode ocorrer em meio extrato de laranja (casca+bagaço) ou meio mineral adicionados de 0,5% de limoneno.

Tabela 4: Concentrações obtidas dos produtos estudados com a cepa *Diaporthe sp (Phomopsis)* na fermentação submersa e na fermentação em estado sólido em g/kg de substrato.

Método	Limonene-1,2-diol	(-) Mentol	α -Terpineol	D-Carvona
Fermentação submersa	2,10 g/L	0,28 g/L	0,26 g/L	0,25 g/L
Fermentação em estado sólido	3,32 g/kg	-	0,41 g/Kg	-

Referências

[047]. AMATO, A.; LIOTTA, R.; MULÈ, F. Effects of Menthol on circular smooth muscle of human colon: analysis of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 295-301, 2014.

- [048]. ARCE, A.; POBUDKOWSKAL, A.; RODRÍGUEZ, O.; SOTO, O. Citrus essential oil terpenless by extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid: Effect of the temperature. **Chemical Engineering Journal**. v. 133, p. 213-218, 2007.
- [049]. ASHBELL, G. Conservation of citrus peel by ensiling for ruminant feed. In: SIMPÓSIO UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGRO-INDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 1992, São Carlos, SP. *Anais*. São Carlos: EMBRAPA/UEPAE, p.189-190, 1992.
- [050]. AZAMBUJA, W. Óleos Essenciais. org: Pineno. Disponível em: <<http://oleosessenciais.org/tag/alpha-pinene/>>. Acesso em: 17/05/2011.
- [051]. BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, J. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. 4 ed. Wiley- VCH, Weinheim, 2001.
- [052]. BERGER, R. G. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnol Lett**. 2009.
- [053]. BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Biotechnological Flavour Generation. In: TAYLOR, A. J (ed) *Food Flavour Technology*. Sheffield: Sheffield Academic, 2002.
- [054]. BICAS, J. L.; FONTANILLE, P.; PASTORE, G. M.; LARROCHE, C. Characterization of monoterpene biotransformation in two Pseudomonads. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1991–2001, 2008.
- [055]. BURDOCK, G. A. **Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients**. 3. ed., CRC: Boca Raton, 1995.
- [056]. CARVALHO, C. C. R. de ; FONSECA, M. M. R., da. (2006), carvone: Why and how one bother to produce this terpene. **Food Chem.**, v. 95, p. 413-422, 2006.

[057]. CARVALHO, C. C. R. de.; FONSECA, M. M. R., da. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3925-3931, 2003.

[058]. DIAZ, S.; ESPINOSA, S.; BRIGNOLE, E. A. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids optimal process and solvent cycle design. **J. of Supercritical Fluids**. n. 35, p.49-61, 2005.

[059]. DIONÍSIO, A; P.; MOLINA, G.; BICAS, J. L.; DIAS, S.; PASTORE, G. M. Fungal biotransformation of terpenes. **New Biotechnology**. v. 25S , set. 2009.

[060]. FDA. **Limonene Glycol**. Acesso em: 03/02/2013. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?filter=1946-00-5&sortColumn=&rpt=eafusListing>

[061]. FERON, G.; BONNARME.; DURAND.; Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p. 285-293, setembro, 1996.

[062]. GROHMANN. K. AND BALDWIN, E. A. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. **Biotechnol Lett**. v. 14, p. 169-174, 1992.

[063]. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal – 200. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1479&id_pagina=1 >. Acesso em: 10/11/2009.

[064]. KAMATOU, G. P. P.; VERMAAK, I.; VIJOEN, A. M.; LAWRENCE, B. M. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013.

- [065]. LONGO, M. A.; SANRÓMAN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technol. Biotechnol.** v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.
- [066]. LUDLEY, K. E.; JICKELLS, S. M.; CHAMBERLAIN, P. M.; WHITAKER, J.; ROBINSON, C. H. Distribution of monoterpenes between organic resources in upper soil horizons under monocultures of *Picea abies*, *Picea sitchensis* and *Pinus sylvestris*. *Soil Biology & Biochemistry*, p. 1-10, 2009.
- [067]. MAHMOOD, A. U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 22, p. 130-137, 1998.
- [068]. MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais. Tese (Ciência de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- [069]. MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Jr.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. v. 30, n. 2, 2007a.
- [070]. MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Production of R-(+)- α -Terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as médium. **Food Chemistry.** v. 101, n. 1, p. 345-350, 2007a.
- [071]. NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **Indústria de suco prevê grande safra de laranja.** 2011.
- [072]. PEREIRA, C. D. A. **Produção de Metabólitos Frutais por *Kluyveromyces Marxianus* em Fermentação Submersa em Meio à Base de Melaço de Soja.** Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

[073]. SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. **Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas**. Caxias do Sul-RS: Educus, 2003.

[074]. SCHARPF, I. G.; SEITZ, E. W.; MORRIS, A. J.; FARBOOD, M. I. Generation of Flavor and Odor Compounds through Fermentation Processes. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (ED). Biogeneration of aromas. **American Chemical Society**, p.323-346, 1986. (Symposium Series, 317).

[075]. SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNAN, E. Biocatalytic preparation of naturaflavours and fragrances. **TRENDS in Biotechnology**. v. 23, n.4, p. 193-198, 2005.

[076]. SOARES, M. **Metabólitos Frutais Produzidos por Pachysolen Tannophylus e Ceratocystis fimbriata em Fermentação no Estado Sólido Sobre Casca de café**. 91 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

[077]. STEINBRECHER, R.; HAUFF, K.; RISSLER, J.; DIIRR, M.; SEUFERT. Monoterpene Emission from Valencian *Citrus* Belt, Spain Soils in Orange Plantations of the Spain. **Phys. Chem. Earth B**. v. 24, n. 6, p. 695-698, 1999.

[078]. TAN, Q.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process Biochemistry**. v. 33, n. 1, p. 29-31, 1998.

[079]. THE FREEDONIA GROUP. **World Flavors & Fragrances**. United states of America, 2012.

[080]. THE GOOD SCENT COMPANY. Limonene-glycol. Disponível em: <<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1289451.html>>. Acesso em: 22/07/2011.

- [081]. TING, S. V.; ROUSEFF, R. L.; Dietary fiber from citrus wastes:Characterisation. **ACS Symp. Ser.** 214, p. 205-219, 1983.
- [082]. VAN DER WERF, M. J.. SWARTS, H. J.; DE BONT, J. A. Rhodococcus erythropolis DCL14 Contains a novel degradation pathway for limonene. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 2092-2102, 1999.
- [083]. VANEK T.; VALTEROVA I.; VANKOVA R.; VAISAR, T.; Biotransformation of (-)-limonene using Solanum aviculare and Dioscorea deltoidea immobilized plant cells. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 625-628, 1999.
- [084]. YADAVA, A. R.; CHAUHAN, A. S.; REKHA, M. N.; RAMTEKE, R. S. Flavour quality of dehydrated lime [Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle]. **Food Chemistry**. v. 85, p. 59-62, 2004.
- [085]. YOO, S.K.; DAY, D. F. Bacterial metabolism of and -pinene and related monoterpenes by Pseudomonas sp. Strain PIN. **Process Biotechnol.** v. 37, p. 739-745, 2002.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA caracterizado pelo uso desses derivados como aromas para alimentos processados, como produtos com propriedades bioativas e na redução de toxicidade dos terpenos presentes em materiais utilizados como substratos da fermentação.

2. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR DIAPORTHE SP., de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender:

- Secagem dos resíduos sólidos/subprodutos;
- Moagem e classificação dos resíduos sólidos/subprodutos;
- Preparo do meio de fermentação;
- Esterilização do meio de fermentação;
- Preparo do meio de inóculo a partir de extrato de laranja e pellets de *Diaporthe sp*;
- Fermentação em estado sólido;
- Extração de compostos aromáticos.

3. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender:

- Secagem dos resíduos sólidos/subprodutos;
- Moagem e classificação dos resíduos sólidos/subprodutos;
- Preparo do meio de fermentação a partir de extrato de laranja e esterilização;
- Preparo do meio de inóculo a partir do meio de fermentação esterilizado e da adição de *Diaporthe sp* e *Rhodotorula mucilaginosa*;

- Adição de limoneno ao meio esterilizado;
- Fermentação submersa;
- Extração de compostos aromáticos.

4. PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE LIMONENO-1,2-DIOL POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO caracterizado por utilizar fungo *Diaporthe sp* (Phomopsis) em substrato/suporte de laranja (casca+bagaço) e/ou outras frutas cítricas e/ou plantas aromáticas ricas em terpenos naturais.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIMONENO-1,2-DIOL POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PELO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS), de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por utilizar laranja (casca+bagaço) como substrato/suporte e compreender fermentação realizada em pH entre 4,5 - 6,0, com taxa de inóculo de 6 mL e tempo de fermentação entre 5 a 8 dias à temperatura 30 °C, com substrato de granulometria 2 – 3 mm e apresentando 80% de umidade.

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIMONENO-1,2-DIOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DO INÓCULO DO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS) caracterizado por utilizar como substrato extrato de laranja (casca+bagaço) e/ou outras frutas cítricas e/ou plantas aromáticas ricas em terpenos naturais fermentado, em batelada única (0,5% limoneno) após 5 dias de crescimento.

7. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIMONENO-1,2-DIOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS), de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por utilizar extrato de laranja (casca+bagaço) como substrato, em batelada alimentada (0,125% de limoneno) por 4 dias.

8. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MENTOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DO INÓCULO DO FUNGO *DIAPORTHE SP*

(PHOMOPSIS), caracterizado por utilizar extrato de laranja (casca+bagaço) como substrato em batelada única (0,5% limoneno) após 5 dias de crescimento.

9. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MENTOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM O FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS), caracterizado por utilizar extrato de laranja (casca+bagaço) em batelada alimentada (0,125% limoneno) por 4 dias.

10. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALFA-TERPINEOL POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PELO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS), caracterizado por utilizar extrato de laranja (casca+bagaço) como substrato/suporte e compreender fermentação realizada em pH entre 4,0, com taxa de inóculo de 6 mL e tempo de fermentação entre 7 dias à temperatura 30 °C, com substrato de granulometria 0,8 – 2 mm e apresentando 80% de umidade.

11. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALFA-TERPINEOL POR CULTURA SUBMERSA PELO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS) CRESCIDO, caracterizado por utilizar como substrato extrato de laranja (casca+polpa) em batelada única (0,5% limoneno) por 5 dias de fermentação.

12. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALFA-TERPINEOL POR CULTURA SUBMERSA PELO FUNGO *DIAPORTHE SP* (PHOMOPSIS) caracterizado por utilizar como substrato extrato de laranja (bagaço+caldo) em batelada alimentada (0,125% limoneno) por 5 dias de fermentação.

13. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALFA-TERPINEOL, CARVONA E MENTOL caracterizado por ser realizado em fermentação submersa a partir da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* crescida em caldo YM em meio mineral adicionado de limoneno comercial.

14. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ALFA-TERPINEOL, CARVONA E MENTOL POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA caracterizado por ser realizado pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* crescida em caldo YM em meio extrato de laranja adicionado de limoneno comercial.

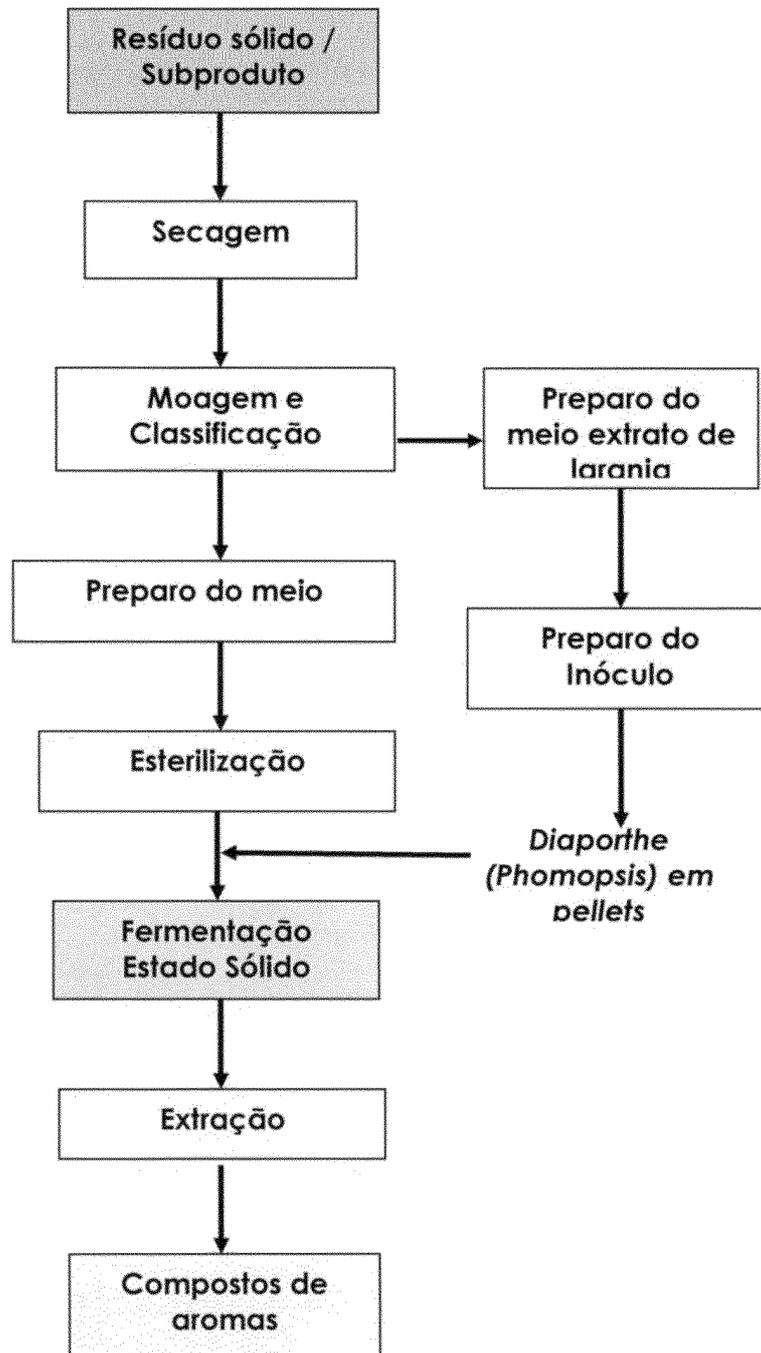


Figura 1

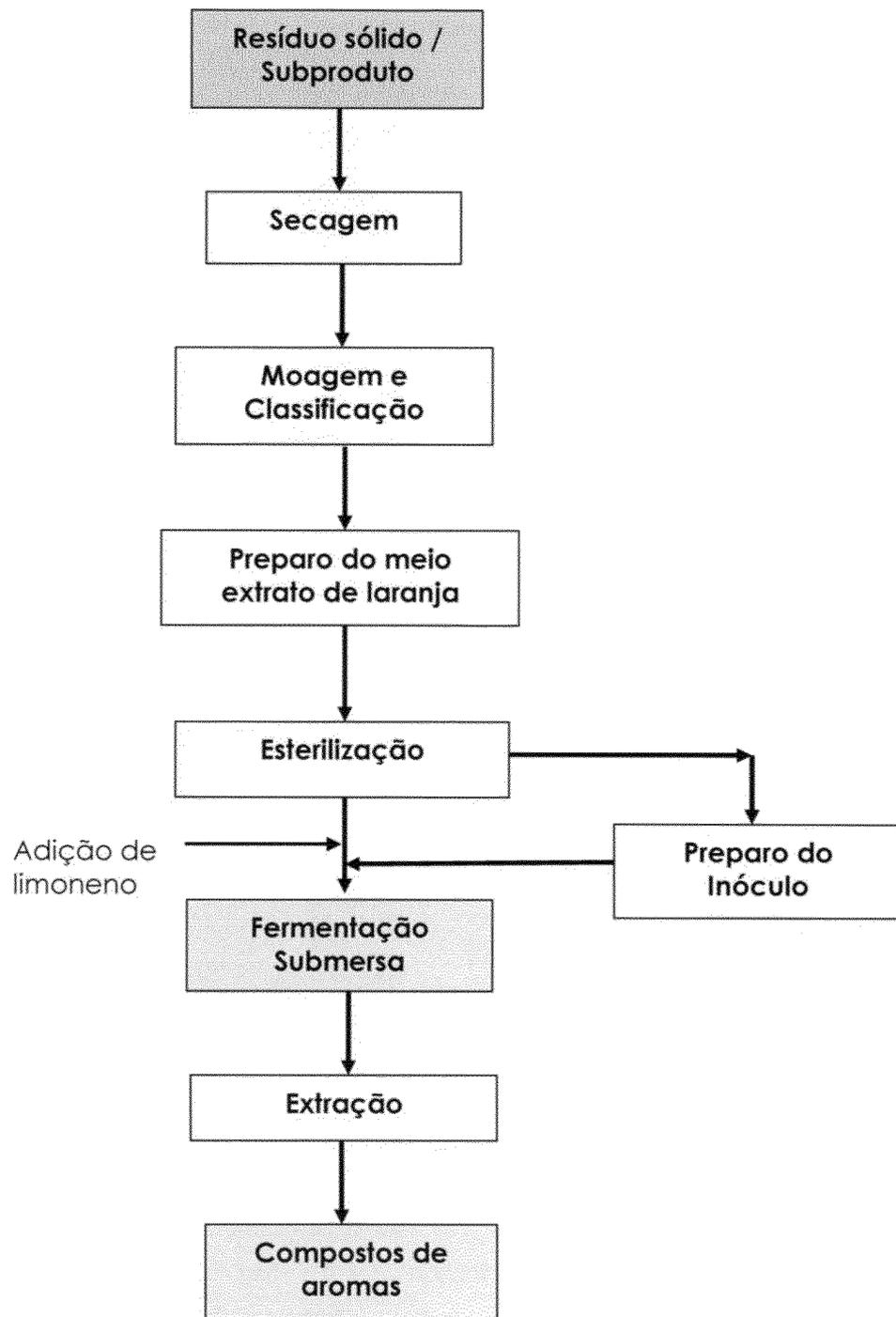


Figura 2

RESUMO**BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE TERPENOS POR
*DIAPORTHE SP. E RHODOTORULA MUCILAGINOSA***

A presente invenção trata de um processo para a produção de derivados do limoneno por fermentação sólida e líquida a partir da biotransformação resultando em limoneno-1,2-diol, carvona, (-)-mentol e α -terpineol. O processo agrega a elaboração de meios naturais para fermentação e produção do inóculo. O bioprocessos tecnológico é alternativo para a obtenção de aromas e sabores naturais derivados de limoneno, uma vez que tal processo é brando e não gera resíduos tóxicos, possui baixo custo devido a utilização de resíduos e subprodutos baratos. Outra vantagem do processo é a não dependência de fontes naturais sazonais ou escassas como a extração vegetal. O processo utiliza microorganismos isolados do meio ambiente, e produtos e subprodutos que contém terpenos como os do processamento de laranja e cítricos, para a realização da fermentação em estado sólido e submersa, além de outras matérias-primas tais como vegetais, cascas, farelos, sementes e resíduos líquidos de distintas naturezas, como fontes de terpenos.