

**ARLEIDE ROSA DA SILVA**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO E DO  
RICINOLEATO DE METILA NA PRESENÇA DAS LEVEDURAS  
*Candida Oleophila E Candida Guilliermondii***

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre em Química pela Universidade  
Federal de Santa Catarina**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Marina Uieara**

**FLORIANÓPOLIS  
2002**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO E DO RICINOLEATO DE METILA NA PRESENÇA DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA OLEOPHILA* E *CANDIDA GUILLIERMONDII***

**ARLEIDE ROSA DA SILVA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação Interinstitucional em Química da Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Regional de Blumenau, pela seguinte banca examinadora:

**Orientadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dra. Marina Uieara  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

**Co-orientador:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Wendhausen Jr.  
Universidade Regional de Blumenau – FURB

**Banca examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dra. Marina Uieara  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dra. Lorena B.B. Tavares  
Universidade Regional de Blumenau – FURB

\_\_\_\_\_  
Prof.Dr. Ricardo Andrade Rebelo  
Universidade Regional de Blumenau – FURB

\_\_\_\_\_  
Prof.Dr. Luiz Augusto S. Madureira  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Florianópolis, 18 de dezembro de 2002.

**Aos meus amados  
João Rosa e Mariah  
Saudades...**

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é pouco, perante tantas demonstrações de amizade e apoio, porém é imprescindível que se faça.

❖ Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Uieara que com toda dedicação e competência orientou esse trabalho. Minha admiração e apreço!

❖ À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena B.B. Tavares que adotou esse trabalho e mestranda como seus. Minha gratidão!

❖ Ao Prof. Dr. Renato Wendhausen Jr. por sua participação neste trabalho.

❖ À Prof<sup>a</sup> Msc. Ana Maria Brosfeld por conceder o uso das instalações e equipamentos do laboratório de Biotecnologia/FURB, além das inúmeras contribuições e sugestões dadas. Muito Obrigada!

❖ À aluna e amiga Elizabeth Rocco que com sua co-participação tornou possível a realização deste trabalho. Valeu Beth!

❖ Ao aluno Leonardo Vilani de Vargas, pela preciosa colaboração nas análises realizadas durante o desenvolvimento da parte experimental.

❖ Aos meus amigos pessoais e profissionais, para os quais muitas vezes neguei minha atenção e companhia.

❖ Aos colegas do laboratório de pesquisa e funcionários do Departamento de Química da UFSC e FURB e do IPT-FURB.

❖ Aos meus professores do mestrado pela forma profissional como conduziram esta etapa.

❖ Aos Profs. Drs. Ricardo Andrade Rebelo, Luiz Augusto S. Madureira , por terem aceitado prontamente ao convite para fazerem parte dessa banca.

❖ À UFSC, FURB, CAPES e FUNCITEC pela oportunidade e apoio financeiro concedidos.

❖ Aos meus irmãos, James, Rúbia e Janayna que me incentivaram e estenderam a mão durante todo o tempo e à Jana que com sua persistência e competência contribuiu preciosamente para a confecção desse manuscrito.

❖ À minha mãe Almerinda e meu marido Marcos Antônio, que me sustentaram emocionalmente e foram companhia incansável nesta jornada. Devo muito à vocês! Obrigada!

❖ A Deus por ter dado a fé que me moveu até aqui!



**Existe uma época da vida em que a gente quer conhecer tudo. Depois, a gente acha que já sabe tudo. Então, crescemos. E descobrimos que a constante busca do conhecimento faz parte da nossa vida. Todos os dias. Como a busca dos nossos sonhos.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 SÍNTESE ORGÂNICA POR BIOTRANSFORMAÇÃO</b> .....	3
<b>1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE BIOCATALISADORES</b> .....	6
<b>1.3 A CINÉTICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO</b> .....	7
1.3.1 A Curva de Crescimento Microbiano.....	9
1.3.2 Fatores que Influenciam o Crescimento Celular.....	13
<b>1.4 CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS DE CULTURA E MICRORGANISMOS PARA BIOTRANSFORMAÇÃO</b> .....	14
<b>1.5 APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS</b> .....	16
<b>1.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS</b> .....	17
1.6.1 Produção de Lactonas por Microrganismos.....	20
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>2.1 OBJETIVOS</b> .....	28
2.1.1 Objetivo Geral.....	28
2.1.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	29
<b>3.1 MATERIAIS, MEIOS DE CULTURA E INSTRUMENTAÇÃO</b> .....	30
3.1.1 Materiais e Reagentes.....	30
3.1.2 Meios de Cultura e Soluções .....	31
3.1.3 Instrumentação.....	32
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	34
3.2.1 Abertura da Ampola e Reativação das Células Liofilizadas.....	34
3.2.2 Preparo dos Inóculos para os Ensaios de Crescimento Celular.....	35
3.2.3 Preparo dos Inóculos para os Ensaios de Biotransformação.....	36
3.2.3.1 Ensaios em incubador rotativo (shaker).....	36

3.2.3.2 Ensaio em biorreator.....	39
3.2.4 Metodologia Analítica para Tratamento das Amostras Provenientes do Meio de Biotransformação.....	42
3.2.5 Determinações Microbiológicas.....	44
3.2.5.1 Detecção de bactérias pelo método de Gram.....	44
3.2.5.2 Determinação da concentração celular e da velocidade específica de crescimento.....	45
3.2.6 Método de Extração das Amostras.....	48
3.2.7 Procedimentos para Análise das Amostras por Cromatografia Gasosa.....	48
3.2.7.1 Esterificação do ácido ricinoleico por diazometano.....	49
3.2.7.2 Sinalização do ricinoleato de metila.....	49
3.2.7.3 Preparação da solução padrão de gamadecalactona (GDL) para construção da curva de calibração.....	50
3.2.7.4 Preparação da solução padrão de ricinoleato de metila para construção da curva de calibração.....	50
3.2.7.5 Otimização das condições cromatográficas.....	51
3.2.7.6 Preparação do padrão interno – estearato de metila.....	53
3.2.8 Preparação do Ricinoleato de Metila Aravés da Eterificação do Ácido Ricinoleico por Metanol em Meio Ácido.....	53
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO.....</b>	<b>57</b>
4.1.1 Curva de Crescimento da Linhagem <i>Candida oleophila</i> no Meio YMA (Ensaio S1) e no Meio de Biotransformação MBAR (Ensaio S2) com Ácido Ricinleico.....	57
4.1.2 Curva de Crescimento da Linhagem <i>Candida guilliermondii</i> nos Meios YMA, MBAR, MSA e MSB.....	65
4.1.3 Avaliação da Relação entre Linhagem Utilizada e Crescimento Celular.....	77
4.1.4 Comportamento do pH nos Diferentes Meios de Crescimento.....	78
4.1.5 Comportamento do pH nos Diferentes Meios na Fase de Biotransformação.....	81
<b>4.2 DETECÇÃO DA GAMADICALACTONA PRODUZIDA NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO E DO RICINOLEATO DE METILA POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....</b>	<b>89</b>

<b>4.4 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 QUANTIFICAÇÃO DA GAMADECALACTONA E DO ÁCIDO RICINOLEICO ESTERIFICADO.....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
5.1 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DESSE TRABALHO.....	97
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>



## LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1. Representação da 2-heptanona (1), da gamadecalactona (2) e da cis-6-dodecen-4-olida (3).....	5
Figura 2. Curva de crescimento celular (g/L) e velocidade específica de crescimento microbiano - $\mu_x(h^{-1})$ – em cultura descontínua .....	10
Figura 3. Terpenos produzidos por <i>Ceratocystis sp.</i> .....	19
Figura 4. Representação do valenceno (5,6 dimetil-8-isopropenilbicyclo [4,4,0] –1 deceno) .....	19
Figura 5. Representação dos ésteres: valerato de isopentila (1), butirato de etila (2) e hexanoato de etila (3) .....	20
Figura 6. Representação da molécula $\delta$ -pentil-alfa-pirona, sintetizada por fungo do gênero <i>Trichoderma</i> .....	25
Figura 7. Representação da gamadodecalactona (1) e da gamaoctalactona (2) .....	26
Figura 8. Representação das colunas capilares: fase líquida apolar DB –1 (1) e fase líquida intermediária DB –17 (2).....	51
Figura 9. Concentração celular da linhagem <i>Candida oleophila</i> no meio YMA em função do tempo para o ensaio S1.....	59
Figura 10. Concentração celular da linhagem <i>Candida oleophila</i> no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S2.....	60
Figura 11. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida oleophila</i> cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S1.....	62
Figura 12. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida oleophila</i> cultivada no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S2.....	63
Figura 13. Concentração celular da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3.....	66
Figura 14. Concentração celular da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S4.....	67
Figura 15. Concentração celular da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> no meio MSA em função do tempo para o ensaio S5.....	68
Figura 16. Concentração celular da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> no meio MSB em função do tempo para o ensaio S6.....	69
Figura 17. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3.....	72

Figura 18. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> cultivada no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S4.....	73
Figura 19. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> cultivada no meio MSA em função do tempo para o ensaio S5.....	74
Figura 20. Representação da concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> cultivada no meio MSB em função do tempo para o ensaio S6.....	75
Figura 21. Representação dos valores de pH encontrados nos diferentes ensaios com os meios de crescimento utilizados com <i>Candida guilliermondii</i> .....	80
Figura 22. Representação da variação do pH para os ensaios COAR, CORM, CGAR e CGRM.....	82
Figura 23. Cromatograma da amostra coletada no t = 24 h no meio de biotransformação com a linhagem <i>Candida oleophila</i> e o ácido ricinoleico.....	83
Figura 24. Espectro de massa da gamadecalactona padrão .....	84
Figura 25. Fragmentação da gamadecalactona em dois picos base de m/z= 85 u.m.a.....	85
Figura 26. Curva analítica do ácido ricinoleico (como ricinoleato de metila) na faixa de concentração de 100 mg.L <sup>-1</sup> até 500 mg.L <sup>-1</sup> usando o método de padronização interna.....	91
Figura 27. Curva analítica da gamadecalactona na faixa de concentração de 50 mg.L <sup>-1</sup> até 250 mg.L <sup>-1</sup> usando o método da padronização interna.....	92
Figura 28. Método de repique das cepas utilizadas.....	106
Figura 29. Incubador rotatório.....	106
Figura 30. Biorreator.....	107
Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHZ) do ricinoleato de metila.....	108
Figura 32. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (200 MHZ) do ricinoleato de metila.....	108
Esquema 1. Etapas da produção de gamadecalactona através da oxidação degradativa do ácido ricinoleico por linhagens do gênero <i>Cândida</i> .....	23
Esquema 2. Representação esquemática para o preparo dos inóculos dos ensaios de biotransformação realizados em incubador rotativo com as linhagens <i>Candida oleophila</i> e <i>Candida guilliermondii</i> em ricinoleato de metila.....	38
Esquema 3. Representação esquemática para o preparo dos inóculos para os ensaios de biotransformação realizados em biorreator com as linhagens <i>Candida oleophila</i> e <i>Candida guilliermondii</i> em ricinoleato de metila.....	41

Esquema4.Representação esquemática do tratamento analítico das amostras provenientes do meio de biotransformação .....	43
Esquema 5. Diferentes formas de degradação do ácido 4-hidroxicanônico por leveduras	88
Esquema6. Preparação de cepas em placas de Petri através do método das diluições sucessivas.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades gerais das fermentações e biotransformações.....	5
Tabela 2. Considerações sobre o uso de biocatalisadores.....	7
Tabela 3. Composição enantiomérica de gamadecalactona (GDL) isolada de frutas.....	16
Tabela 4. Condições de incubação dos microrganismos utilizados .....	35
Tabela 5. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios de biotransformação do ácido ricinoleico com as linhagens <i>Candida oleophila</i> (COAR) e <i>Candida guilliermondii</i> (CGAR) .....	39
Tabela 6. Valores relativos a concentração celular (x) e velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) em função do tempo .....	47
Tabela 7. Condições cromatográficas otimizadas para construção das curvas analíticas e análise da gamadecalactona e do ricinoleato de metila com adição do padrão interno estearato de metila .....	52
Tabela 8. Descrição sumária dos ensaios realizados.....	56
Tabela 9. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios S1 e S2.....	58
Tabela 10. Valores obtidos de concentração celular (x) no meio YMA com a linhagem <i>Candida oleophila</i> em função do tempo para o ensaio S1.....	59
Tabela 11. Valores obtidos de concentração celular (x) no meio MBAR com a linhagem <i>Candida oleophila</i> em função do tempo para o ensaio S2.....	60
Tabela 12. Valores relativos a concentração celular e a velocidade específica ( $\mu_x$ ) de crescimento em função do tempo para o ensaio S1.....	62
Tabela 13. Valores relativos a concentração celular e a velocidade específica ( $\mu_x$ ) de crescimento em função do tempo para o ensaio S2.....	63
Tabela 14. Valores máximos de velocidade específica e concentração celular nos meios estudados após 18 h de cultivo da linhagem <i>Candida oleophila</i> .....	65
Tabela 15. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios S3, S4, S5 e S6.....	65
Tabela 16. Valores obtidos de concentração celular no meio YMA com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S3.....	66
Tabela 17. Valores obtidos de concentração celular no meio MBAR com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S4.....	67
Tabela 18. Valores obtidos de concentração celular no meio MSA com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S5.....	68
Tabela 19. Valores obtidos de concentração celular no meio MSB com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S6.....	69

Tabela 20. Valores obtidos de concentração celular e da velocidade específica da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3.....	72
Tabela 21. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MBAR com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S4.....	73
Tabela 22. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MSA com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S5.....	74
Tabela 23. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MSB com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo para o ensaio S6.....	75
Tabela 24. Valores máximos de velocidade específica e concentração celular encontrados nos meios estudados em 48 horas de cultivo da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> .....	77
Tabela 25. Valores de pH encontrados nos meios de crescimento utilizados com a linhagem <i>Candida guilliermondii</i> em função do tempo.....	79
Tabela 26. Valores de pH encontrados no meio de biotransformação para os ensaios COAR, CORM, CGAR e CGRM.....	81
Tabela 27. Relação de $A_a/A_{PI}$ e $m_A/m_{PI}$ das soluções de ácido ricinoleico injetadas em triplicata para construção da curva analítica usando método de padronização interna .....	90
Tabela 28. Relação de $A_a/A_{PI}$ e $m_A/m_{PI}$ das soluções de gamadecalactona na faixa de concentração de $50 \text{ mg.L}^{-1}$ até $250 \text{ mg.L}^{-1}$ injetadas em triplicata para construção da curva analítica usando o método de padronização interna.....	91
Tabela 29. Relação entre áreas do analito ácido ricinoleico esterificado e do padrão interno ( $A_1/A_{PI}$ ) para a injeção em triplicata das amostras e respectivas concentrações de ácido ricinoleico esterificado encontradas nas amostras nos tempos de 0 a 36 horas.....	94

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa – área de ricinoleato de metila  
Ap<sub>i</sub> – área do padrão interno  
AN – ágar nutriente  
BSTFA – N,O-bis (trimetilsilil) trifluoracetamida  
CCT – Coleção de Culturas Tropical  
CGAR – *Candida guilliermondii* com ácido ricinoleico  
CGRM – *Candida guilliermondii* com ricinoleato de metila  
COAR – *Candida oleophila* com ácido ricinoleico  
CORM – *Candida oleophiola* com ricinoleato de metila  
DP – desvio padrão  
DPR – desvio padrão relativo  
FDA - Food and Drug Administration  
FEMA - Flavour and Extracts Manufacturing Association  
GDL – gamadecalactona  
GRAS - Generally Recognized as Safe  
IOFI - Organização Internacional da Indústria de Alimentos  
MA – Ministério da Agricultura  
ma – massa do ricinoleato de metila  
MBAR - meio de biotransformação com ácido ricinoleico  
MBRM – meio de biotransformação com ricinoleato de metila  
mp<sub>i</sub> – massa do padrão interno  
MSA - meio salino A  
MSB - meio salino B  
MS – Ministério da Saúde  
SIPA – Secretaria de Inspeção de Produtos Animais  
Slant – tubo inclinado  
TMS – tetrametilsilano  
UFC -unidades formadoras de colônia  
X(g/L) – concentração celular em gramas de biomassa por litro de meio  
YMA - meio de fermento-malte-ágar  
 $\mu_x$  – velocidade máxima específica de crescimento

## RESUMO

Os aromas produzidos por processos biotecnológicos são classificados como naturais e demandam um alto valor de mercado. Além disso, a biotransformação é um processo interessante devido à menor quantidade e custos dos reagentes utilizados; em relação aos processos sintéticos apresenta bons rendimentos, reações mais rápidas e em condições mais suaves; além das reações serem estereosseletivas.

Neste trabalho estudou-se a capacidade das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em biotransformar os substratos ácido ricinoleico e ricinoleato de metila à gamadecalactona.

Inicialmente, analisou-se o perfil do comportamento celular e cinético através da determinação da curva de crescimento celular e velocidade máxima específica das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em quatro meios de cultura: YMA (meio fermento-malte-ágar), MBAR (meio de biotransformação com ácido ricinoleico), MSA (meio salino "A"), MSB (meio salino "B"). Verificou-se que o meio YMA produz maior concentração celular e taxa de velocidade máxima específica de crescimento, além de um perfil de crescimento semelhante ao citado na literatura.

Monitorou-se o pH dos meios utilizados para crescimento celular e biotransformação e verificou-se que as oscilações ocorridas não alteraram o perfil do comportamento celular no decorrer dos ensaios.

Foram realizados também ensaios de biotransformação nos meios com os substratos ácido ricinoleico e ricinoleato de metila (MBAR e MBRM) para detecção por cromatografia gasosa da possível presença de gamadecalactona (GDL) utilizando as leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

De todas amostras submetidas à cromatografia gasosa, detectou-se a formação de pequena quantidade de gamadecalactona no meio que utilizou a levedura *Candida oleophila* com o substrato ácido ricinoleico.

## ABSTRACT

The flavors that are produced through biotechnological processes are classified as “natural” and demand a high market value. Furthermore, the biotransformation is an interesting process due to the less quantity and cost of reagents that are used, presents good results, faster reactions in milder conditions, apart from the fact that the reactions are stereoselective.

In this work it was studied the capacity of the yeasts *Candida oleophila* and *Candida guilliermondii* in biotrasforming the substrates ricinoleic acid and methyl ricinoleate into gamma-decalactone.

Firstly it was analyzed the profile of the cellular kinetic behavior through the determination of the curve of cellular growth and maximum specific velocity of the yeasts *Candida oleophila* and *Candida guilliermondii* in four different culture mediums: YMA (medium ferment-malt-agar), MBAR (biotransformation medium with ricinoleic acid), MSA (saline medium “A”), MSB (saline medium “B”) and it was verified that the medium YMA produces the higher cellular concentration and maximum specific growth velocity, apart from a growth profile which is similar to that mentioned in the literature.

The pH of the medium that was used for the cellular growth and biotransformation was monitored and it was verified that the oscillations that took place did not alter the profile of the cellular behavior during the essays.

Attempts for detection of gamma-decalactone by gas chromatography were tried when ricinoleic acid and methyl ricinoleate were the substrates biotransformed by the yeasts *Candida oleophila* and *Candida guilliermondii*. Of all the samples that were submitted, it was noticed the formation of a small quantity of gamma-decalactone in the medium with the yeast *Candida oleophila* and the substrate ricinoleic acid.



## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

Aromatizantes e/ou flavorizantes são substâncias químicas ou misturas possuidoras de propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferirem e/ou intensificarem o aroma e/ou o sabor dos alimentos. \*

Para a criação dos diversos sabores são utilizados de 2000 a 3000 componentes químicos. Um aroma completo pode conter entre 50 e 100 ingredientes separados, dos quais todos têm de ser naturais se o aromatizante for dito NATURAL. Numa composição em que 99% dos componentes são naturais e presentes no aroma no qual leva o nome e apenas 1% é artificial e não consta na relação de matérias-primas identificadas neste produto, este aroma é classificado como ARTIFICIAL.

Ultimamente tem-se constatado uma discriminação entre produtos derivados de fontes naturais em detrimento aos artificiais. Em função disto, existe uma classificação rigorosa quanto à procedência do aroma. Os aromas obtidos biotecnologicamente a partir de substratos naturais por ação de enzimas ou microrganismos são também classificados como naturais.<sup>1</sup>

Quanto ao aspecto legal, foi criado na década de 60 a IOFI – Organização Internacional da Indústria de Alimentos, responsável pela legislação sobre aromatizantes. Esta organização apóia entidades como: FDA – Food and Drug Administration e FEMA – Flavour and Extracts Manufacturing Association (EUA). Estas entidades determinam quais os aromatizantes que podem ser classificados como GRAS (Generally Recognized as Safe) que é usado para denotar segurança no que diz respeito ao seu uso. No Brasil os produtos aromatizantes são fiscalizados pelo Ministério da Saúde, SIPA (Secretaria de Inspeção de Produtos Animais) e Ministério da Agricultura.

---

\* Excluem-se desta definição os produtos que apresentam apenas sabor doce, ácido, amargo, salgado ou umami.

Nos últimos anos têm havido um aumento na demanda por produtos naturais incluindo aromatizantes naturais\*\* e estes demandam um preço mais alto de mercado. Muitos óleos de plantas e compostos aromatizantes puros isolados são atualmente apenas disponíveis a preços maiores que US\$ 5000/kg.<sup>2,3</sup>

A demanda crescente por aromatizantes naturais tem ocasionado uma diminuição na disponibilidade de vários recursos vegetais como a hortelã e algumas frutas aromatizantes como o aroma de morango.

Embora muitos processos biotecnológicos sejam capazes de produzir aromas interessantes, o número de aplicações industriais ainda é limitado. A razão disto, na maioria dos casos é o baixo rendimento. Estes aromas estão freqüentemente presentes em baixas concentrações nos caldos de fermentação, resultando em altos custos para o processo. Isto é compensado pelo fato que o preço de mercado dos aromas naturais é de 10 a 100 vezes maior do que dos aromas sintéticos. Para se tornar competitivo, o preço dos aromas de origem microbiana tem que variar entre 200 e 2000 US\$/kg<sup>4,5</sup>.

Outro problema que dificulta a obtenção biotecnológica de aromas em nível industrial é a alta volatividade e a baixa solubilidade em água de muitos aromas o que geralmente dificulta sua recuperação do meio de cultura. No entanto é necessário manter a concentração dos produtos no meio de biotransformação abaixo de certo nível por causa do efeito inibitório dos produtos e a toxicidade provocada sobre os próprios microrganismos. O desenvolvimento de técnicas específicas de fermentação e métodos de recuperação são importantes desafios para as pesquisas neste campo.

Muitas lactonas são moléculas interessantes para a indústria alimentícia devido a seu aroma de fruta.

Numerosos trabalhos descrevem a biossíntese de lactonas<sup>6,7,8</sup>. A produção microbiana destas lactonas suprem uma alternativa interessante para a síntese química, resultando numa molécula que pode ser considerada natural. No entanto, os mecanismos fundamentais envolvidos na formação desses componentes aromáticos ainda não são bem conhecidos.

---

\*\* Esta demanda alcança US\$ 7 bilhões/ano, o que representa 25% do total do mercado de aditivos alimentares.

A produção biotecnológica de lactonas envolve a biotransformação de hidroxiácidos naturais. Entre esses, o ácido ricinoleico é o mais abundante e facilmente disponível, porque representa quase 90% do ácido graxo constituinte do óleo de rícino. Dentre as leveduras utilizadas para a bioconversão encontram-se a *Candida oleophila* e a *Candida guilliermondii*.

Ácidos graxos são degradados pelo sistema de  $\beta$ -oxidação pelos peroxissomos e esse é o caso quando são convertidos em lactonas por leveduras. Okui (1963)<sup>7</sup> foi o primeiro a levar adiante essa hipótese sobre a produção de gamadecalactona por leveduras do gênero *Candida* a partir do ácido ricinoleico, após o isolamento de vários ácidos graxos intermediários derivados da eliminação seqüencial de duas unidades de carbono. Patentes a respeito da produção de lactona pela biotransformação de ácido graxo são baseadas também nesta capacidade dos microrganismos em efetuar a  $\beta$ -oxidação dos mesmos .

## 1.1 SÍNTESE ORGÂNICA POR BIOTRANSFORMAÇÃO

A variedade de fatores que envolvem as reações de síntese orgânica demanda, dependendo da rota, uma complexa cadeia de reações bioquímicas comparado ao repertório de reações orgânicas clássicas.<sup>9</sup>

Alternam-se assim, os conhecimentos de bioquímica, microbiologia e biotecnologia, que levam ao desenvolvimento de rotas alternativas para várias especialidades químicas partindo de fontes baratas de carbono, sais inorgânicos, enzimas específicas ou células inteiras. Com o aumento do interesse por produtos naturais, os processos biotecnológicos ganharam destaque por apresentarem algumas vantagens, como:

- a) os produtos serem classificados legalmente de substâncias naturais;
- b) a estereoquímica definida é garantida pelo substrato principal e reações específicas do biocatalisador;

c) reações em múltiplas etapas procedidas sob condições suaves.

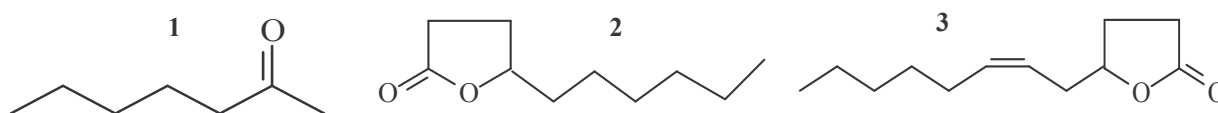
Existem 2 métodos principais que produzem compostos biologicamente importantes através da utilização de microrganismos:

#### a) Fermentação

A fermentação tem sido utilizada desde a antigüidade para a produção de alimentos e tornou-se uma tecnologia eficaz para a produção de ácidos orgânicos, antibióticos, aminoácidos e derivados dos ácidos nucleicos. Na fermentação, fontes baratas de carbono ou nitrogênio são usadas e o produto é gerado pelo complexo metabolismo do microrganismo. Ao passo que a fermentação requer fontes de carbono e nitrogênio, um substrato "útil" é necessário para a biotransformação. A catálise enzimática efetua uma transformação simples e específica na molécula de substrato. O substrato não tem que ser natural; substratos "não-naturais" podem ser biotransformados também<sup>10</sup>. Devido às vantagens esperadas, existe uma crescente atividade de pesquisa nesse campo, o qual tem resultado no desenvolvimento de métodos microbianos como alternativa aos processos químicos.

A alta organização dos microrganismos como as leveduras e os fungos filamentosos os tornam capazes de sintetizar compostos complexos, como por exemplo, a 2-heptanona, uma 2 alcanona componente do "blue cheese", que pode ser produzido por espécies de *Penicillium roquefortii* em cultura submersa num curto espaço de tempo.

Outro exemplo é a produção pela levedura *Sporobolomyces odorus* de gamadecalactona (GDL) e da *cis*-6-dodecen-4-olida, responsáveis por um odor de pêssego. Várias espécies de *Candida* ou fungos imperfeitos são usados em escala industrial para produzir gamadecalactona (GDL) do óleo de rícino e óleo de rícino hidrolisado. Na figura 1, encontram-se compostos produzidos por leveduras e fungos citados acima.



**Figura 1. Representação da 2-heptanona (1), da gamadecalactona (2) e da cis-6-dodecen-4-olida (3)**

### b) Biotransformação

Uma crítica abrangente sobre as possibilidades das conversões microbianas em química bio-orgânica tem sido discutida<sup>10</sup>. Os produtos de biotransformação são atrativos, entre outras aplicações, devido a sua atividade aromatizante e como precursores de aromas.

Reações dessa natureza são exemplos da conversão de aromas químicos facilmente disponíveis em produtos de alto valor agregado. Ao longo deste trabalho serão destacadas mais detalhadamente várias destas aplicações e reações que envolvem as biotransformações.

Podemos ver na Tabela 1, algumas vantagens e desvantagens das tecnologias citadas acima:

**Tabela 1. Propriedades gerais das fermentações e biotransformações<sup>9</sup>**

	<b>Biotransformação</b>	<b>Fermentação</b>
Microrganismos	Crescimento permanente ou células tratadas	Crescimento celular
Reação	Reação catalítica simples (uma ou múltiplas etapas)	Reação de cadeia complexa
Tempo de reação	Curto	Longo
Substrato	Específico (algumas vezes caro)	Fontes baratas de C e N
Produto	Natural ou não-natural	Natural
Concentração do produto	Alta	Baixa
Isolamento do produto	Simple	Trabalhosa

## 1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE BIOCATALISADORES

A decisão em adotar a biocatálise como metodologia para desenvolvimento de sínteses orgânicas perpassa por algumas questões importantes: Esta é uma alternativa atrativa para a maioria das conversões químicas comuns ? Quando e como usar a biocatálise ?

Quando o número de etapas de reação puder ser drasticamente reduzido através da introdução de biocatalisadores (microrganismos), existem grandes chances a favor da biocatálise<sup>11</sup>.

Algumas questões devem ser discutidas com relação ao uso dos biocatalisadores. Inicialmente devem ser consideradas sua viabilidade, pureza e custos dos reagentes e outros componentes do meio; o número de etapas envolvidas; seletividade e rendimento; condições de reação; facilidade na purificação do produto; qualidade do produto final e aspectos ligados ao meio ambiente. A experiência tem mostrado que a biocatálise é uma boa escolha quando a maioria desses pontos são extremamente positivos para a biocatálise.

Em seguida deve-se analisar a forma da biocatálise, isto é, com células inteiras, complexo de enzimas, enzimas isoladas entre outras, se livres ou imobilizadas. Viabilidade, preço e necessidade de cofatores são os principais pontos a serem analisados.

Outro ponto diz respeito ao meio da cultura reacional. Ele pode ser um meio aquoso convencional ou não convencional utilizando solventes orgânicos. O último pode ter vantagens com relação a solubilidade, impedimento produto/substrato, equilíbrio reacional e purificação do produto. A tabela 2 resume estas considerações.

Tabela 2. Considerações sobre o uso de biocatalisadores<sup>9</sup>

Nível	Consideração
Reação	Conversão Química x Biocatálise
Biocatalisador	Enzima isolada x célula inteira
Forma	Livre x Biocatalisador imobilizado
Meio	Água x solvente orgânico
Produto	Natural x sintético
Operação	Batelada x contínuo
Integração	Reações/Etapas processo/Processo completo

Neste contexto o conhecimento, a cinética do processo biotecnológico, a estabilidade e a forma do biocatalisador, conversão do substrato e concentração do produto, nos permitem tomar a decisão de quando e como usar os biocatalisadores.

### 1.3 A CINÉTICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO

A cinética das reações enzimáticas envolvidas nos processos biotecnológicos segue a Lei de Michaelis e Menten<sup>12</sup> e apresenta os seguintes objetivos:

- a) medir as velocidades das transformações que se processam;
- b) estudar a influência de condições de trabalho (como, por exemplo, concentrações dos reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e de inibidores) naquelas velocidades;
- c) correlacionar (quer por meio de equações empíricas, quer por meio de modelos matemáticos) as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;

- d) colaborar na otimização do processo considerado;
- e) estabelecer critérios para o controle do processo.

O estudo cinético de um processo de biotransformação consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de biotransformação<sup>13</sup>. Entende-se como componentes, o microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura.

Tais valores experimentais de concentração celular ou biomassa (X), de produto (P) e de substrato (S), quando representados em função do tempo, permitirão o traçado das curvas de crescimento e dos parâmetros de transformação, que definem as velocidades instantâneas de crescimento ou reprodução do microrganismo, consumo de substrato e formação de produto.

É necessário que se conheçam os valores intermediários que permitam definir os perfis das curvas ou a forma matemática delas, para uma análise adequada do fenômeno sob o ponto de vista cinético.

Este é um evento clássico, no qual as diferentes fases não apresentam sempre o mesmo comportamento, conforme resumido abaixo:

1. fase lag ou latência: velocidade de crescimento nula;
2. fase de aceleração (ou transição): velocidade de crescimento aumenta;
3. fase exponencial ou logarítmica: velocidade de crescimento constante;
4. fase de desaceleração: velocidade de crescimento diminui;
5. fase estacionária: velocidade de crescimento nula;
6. fase de declínio ou lise: velocidade de crescimento negativa.

A atividade metabólica das células bacterianas modificam a composição do meio no qual elas crescem. Dependendo das condições iniciais e das propriedades das linhagens, uma, nenhuma ou diversas transformações



poderão eventualmente resultar num decréscimo da velocidade de crescimento, antecipando o final da fase exponencial. Os fatores mais comumente encontrados para serem limitantes podem, como uma regra, ser classificados em um dos seguintes grupos:

- a) exaustão dos nutrientes;
- b) acúmulo de produtos metabólicos tóxicos;
- c) transformações do equilíbrio iônico, especialmente pH.

Convém frisar, que os critérios de comparação entre diferentes condições de cultivo são relativos, isto é, dependem do que se espera obter de um determinado processo de biotransformação. O mesmo pode ser afirmado quando se comparam os desempenhos de cultivos sob diferentes temperaturas, pHs, diferentes variedades de uma dada espécie de microrganismos, diferentes composições de meio, etc.

Somado a isso, deve-se ressaltar que o microrganismo promove a transformação dos componentes do meio em produtos, graças às atividades de milhares de enzimas que, por sua vez, são sintetizadas pelo próprio microrganismo.

Essa dificuldade ocorre em vários tipos de sistemas, inclusive naqueles em que o substrato a ser transformado pelo microrganismo for parcialmente insolúvel no meio aquoso. Por isso, será necessário avaliar a área da interface do substrato insolúvel com o meio aquoso, bem como a sua variação, à medida que o microrganismo promove a degradação do mesmo. Trata-se de um dos aspectos sobre os quais existem muitas dúvidas a serem resolvidas, apesar de alguns métodos até agora propostos<sup>12</sup>.

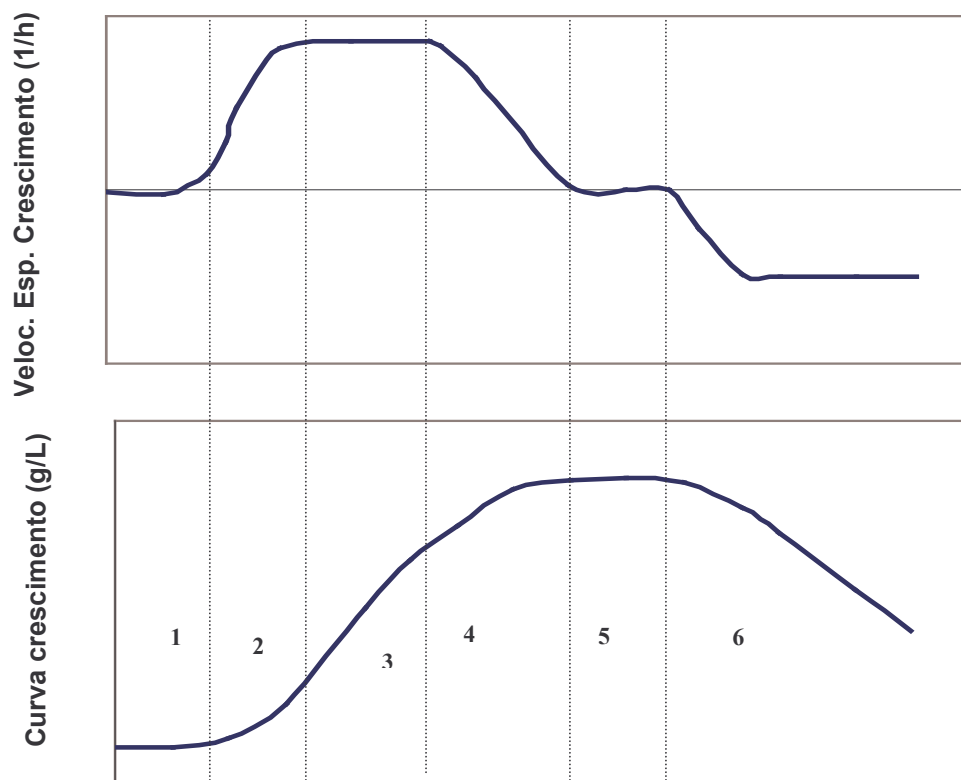
### **1.3.1 A Curva de Crescimento Microbiano**

Após a inoculação do microrganismo em estudo em um meio de cultura favorável ao seu desenvolvimento, sob temperatura controlada e agitação adequada, observam-se diferentes comportamentos nos valores da concentração celular em função do comportamento do microrganismo.

Considera-se como crescimento, o aumento de massa celular resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes do protoplasma. Assim, aumentos de tamanho decorrentes de fenômenos como absorção de água ou acúmulo de material de reserva não podem ser considerados como crescimento.

Numa cultura descontínua<sup>14</sup> na qual o meio de cultura não é renovado a partir do momento em que o meio é inoculado, as condições começam a variar de forma progressiva. A quantidade de nutrientes começa a diminuir e os produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando cada vez mais.

Essas modificações têm uma considerável influência sobre o crescimento dos microrganismos. Construindo-se um gráfico global do crescimento microbiano e da velocidade específica em cultura descontínua em meio líquido, observa-se que a curva representativa desse crescimento apresenta várias fases, conforme figura 2, a saber:



**Figura 2. Curva de crescimento celular (g/L) e velocidade específica de crescimento microbiano -  $\mu_x$  ( $h^{-1}$ ) - em cultura descontínua\*\*\*)**

\*\*\* As linhas pontilhadas verticais marcam os limites das fases de crescimento

Com base na figura 2, apresenta-se as seguintes fases da curva de crescimento:

### 1) Fase de latência ( lag)

Ela segue imediatamente a semeadura do microrganismo no meio de cultura. Trata-se de um período de adaptação, em cujo decorrer a célula sintetiza as enzimas que lhe são necessárias para metabolizar o substrato presente. Nesta fase não ocorre reprodução celular. Então.:  $X = \text{constante} = X_0$ .

$X_0$  é a concentração celular no tempo  $t=0$ . A velocidade de crescimento (g/L.h) é nula:  $dX / dt = 0$ . A velocidade específica de crescimento, com taxa de crescimento ( $h^{-1}$ ) é nula:  $dX / dt \cdot 1/X = \mu = 0$ .

A duração desta fase varia, principalmente com o tamanho do inóculo que serviu para a semeadura, com a idade das células que contém e também com seu estado bioquímico. Se as células forem procedentes de um meio de cultura de composição diferente do meio de crescimento, a adaptação enzimática (fenômeno de indução) pode levar tempo. Em contrapartida, se as células introduzidas são provenientes de um meio com a mesma composição, o fator que mais conta é a idade celular.

### 2) Fase inicial de crescimento

Esta fase é marcada pelo início do crescimento celular propriamente dito: o começo da reprodução celular. A concentração celular ( $X$  (g/L)) aumenta no começo lentamente, depois mais depressa. A velocidade de reprodução aumenta,  $dX/dT$  também, bem como a velocidade específica de crescimento.

### 3) Fase logarítmica ou exponencial de crescimento

Quando a velocidade de reprodução celular atingiu seu máximo, é a fase logarítmica ou exponencial que começa e vai durar enquanto a velocidade de reprodução for constante. Pode ser avaliada simplesmente pelo tempo de duplicação da população microbiana que ao longo de toda essa fase, atinge seu valor máximo. Este valor varia de um microrganismo para outro, em função

das condições (meio de cultura, temperatura, oxigênio etc.) Nas leveduras, o tempo de geração mínimo está compreendido entre 1h e 30 min e 2,0 h.

Durante essa fase, a velocidade de crescimento  $dX/dt$  aumenta, e isso proporcionalmente a  $X$ . Daí a distribuição logarítmica ou exponencial. No decorrer dessa fase, a composição celular é constante, e ao menos que a composição do meio de cultura varie muito, permitindo as sínteses celulares, a taxa de crescimento continua constante.

#### **4) Fase de diminuição do ritmo de crescimento**

Quando a curva traçada apresenta um ponto de inflexão, isso corresponde do ponto de vista bioquímico, ao esgotamento do meio de cultura devido ao desaparecimento de um ou de vários compostos necessários ao crescimento e em alguns casos ao acúmulo de produtos inibidores resultantes do metabolismo microbiano.  $X$  continua a aumentar, mas após o ponto de inflexão,  $dX/dt$  diminui e a velocidade específica também.

#### **5) Fase estacionária**

A concentração celular atinge seu nível máximo. O crescimento cessa. As células conservam uma atividade metabólica e a parada de crescimento acarreta modificações da estrutura bioquímica da célula.

#### **6) Fase de declínio**

**O número de células viáveis diminui devido ao aumento progressivo da taxa de mortalidade. Paralelamente, a concentração em biomassa decresce, devido à autólise sob a ação das enzimas das próprias células.**

**A atividade bioquímica da célula é consideravelmente modificada sob o controle de mecanismos de regulação específicos.**

**A produtividade (gramas de biomassa produzidos por litro de meio e por hora) é frequentemente o critério usado para a avaliação de um processo de fermentação.**

### 1.3.2 Fatores que Influenciam o Crescimento Celular

Os fatores que influenciam o crescimento celular são<sup>16</sup>:

#### a) Temperatura

Para todos os microrganismos existem três temperaturas principais: (a) temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento; (b) temperatura máxima, acima da qual não há crescimento e (c) temperatura ótima, onde o crescimento é máximo. De acordo com essa temperatura, os microrganismos podem ser classificados em três grandes grupos:

- I) termófilos, cujo ótimo se localiza em torno de 60° C;
- II) criófilos, cujo ótimo se localiza em torno de 10°C; e
- III) mesófilos, cujo ótimo está entre 20 e 40°C.

#### b) pH

Como a temperatura, existe sempre um valor de pH ótimo, máximo e mínimo. A maioria dos microrganismos tem seu ótimo em torno da neutralidade. Muitos processos fermentativos, entretanto, são executados por microrganismos, que se desenvolvem melhor em valores de pH ácido em torno de 5,0. Raros são capazes de desenvolver sua atividade em limites extremos.

#### c) Oxigênio

O efeito da variação na quantidade disponível de oxigênio se faz sentir no crescimento de microrganismos aeróbios, para os quais é indispensável, e no de facultativos que podem crescer também na ausência de O<sub>2</sub>. No primeiro caso, o efeito se traduz no maior ou menor rendimento da cultura, enquanto que, no segundo, além da diferença no rendimento, há diferenças sensíveis na velocidade do crescimento e nos produtos da atividade do microrganismo.

Isso ocorre por várias razões. Primeiro porque o metabolismo aeróbio é muito mais eficiente, fornecendo uma quantidade muito maior de energia, que tem como consequência um crescimento mais rápido. Segundo porque a via aeróbia tem geralmente como produtos finais do metabolismo  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

Quando se deseja obter grandes massas de microrganismos, o processo usual consiste em se promover uma aeração vigorosa da cultura, quer por borbulhamento de ar, quer por agitação, ou ambos simultaneamente.

#### **d) Agitação**

Uma das consequências da agitação é promover uma melhor aeração do meio, favorecendo o crescimento de aeróbios e facultativos. Além disso, a agitação promove uma homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e uma dispersão dos produtos metabólicos, o que também favorece o crescimento de maneira apreciável, inclusive de microrganismos anaeróbios.

### **1.4 CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS DE CULTURA E MICRORGANISMOS PARA BIOTRANSFORMAÇÃO**

O sucesso de um bioprocessos, como a biotransformação, depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: o microrganismo utilizado, o meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação do produto<sup>17</sup>.

Quanto à aquisição do microrganismo, a compra em coleções de cultura é bastante viável, tendo em vista a existência de muitas coleções de culturas em vários países. Nesse sentido, já são conhecidas<sup>18</sup> onze coleções de culturas em vários países, incluindo a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” (Campinas – SP; <http://www.cct.org.br>), de onde foram adquiridas as linhagens deste trabalho.

Algumas características gerais de microrganismos e meios de cultura são de suma importância para que se estabeleça o processo de biotransformação, pois o desempenho de um dado microrganismo depende

muito da composição do meio de cultura em que é colocado. São características gerais:

- a) Quanto ao microrganismo: apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto; permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado; não exigir condições de processo muito complexas; não exigir meios de cultura dispendiosos e permitir a rápida liberação do produto para o meio.
- b) Quanto ao meio de cultura: ser o mais barato possível; atender às necessidades nutricionais do microrganismo; auxiliar no controle do processo (por exemplo ter ação tamponante ou evitar formação de espuma); não provocar problemas na recuperação do produto e ter composição razoavelmente fixa.

Em vista disso, ao se executar um processo de biotransformação, prepara-se um certo meio de cultura que seja adequado<sup>14</sup> à nutrição e ao desenvolvimento do microrganismo, bem como o acúmulo do produto desejado e inocula-se o meio de cultura com a cepa selecionada. Esta descrição se refere a uma das formas de condução de um processo fermentativo e que foi utilizado neste trabalho: o processo descontínuo ou em batelada.

Neste processo, no instante inicial da biotransformação, o caldo nutriente é inoculado com microrganismos e no decorrer do processo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos (na forma de ar), antiespumante e ácido ou base para controle do pH (quando necessário).

Este processo pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da biotransformação exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam<sup>19</sup>. Por outro lado, apresenta menores riscos de contaminação (se comparado com processos contínuos); grande flexibilidade de operação; condição de controle mais estreito da estabilidade genética do

microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto, o que é vital para a indústria farmacêutica.

Além disso é o mais utilizado na indústria de alimentos. Alguns dos alimentos e bebidas produzidos por esse processo fermentativo são iogurte, chucrute, picles, cerveja, vinho, entre outros.

### 1.5 APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

A possibilidade do uso de microrganismos para bioconversões regio e estereoespecíficas são importantes para a resolução de isômeros óticos<sup>20</sup>.

Enquanto compostos quirais de síntese química ocorrem freqüentemente como racematos, aqueles de origem biológica podem ocorrer também em uma forma enantiomérica pura<sup>21</sup> ou em várias proporções R/S, como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3. Composição enantiomérica de gamadecalactona (GDL) isolada de frutas**

	Fonte	Composição enantiomérica	
		%(S)	%(R)
GDL	Pêssego	11	89
	Abricó	6	94
	Nectarina	10	90
	Morangos	<21	>98

Por exemplo,  $\gamma$ -lactonas são sempre encontradas com excesso enantiomérico (R) em frutas. A respeito das  $\delta$ -lactonas, as proporções de cada enantiômero variam de acordo com a natureza dos produtos, por exemplo,  $\delta$ -octalactona ( $C_8H_{14}O_2$ ) está presente em grande excesso enantiomérico (e.e) do enantiômero S na manteiga e na nata e em grande e.e. do enantiômero R no



côco. Mosandl e Günther<sup>22</sup> avaliaram as características sensoriais de  $\gamma$ -lactonas saturadas opticamente puras e encontraram que os (R) enantiômeros foram responsáveis pelo agradável aroma de fruta. Em outra ocasião a  $\gamma$ -lactona, (6Z)-gamadodecenolactona (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>) foi encontrada numa fração volátil da cultura da *Fusarium poae* INRA 45 na forma R quase pura (maior que 99%) enquanto  $\gamma$ -decalactona ocorreu na proporção próxima de 50/50, após 4 dias de cultura<sup>23</sup>.

Um estudo realizado por Latrasse<sup>21</sup> determinou as variações das proporções R/S de lactonas formadas pelo fungo filamentoso *Fusarium poae* INRA 45 crescido em dois meios líquidos diferentes. Foram investigados dois meios de crescimento para ver se suas composições poderiam influenciar as proporções enantioméricas.

As circunstâncias, em que tanta a pureza ótica como a configuração absoluta, podem variar para lactonas idênticas isoladas de diferentes fontes, confirma a idéia da presença de diferentes caminhos biossintéticos, envolvendo tanto os processos anabólicos como os catabólicos do metabolismo celular.

Neste contexto, tem sido estudada<sup>25</sup> a habilidade de variedades de microrganismos degradarem hidroxiácidos naturais e estruturas sintéticas análogas a  $\gamma$  e  $\delta$ -lactonas, com ênfase nos aspectos estereoquímicos dos processos. Isto é devido a importância da relação entre a configuração absoluta e a resposta sensorial de compostos aromatizantes.

## 1.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS

De todos os compostos aromatizantes disponíveis, 84% são produzidos por síntese química<sup>26</sup>. Embora haja um tanto de exagero, gêneros alimentícios contendo aromas sintéticos são frequentemente evitados porque suspeita-se que o consumo desses compostos sejam tóxicos ou prejudiciais para a saúde.

Além disso, como já foi citado no item 1, a demanda crescente por aromatizantes naturais tem conduzido a uma deficiência de vários recursos

vegetais. Outra desvantagem das plantas como origem de flavorizantes é a forte dependência de fatores climáticos e o risco de doença de várias plantas.

Por um longo tempo as plantas foram a única fonte de compostos aromatizantes e muitos flavorizantes foram isolados de todas as espécies de óleos de essências.

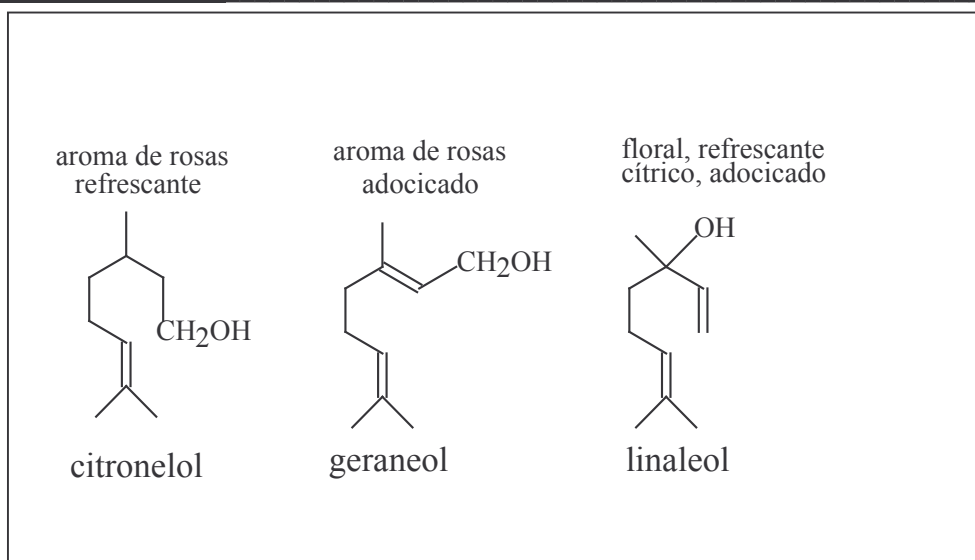
Porém, componentes sensorialmente ativos estão presentes apenas em pequenas quantidades ou de forma combinada e isto frequentemente dificulta seu isolamento. Uma interferência no metabolismo de plantas com vistas a incrementar a produção de compostos flavorizantes ainda não é possível devido a falta de conhecimento dos mecanismos biossintéticos.

Assim sendo, uma possível alternativa para a produção de compostos flavorizantes são os métodos biotecnológicos e o uso da biocatálise para sua síntese. Sabe-se que alguns microrganismos podem gerar odores agradáveis.

Partindo de substratos específicos, diferentes reações como as oxidações, reduções, hidrólises, desidratações, formação de novas ligações carbono-carbono e várias reações de degradação podem ser realizadas por microrganismos com intenção de produzir aromatizantes<sup>27</sup> de diferentes classes de compostos orgânicos.

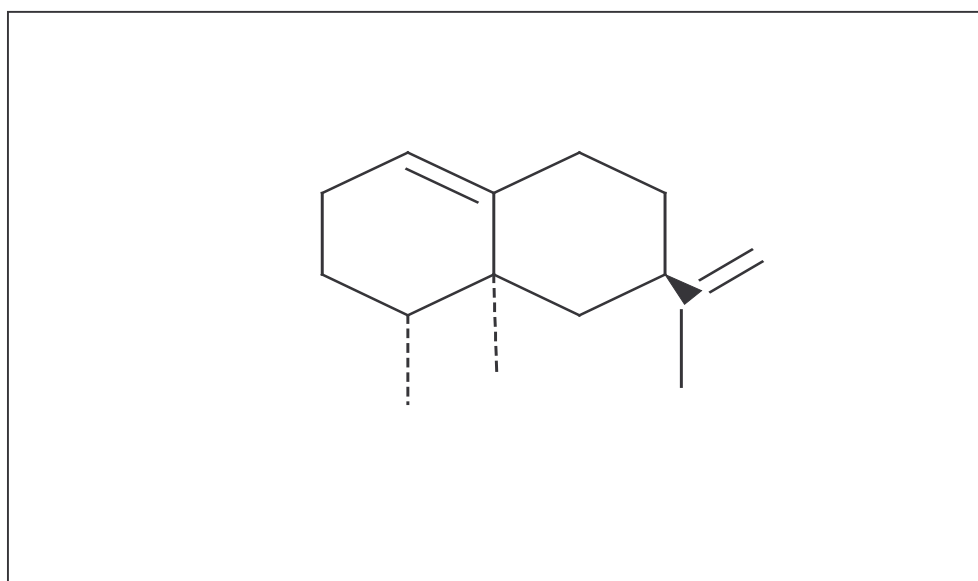
Os terpenos são compostos importantes, responsáveis pelo odor característico dos óleos essenciais<sup>26</sup>. Existem quantidades significativas de mono e sesquiterpenos. Hoje aceita-se que certos fungos superiores encontrados em algumas plantas, embora desprovidos de organelas de armazenagem, são capazes de produzir uma série desses compostos voláteis. Os fungos produtores de terpenos mais estudados incluem espécies de ascomicetos do gênero *Ceratocystis*.

Na figura 3, encontram-se alguns exemplos de importantes terpenos produzidos pelo fungo *Ceratocystis sp*, assim como suas características sensoriais<sup>28</sup>.



**Figura 3. Terpenos produzidos por *Ceratocystis sp.***

Vários microrganismos são capazes de quebrar (ou degradar) terpenos ou realizar conversões específicas, criando produtos com um valor adicional. Um bom exemplo, como o mostrado na figura 4, é o sesquiterpeno valenceno ( $C_{15}H_{24}$ ), um componente relativamente barato do óleo de laranja, que pode ser convertido através de ação bacteriana a um sesquiterpeno mais caro, que é um importante composto aromático da grapefruit<sup>29</sup>. Esta capacidade dos microrganismos para converter terpenos é facilmente compreendida levando-se em conta que a cada ano aproximadamente  $1,75 \times 10^8$  t de terpenos são produzidos, principalmente nas florestas<sup>30</sup>.

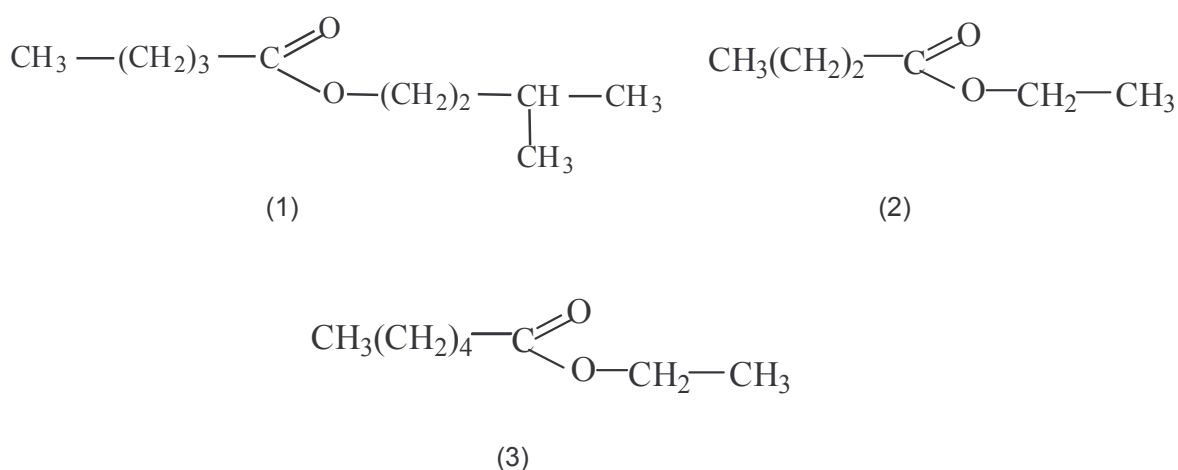


**Figura 4 . Representação do valenceno ( 5,6 dimetil-8-isopropenilbiciclo [4,4,0]-1 deceno)**

Ésteres são outro importante grupo de aromatizantes que estão presentes em frutas, nas quais se apresentam em concentrações bem baixas: a maioria entre 1 e 100 ppm.

Omelianski<sup>31</sup> estudou alguns microrganismos que eram capazes de gerar um aroma de maçã, provavelmente devido a formação do valerato de isopentila.

A formação de aromas na pasteurização do leite e do queijo, ocorre devido a produção de butirato de etila e hexanoato de etila por alguma bactéria do ácido láctico e espécies de *Pseudomonas* presentes. Na figura 5 estão representados os ésteres citados acima.



**Figura 5. Representação dos ésteres: valerato de isopentila (1), butirato de etila (2) e hexanoato de etila (3)**

As lactonas, outra importante classe de ésteres cíclicos, estão associadas aos odores de frutas, manteiga, doces, nozes e côco e será assunto do próximo item.

### 1.6.1 Produção de Lactonas por Microrganismos

Lactonas são ésteres cíclicos derivados da esterificação intramolecular entre os grupos hidroxil e carboxila de um hidroxilácido. Dois aromas principais

de lactona (isto é, 4-e 5- alcanolidas) comumente conhecidos como gama e delta-lactonas podem ser distinguidos de acordo com a posição do grupo hidroxil do ácido. Existem as duas formas enantioméricas (R e S), com a forma R ocorrendo em excesso em lactonas naturais<sup>32</sup>.

Com relação aos aspectos químicos, a posição do grupo hidroxil determina a posição da lactona ( $\gamma$  ou  $\delta$ ) a ser produzida, sejam quais forem as insaturações da cadeia carbônica: ácidos graxos com um grupo hidroxil na posição 10 ou 12 são convertidos a gama-lactonas, enquanto ácidos com grupos hidroxil na posição 11 ou 13 conduzem a delta-lactonas<sup>33,34</sup>.

Numerosos processos de biotransformação de ácidos graxos a lactonas são objetos de patentes e produção industrial por companhias envolvidas no campo dos aromas. Os microrganismos mencionados nas patentes são essencialmente leveduras e freqüentemente incluem os gêneros *Candida* e *Pichia*. Os precursores são normalmente hidroxilácidos como ácidos graxos livres ou como os triglicérides

As lactonas são de especial interesse para a química de aromatizantes por diversas razões<sup>35</sup>.

Primeiro por que possuem fortes, agradáveis e variadas propriedades sensoriais que as tornam muito difundidas na indústria de aromas.

Segundo, porque sua origem biológica tem sido muito estudada, principalmente devido as intensivas pesquisas realizadas com relação a sua ocorrência em produtos lácteos.

E terceiro, em decorrência do citado acima, existe um renovado interesse na síntese de compostos associados à ela para aplicação em aromas.

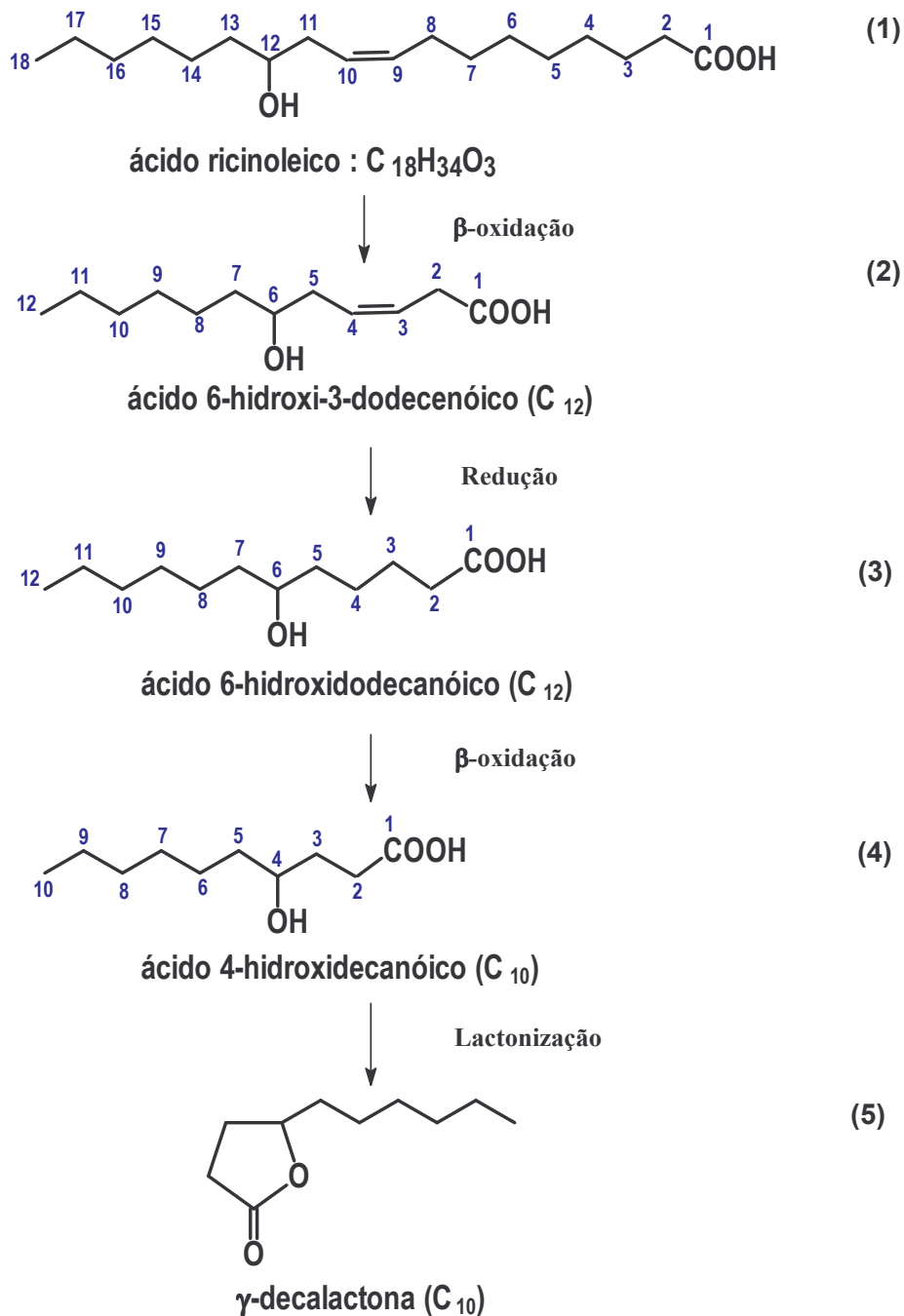
Só para justificar esse interesse, sabe-se que a gamadecalactona sintética, que é o componente chave, dentre outros, dos aromas de pêssego e abricó<sup>10</sup> e produto de interesse dessa pesquisa, custa em torno de US\$ 150/kg, enquanto a mesma substância tem um valor de US\$ 6000/kg, se for extraída de um recurso natural.

Pode ser produzida por fermentação do óleo de rícino, oriundo das sementes do *Ricinus communis*, conhecido popularmente no Brasil como

mamoneiro. O ácido ricinoleico insaturado e hidroxilado proveniente do óleo rícino é um bom precursor. Um grande número de leveduras como a *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*<sup>8,36,37</sup> realizam esta biotransformação e produzem gamadecalactona (GDL) com bons rendimentos.

Okui (1963) relatou a bioconversão do ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico – C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>), o principal ácido graxo do óleo de rícino em gamadecalactona por linhagens de *Candida*<sup>7</sup>.

Neste processo o ácido ricinoleico é o primeiro a ser liberado pela ação da lipase. Ele passa por quatro ciclos de β-oxidação o qual reduz um composto de 18 carbonos, o ácido ricinoleico a um composto de 10 carbonos, o ácido 4-hidroxi-decanóico. Neste estágio, a β-oxidação da levedura é em grande parte impedida pela proximidade do grupo hidroxila a carboxila final. A gamadecalactona (GDL) pode então ser formada pela lactonização do ácido hidroxi-decanóico pelo aquecimento a pH ácido, conforme ilustra o esquema 1 abaixo:



Esquema 1. Etapas da produção de gamadecalactona através da oxidação degradativa do ácido ricinoleico por linhagens do genero *Candida*

A literatura cita também a produção de gamadecalactona (GDL) pela degradação do éster metílico do ácido ricinoleico utilizando leveduras do gênero *Candida* na forma livre ou imobilizada (*Candida famata*, *C. intermedia*, *C. molischiana*, *C. rhagii*, *C. succiphila* e *Pichia guilliermondii*)<sup>8,38</sup>.

Várias outras leveduras são citadas na literatura para conversão de ácido ricinoleico a gamadecalactona (GDL), como a bioconversão pela *Yarrowia lipolytica*<sup>20</sup> (rendimento 6 g/L), *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces odorus*<sup>36</sup> (rendimento de 8,3 a 20%), sendo que neste caso os rendimentos de gamadecalactona (GDL) foram inversamente proporcionais à concentração de óleo de rícino presente no meio, indicando que o substrato provocou a sua inibição.

Finalmente, pode-se questionar porque alguns microrganismos são capazes de sintetizar lactonas como metabólitos secundários, os quais são desnecessários para o desenvolvimento celular e acumuladas durante a fase de crescimento estacionário<sup>2</sup>.

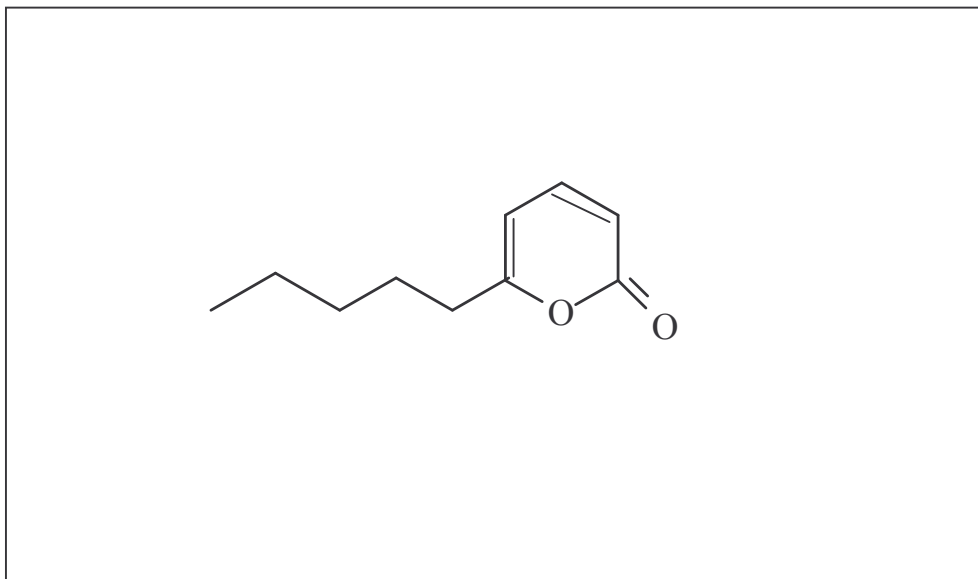
A formação de lactonas parece, como aquelas de muitos outros compostos aromáticos ( metil-cetonas, álcoois secundários, ácidos graxos livres) estar relacionada com o mecanismo dos lipídeos.

Os aminoácidos podem ser a origem da formação da lactona no vinho, cerveja e sakê, mas a maioria das freqüentes rotas de síntese envolvem intermediários do metabolismo de um lipídeo por causa da similaridade das lactonas com as estruturas dos ácidos graxos. Assim, o ácido linoleico poderia ser a origem do  $\delta$  - pentil-alfa-pirona ( mostrada na figura 6), a qual é sintetizada por um fungo do gênero *Trichoderma*<sup>26</sup>. Tressi<sup>39</sup> relatou a produção de lactona pela *Sporobolomyces odorus* durante a fase estacionária de crescimento e um simultâneo decréscimo na longa cadeia de ácidos graxos.

Poucos estudos têm sido dedicados aos meios metabólicos envolvidos na formação de lactonas cíclicas insaturadas de ácidos graxos. Alguns ácidos graxos de cadeia longa (ácidos oleico, linoleico, ricinoleico) podem ser transformados em  $\delta$  - pentil-alfa-pirona pela linhagem *Trichoderma*. A formação de um grupo hidroxil no carbono-13 parece estar envolvida na biotransformação do ácido ricinoleico<sup>40</sup>.



Assim, a produção de lactona por biotransformação microbiana de ácidos graxos pode ser comercialmente viável, porém os caminhos metabólicos demandam ainda muita pesquisa para serem completamente elucidados.



**Figura 6. Representação da molécula  $\delta$  - pentil-alfa-pirona , sintetizada por fungo do gênero *Trichoderma***

## CAPÍTULO II

### 2 JUSTIFICATIVA

A demanda crescente por aromatizantes naturais tem conduzido a uma deficiência de vários recursos vegetais como a hortelã e algumas frutas aromatizantes e este panorama justifica o uso de processos biotecnológicos para a produção desses aromas.

Um dos maiores desafios da biocatálise atualmente é encontrar precursores naturais para obter aromas também naturais, visto que há uma crescente preferência para o consumo de aditivos “NATURAIS” alimentares. Os alimentos industrializados são projetados para serem mais balanceados e digestivos, sem prejuízo do sabor. Porém algumas técnicas de processamento modificam as características aromáticas de certos alimentos sendo imprescindível o uso de aromatizantes objetivando a reconstituição do aroma em sua plenitude.

Atualmente a “família” das lactonas produzidas biotecnologicamente são representadas principalmente pela gamadecalactona (GDL) e em menor número pela gamadodecalactona e gamaoctalactona<sup>6</sup> como mostra a figura 7.

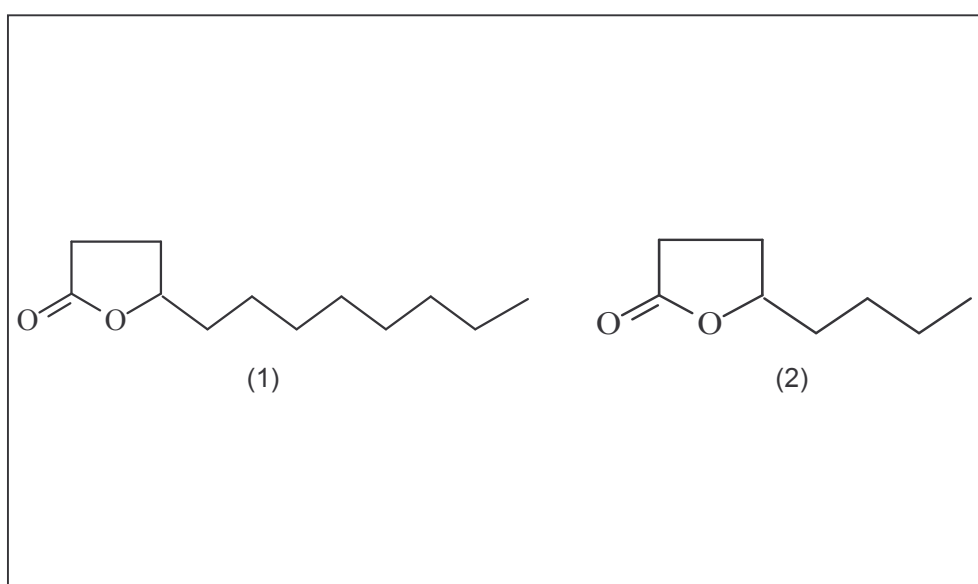


Figura 7. Representação da gamadodecalactona (1) e da gamaoctalactona (2)

Os motivos pelos quais optou-se pelo desenvolvimento da biotransformação à gamadecalactona (GDL) são seu alto valor de mercado, sua classificação como natural e seu baixo custo de produção (matéria prima abundante e barata).

O óleo de rícino é obtido da prensagem de sementes de mamona que possui 50% de óleo e estes por sua vez possuem de 80 a 90% de ácido ricinoleico, sendo proveniente de áreas tropical e subtropical. O Brasil é um dos maiores produtores de óleo de rícino, extraído da planta da família das euforbiáceas (*Ricinus communis*), conhecida popularmente como mamoneira.

A escolha dos substratos (ácido ricinoleico e ricinoleato de metila) levou em consideração alguns aspectos como a fácil disponibilidade, o baixo valor de custo e alto potencial de rendimentos, e a biodisponibilidade do substrato.

Embora a literatura cite muitos exemplos da obtenção da gamadecalactona (GDL) a partir da bioconversão do ácido ricinoleico por diferentes espécies de levedura, ainda representa um atrativo campo de pesquisa pois a obtenção deste aroma depende de muitos fatores que ainda faltam ser explorados como: variações na composição do meio de cultura ; estudo do comportamento cinético de diferentes linhagens de levedura e sua capacidade em degradar o substrato; extensão da incubação; acidificação do meio de cultura pelas leveduras; acúmulo de ácidos graxos no interior das células, diminuindo sua disponibilidade no meio de cultura; conhecimento do mecanismo da  $\beta$ -oxidação peroxissomal, entre outros.

Segundo esse perfil, adquiriu-se as linhagens da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” – Campinas – SP que foram isoladas no Brasil de fontes naturais que possuem os peroxissomos e são responsáveis pelos processos de biotransformação à gamadecalactona (GDL).

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo Geral

Detectar a presença da gamadecalactona pela biotransformação do ácido ricinoleico e do ricinoleato de metila na presença das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a curva de crescimento celular das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em quatro diferentes meios de cultura.

2. Identificar qual o meio de crescimento que as leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* melhor se adaptam.

3. Determinar o perfil da velocidade específica de crescimento para as linhagens *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* nos diferentes meios de crescimento visando determinar a curva de crescimento celular das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em quatro diferentes meios de cultura.

4. Estudar a capacidade das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* para converter ácido ricinoleico e ricinoleato de metila em ácido 4-hidroxidecanóico que é um precursor da gamadecalactona (GDL).

5. Detectar por cromatografia gasosa a produção de gamadecalactona (GDL) através da biotransformação do ácido ricinoleico e ricinoleato de metila pelas leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

## CAPÍTULO III

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão descritos os materiais, reagentes, meios de cultura, instrumentos e os métodos químicos e microbiológicos.

Inicialmente serão descritos os materiais e reagentes utilizados durante as sínteses, ensaios e análises realizados.

Em seguida serão caracterizados os meios específicos para cultivar os microrganismos ordenados de acordo com suas finalidades e os instrumentos utilizados para a realização dos ensaios e análises necessárias.

Na etapa seguinte são descritas as metodologias relativas à abertura das ampolas com as cepas *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*; reativação das células liofilizadas; preparo dos inóculos para os ensaios de crescimento celular e preparo dos inóculos para os ensaios de biotransformação, em meio contendo ácido ricinoleico (MBAR) e ricinoleato de metila (MBRM).

Finalmente, descrever-se-á a metodologia para os tratamentos analíticos das amostras provenientes do meio de biotransformação; as determinações microbiológicas; os procedimentos de análise das amostras por cromatografia gasosa; a preparação das soluções padrão de gamadecalactona (GDL) e ricinoleato de metila, a otimização das condições cromatográficas e preparação do padrão interno (estearato de metila).

### 3.1 MATERIAIS, MEIOS DE CULTURA E INSTRUMENTAÇÃO

#### 3.1.1 Materiais e Reagentes

Foram utilizadas cepas das leveduras *Candida oleophila* CCT 3604 e *Candida guilliermondii* CCT 2625 fornecidas pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” – Campinas – SP.

O nome da linhagem é seguido pelo nome do autor, sigla da coleção, procedência, equivalência em outras coleções e forma de apresentação.

As primeiras são originárias do fruto da *Eugenia sp.* encontrada na floresta da Mata Atlântica em Peruibe-SP e isoladas nos laboratórios da Fundação André Tosello. Veio acompanhada das seguintes especificações:

##### **Candida oleophila**

CCT 3604 – Prada, G.M.M. Fruit of *Eugenia sp.* (Atlantic forest). Peruibe – SP, Brasil. Medium YMA; 28C-LY.

As especificações para a segunda linhagem são as seguintes:

##### **Candida guilliermondii**

(Castellani) Langeron & Guerra

syn. syn. *Candida kestonii* (Scarr & Rose) Meyer & Yarrow

alt. *Pichia guilliermondii* Wickerham

CCT 2625 – DSM 70051 – S. Windisch, Ca – 0801 – Albanus

Strain Soor W. Production of riboflavin, medium YMA; 28C-LY.

Essas cepas foram selecionadas pela facilidade de obtenção na natureza e pela similaridade de comportamento apresentada pelas cepas utilizadas na bibliografia de referência.

A gamadecalactona (GDL) foi adquirida da empresa Duas Rodas S.A. - Jaraguá do Sul (SC) e utilizada como padrão de referência para a detecção no meio de biotransformação.

O reagente ricinoleato de metila utilizado como substrato para biotransformação com as leveduras citadas foi sintetizado de acordo com método adaptado de Endrizzi<sup>8</sup>.

O ácido ricinoleico foi adquirido da empresa Fluka Chemika.

Os demais reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação.

### **3.1.2 Meios de Cultura e Soluções**

Os meios específicos para cultivar os microrganismos são constituídos por substâncias que satisfazem as necessidades nutricionais dos mesmos. Quando for necessário que o meio se mantenha sólido, acrescenta-se o ágar extraído de algas.

Tanto os meios utilizados para o crescimento celular como aqueles utilizados para a biotransformação foram selecionados após testes preliminares de rendimento e eficiência durante o processo.

Os meios de cultura empregados neste trabalho estão ordenados de acordo com suas finalidades, e descritos a seguir:

#### **a) Meio para preparo e conservação das cepas**

Meio YMA (fermento-malte- ágar): extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; bacto-peptona 5,0 g/L; glicose 10,0 g/L; ágar 20,0 g/L.

Ferveu-se os ingredientes em água destilada até dissolução completa e utilizada sem filtração. A solução foi submetida a temperatura de 121°C em autoclave por 15 minutos.

#### **b) Meio para reativação das células liofilizadas e manutenção das cepas nas placas de Petri para isolamento da cultura pura**

Meio AN<sub>LÍQUIDO</sub> (caldo nutriente): extrato de carne 3,0 g/L; peptona 5,0 g/L; agar 15,0 g/L.

O preparo deste meio seguiu as mesmas etapas descritas para o meio YMA (fermento-malte-ágar). O meio foi submetido a temperatura de 121°C em autoclave por 15 minutos.

### c) Meios para crescimento celular

Todos os meios citados a seguir foram utilizados para identificar aquele no qual os microrganismos apresentaram maior crescimento celular.

O preparo destes meios segue as mesmas etapas descritas para o meio YMA (fermento-malte-ágar). Os meios foram submetidos a temperatura de 121°C em autoclave por 15 minutos.

Meio YMA<sub>LÍQUIDO</sub> (fermento-malte líquido): extrato de malte 3,0 g/L; extrato de levedura 3,0 g/L; peptona 5,0 g/L; glicose 10,0 g/L.

Meio MBAR<sup>\*\*\*\*</sup> (biotransformação com ácido ricinoleico): ácido ricinoleico 10,0 g/L; extrato de carne 20,0 g/L.

Meio MBRM<sup>\*\*\*\*</sup> (biotransformação com ricinoleato de metila): ricinoleato de metila 5,0 g/L; extrato de carne 10,0 g/L.

Meio MSA (meio salino A): extrato de levedura 0,1 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 2,5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,1 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,6 g/L; ZnCl<sub>2</sub> 0,0005 g/L; MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O 0,2 g/L; NaCl 0,1 g/L; FeSO<sub>4</sub> 0,005 g/L; CuSO<sub>4</sub> 0,001 g/L; glicose 15,0 g/L.

Meio MSB (meio salino B): extrato de levedura 0,1 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 2,5 g/L; MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O 0,2 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,1 g/L; NaCl 0,1 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,6 g/L; FeSO<sub>4</sub> 0,005 g/L; ZnCl<sub>2</sub> 0,0005 g/L; CuSO<sub>4</sub> 0,001 g/L; ácido ricinoleico 10,0 g/L.

### 3.1.3 Instrumentação

O monitoramento do pH dos meios de crescimento YMA, MBAR, MBRM, MSA e MSB e dos meios de biotransformação das cepas em estudo utilizando ácido ricinoleico e ricinoleato de metila, foi feito através de leitura diretamente na amostra em pHmêtro digital PG2000, marca Gehaka.

---

\*\*\*\* Estes meios foram utilizados tanto para crescimento celular como para a biotransformação.



O desenvolvimento do crescimento celular e da biotransformação foram feitos num incubador rotatório (“shaker”) modelo TE-420, marca Tecnal e num biorreator de 2L (Anexo 2) de volume útil confeccionado em aço inoxidável pela Metalúrgica HOH da cidade de Blumenau (SC), respectivamente.

A construção das curvas de calibração, análise da gamadecalactona e do ricinoleato de metila e detecção dos produtos da biotransformação foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Esta técnica serviu também para a identificação dos ácidos graxos e seus derivados<sup>41</sup>.

Foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo CG-17 A, da Shimadzu, equipado com detector por ionização em chama (DIC) e um cromatógrafo acoplado a um espectômetro de massas modelo GC-MS QP 2000 A da Shimadzu, coluna capilar DB-1 (J & W Scientific) 30m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura da fase estacionária, coluna capilar DB-17 (J & W Scientific) 30m x 0,50 mm d.i. e 0,25 µm de espessura da fase estacionária. Gases especiais para cromatografia gasosa (nitrogênio, ar sintético e hidrogênio da White Martins S.A).

As análises realizadas através dos métodos de IV, CG-EM e RMN foram realizadas nos laboratórios da Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os espectros de infravermelho foram feitos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FT-IR 16PC. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram feitos em um espectrofotômetro Bruker AC 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Os outros equipamentos utilizados foram uma estufa Fanem 315 SE e uma balança de precisão AD-4 Perkin Elmer.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Abertura da Ampola e Reativação das Células Liofilizadas

Os microrganismos devem estar em cultura pura, isto é, em um meio em que todas as células da população sejam idênticas no sentido de que elas se originaram de uma mesma célula parental.

O material a ser colocado no meio de cultura chama-se inóculo e foi feito pela técnica de esgotamento por estrias que é o esgotamento de material contido numa alça de semeadura por meio de estrias na superfície do meio (Anexo 2). O objetivo da semeadura é diminuir a população microbiana, assim as células individuais estarão localizadas a uma certa distância umas das outras. As células individuais, se estiverem distantes o suficiente, produzirão uma colônia que não entra em contato com outras colônias.

Para isolar uma cultura pura, uma colônia individual deve ser transferida do meio para um tubo de ensaio e/ou placa de Petri. Por isso, as células foram inoculadas em tubos de ensaio inclinados – *slants* - contendo meio YMA (fermento-malte-ágar) e em placas de Petri contendo ágar nutriente sólido (AN<sub>SÓLIDO</sub>) a fim de manter as culturas vivas por um período de tempo (aproximadamente 3 meses) para estudá-las.

Todo material utilizado foi devidamente esterilizado. A ampola que continha a linhagem liofilizada foi desinfetada com uma gaze embebida em álcool 70%. A lima utilizada para serrar a ampola foi esterilizada com álcool e flambada no bico de Bunsen.

Riscou-se a ampola na altura do ponto médio do tampão de algodão utilizando-se a lima. Quebrou-se a ampola na altura do risco pressionando com os dedos polegares. Retirou-se a porção superior da ampola próximo ao bico de Bunsen e removeu-se o tampão de algodão com uma pinça. Adicionou-se cerca de 0,2 mL de água destilada com o auxílio de uma pipeta Pasteur formando-se uma suspensão de células.

Transferiu-se todo o conteúdo da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL do meio caldo nutriente líquido – AN<sub>LÍQUIDO</sub> (tubo cepa pura). A

partir do conteúdo deste tubo, com uma alça de platina esterilizada fez-se os repiques das cepas para as placas de Petri contendo meio AN<sub>SÓLIDO</sub> ou para os “slants” contendo meio YMA (fermento-malte-ágar) sólido, conservando-as sob refrigeração para sua manutenção. Para melhor conservação destas colônias, seu estoque era repostado a cada três ou quatro meses.

Como os repiques das cepas da *Candida guilliermondii* cresceram formando um aglomerado, refizemos os repiques através do método das diluições sucessivas<sup>42</sup> (Anexo 1) a fim de obter colônias isoladas.

A incubação dos microrganismos foi feita nas condições de temperatura, tempo de crescimento e meio de cultura recomendados<sup>\*\*\*\*</sup> conforme Tabela 4.

**Tabela 4. Condições de incubação dos microrganismos utilizados**

CCT	Microrganismo	Lote	Quantidade	Meio	t (°C)
3604	<i>Candida oleophila</i>	59.93	01	YMA	28
2625	<i>Candida guilliermondii</i>	Não disponibilizado pelo fornecedor	01	YMA	28

### 3.2.2 Preparo dos Inóculos para os Ensaio de Crescimento Celular

A preparação dos meios para os ensaios de crescimento celular e biotransformação (inóculos) utilizaram as linhagens *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* com os substratos ácido ricinoleico e ricinoleato de metila.

Primeiramente é necessário obter as curvas de crescimento das respectivas linhagens a fim de conhecer seus perfis de comportamento do

---

\*\*\*\* Todas as condições foram pré-estabelecidas e fornecidas pela Fundação André Tosello.

crescimento celular e do comportamento cinético para, em seguida, preparar o inóculo para o meio de biotransformação.

Com o auxílio de uma alça de cromo-níquel, transferiu-se 10 UFC (unidades formadoras de colônia) de cada linhagem conservada no meio AN (ágar nutriente) para um tubo de ensaio com 20 mL de água peptonada 1% (solução de 1g de peptona em 100 mL de água destilada) a fim de reativar as células. Em seguida, transferiu-se o conteúdo do tubo de ensaio para um erlenmeyer contendo 250 mL de meio de crescimento para obter uma quantidade significativa de massa celular. Colocou-se em incubador rotativo e manteve-se a temperatura de 30°C a 200 rpm de agitação. Para a linhagem *Candida oleophila* utilizou-se um tempo de cerca de 20h de crescimento enquanto que para a *Candida guilliermondii*, o tempo foi de cerca de 48h de crescimento.

Durante este período, retiraram-se alíquotas de 10 mL do meio em tempos regulares de cerca de 4 a 6 horas que foram filtradas em membrana Millipore 0,45 µm de porosidade e submetidas ao cálculo da massa seca<sup>43</sup>.

### 3.2.3 Preparo dos Inóculos para os Ensaio de Biotransformação

#### 3.2.3.1 Ensaio em incubador rotativo (*shaker*)

O inóculo (suspensão de células em concentração adequada para o desenvolvimento de um processo biotecnológico) para esses ensaios foi preparado a partir das placas de Petri contendo as duas linhagens supra citadas com ricinoleato de metila.

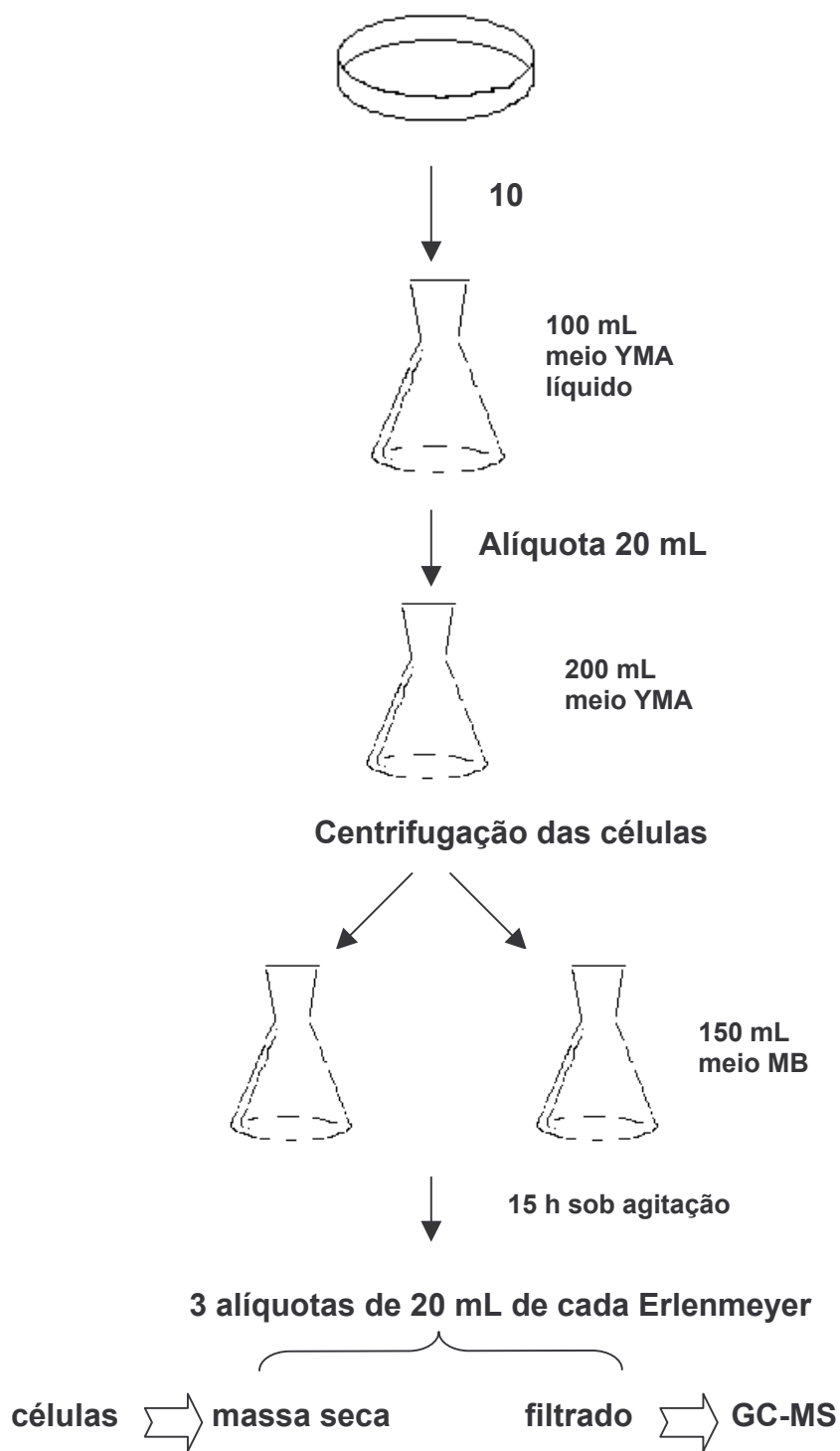
Com o auxílio de uma alça de cromo-níquel, transferiu-se 10 UFC (unidades formadoras de colônia) das cepas conservadas no meio AN (ágar nutriente) para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio YMA<sub>LIQUIDO</sub> a fim de reativá-las e obter uma quantidade significativa de massa celular. Colocou-se em incubador rotativo e manteve-se a temperatura de 30°C durante 20 horas a 200 rpm de agitação.

Após este tempo, retirou-se uma alíquota de 20 mL do meio com a cepa já reativada e juntou-se a outro erlenmeyer com 200 mL de um novo meio YMA<sub>LÍQUIDO</sub>, perfazendo um total de 220 mL de inóculo.

Manteve-se o inóculo sob agitação até o término da fase de crescimento exponencial (aproximadamente 15 horas) nas mesmas condições de agitação e temperatura, sendo em seguida centrifugado. Transferiu-se as células centrifugadas do inóculo acima para dois erlenmeyers de 300 mL contendo 150 mL de meio de biotransformação com ricinoleato de metila (MBRM) cada um, retirando-se amostras de 20 mL cada, em tempos pré-determinados, a saber: t0h, t12h, t18h, t24h, t36h e t48h, sendo submetidas em seguida à filtração em membrana Millipore 0,45 µm de porosidade.

A partir das amostras retiradas acima, utilizou-se as células filtradas para cálculo da massa seca<sup>43</sup> (item 3.2.5.2 - a) e com o filtrado procedeu-se a detecção dos produtos obtidos na biotransformação através de cromatografia gasosa.

A realização dos ensaios em incubador rotativo está representado no Esquema 2.



Esquema 2. Representação esquemática para preparo dos inóculos dos ensaios de biotransformação realizados em incubador rotativo com as linhagens *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em ricinoleato de metila

### 3.2.3.2 Ensaios em biorreator

O inóculo para esses ensaios foi preparado a partir das placas de Petri contendo as duas linhagens citadas com o substrato ácido ricinoleico, cujos parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios de biotransformação do ácido ricinoleico com as linhagens *Candida oleophila* (COAR) e *Candida guilliermondii* (CGAR)**

Parâmetros	COAR	CGAR
Meio de cultura	MBAR	MBAR
Volume do meio ( L )	2,0	2,0
Duração (h)	48	48
Rotação (rpm)	200	200
Temperatura (°C)	28	28
Equipamento empregado	Biorreator	Biorreator

Os resultados experimentais referentes aos ensaios de biotransformação com o ácido ricinoleico em biorreator estão representados nas Figuras 17 e 18.

Para a biotransformação do ácido ricinoleico, transferiu-se com o auxílio de uma alça de cromo-níquel, 10 UFC (unidades formadoras de colônia) das cepas conservadas no meio AN (ágar nutriente) para cada um dos cinco erlenmeyers contendo 200 mL de meio YMA<sub>LÍQUIDO</sub> a fim de reativar as cepas e obter uma quantidade significativa de massa celular. Os erlenmeyers contendo esse meio, foram colocados em incubador rotativo e mantido a temperatura de 30°C durante 20 horas a 200 rpm de agitação.

Após 20 h, retirou-se de cada erlenmeyer alíquotas de 20 mL (10%) cada e adicionou-se a outros cinco erlenmeyers com 200 mL do mesmo meio YMA, perfazendo um total de 220 mL de inóculo em cada um deles. Manteve-se o inóculo sob agitação até o término da fase exponencial (aproximadamente 15 horas) nas mesmas condições de agitação e temperatura.

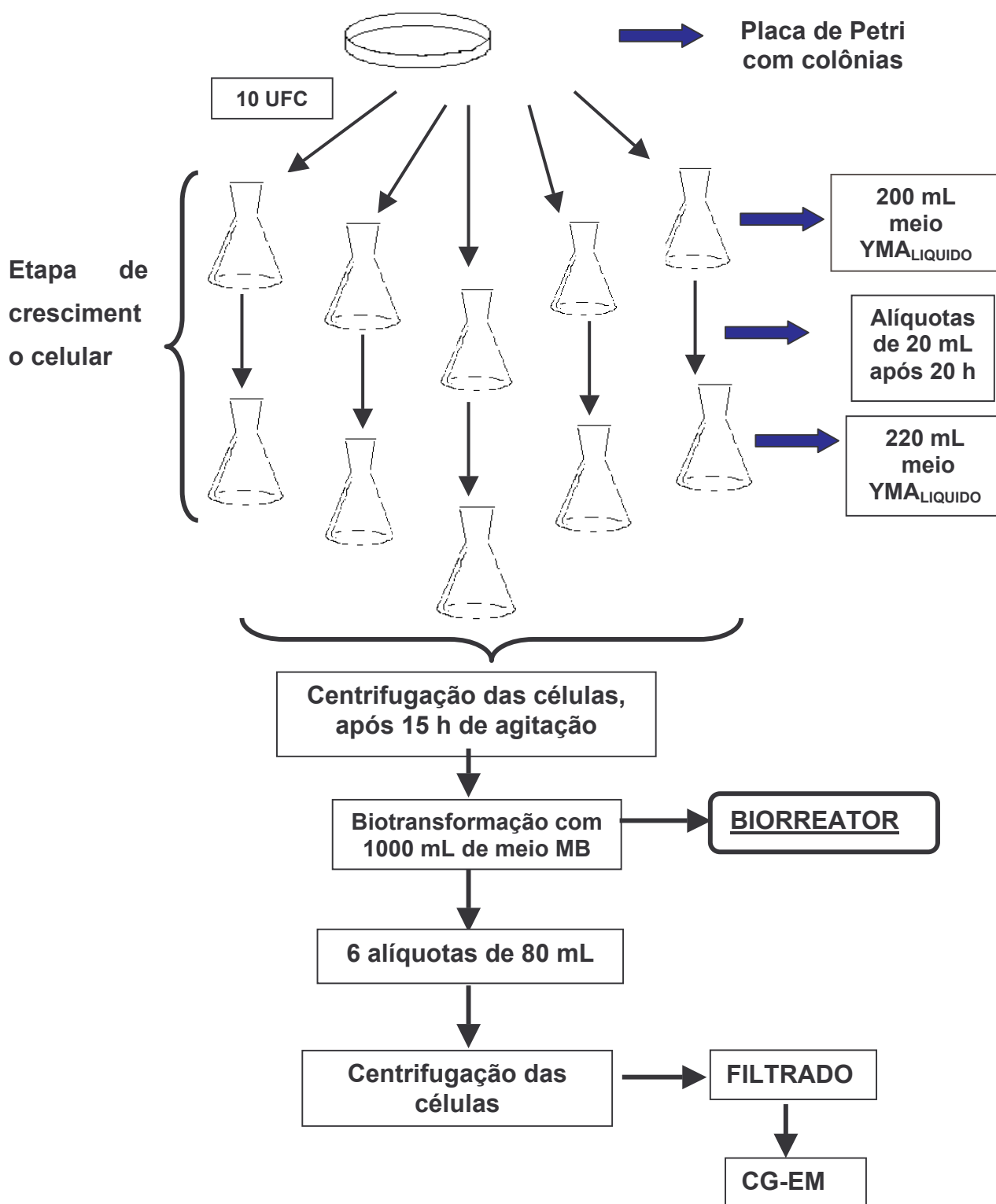
Repetiu-se todo o procedimento, com a finalidade de obter massa celular oriunda de 2 L de meio YMA, pois a relação entre a quantidade do meio de crescimento celular e meio de biotransformação é de 2:1<sup>8</sup>.

Transferiu-se somente as células centrifugadas dos inóculos acima para o biorreator contendo 1000 mL de meio MBAR descrito no item 3.1.2 - c, retirando-se alíquotas de 80 mL cada, em tempos pré-determinados de: t0h, t12h, t18h, t24h, t36h e t48h.

Após a centrifugação das amostras retiradas a diferentes tempos a 200 rpm, utilizou-se o filtrado para a detecção dos produtos da biotransformação através de cromatografia gasosa. Nesta etapa, não houve monitoramento da massa seca.

A realização dos ensaios em biorreator está representada no Esquema 3.





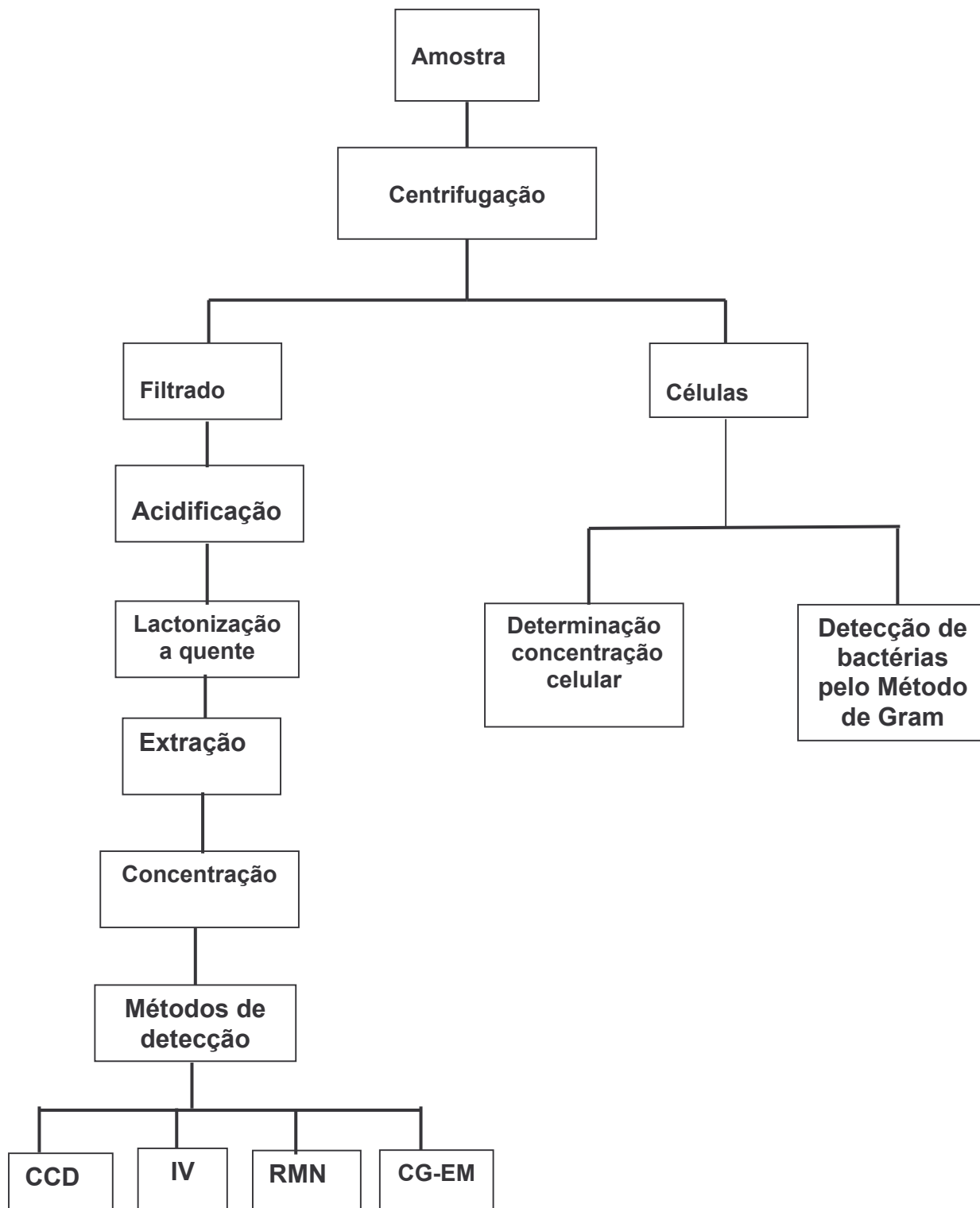
Esquema 3. Representação esquemática para preparo dos inóculos para os ensaios de biotransformação realizados em biorreator com as linhagens *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em ricinoleato de metila

### **3.2.4 Metodologia Analítica para Tratamento das Amostras Provenientes do Meio de Biotransformação**

Durante os ensaios de biotransformação foram retiradas amostras em diferentes tempos para posterior detecção da gamadecalactona através de cromatografia gasosa e também para monitoramento do pH do meio.

As amostras coletadas ao longo do cultivo foram centrifugadas, levadas a pH=2,0 mediante acréscimo de ácido clorídrico, lactonizadas a quente sob refluxo com posterior extração e concentração em rota-evaporador, sendo os concentrados obtidos, mantidos congelados até o momento da análise.

O tratamento analítico das amostras está representado no Esquema 4.



Esquema 4. Representação esquemática do tratamento analítico das amostras provenientes do meio de biotransformação

### 3.2.5 Determinações Microbiológicas

#### 3.2.5.1 Detecção de bactérias pelo método de Gram

Para a detecção de bactérias foi utilizado o método de coloração de Gram<sup>44</sup> para as linhagens de *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*. Consiste num teste de identificação da morfologia bacteriana, no qual é possível detectar as células Gram positivos e negativos para avaliar a pureza microbiológica. Foram preparados meios de crescimento com as duas linhagens em estudo e cultivados durante 48 horas. Em seguida foram retiradas amostras e submetidas à análise da morfologia bacteriana pelo procedimento descrito a seguir.

Preparou-se um esfregaço de cada um dos microrganismos provenientes dos meios de biotransformação em estudo, ou seja, sobre uma lâmina limpa colocou-se uma gota de água ou solução fisiológica.

Com uma alça de platina tomou-se uma pequena porção do meio de cultura, observando as condições de assepsia. Fez-se uma emulsão com a cultura na gota, de sorte a obter uma suspensão uniforme. Espalhou-se suficientemente para obter-se um esfregaço fino. Secou-se a preparação ao ar.

Em seguida, fixou-se o esfregaço, passando a lâmina três vezes diretamente na chama. Antes de corar, a lâmina foi resfriada completamente.

Cobriu-se o esfregaço seco e fixado com uma solução de cristal violeta (corante básico). Deixou-se durante um minuto.

Esgotou-se a lâmina e cobriu-se com solução de lugol (mordente) que ficou agindo durante um minuto. Esgotou-se a lâmina novamente, mantendo-a inclinada. Pingou-se álcool (agente descolorante) a 95%, gota a gota, até que não desprendesse mais corante da lâmina e lavou-se com água corrente.

Cobriu-se a lâmina com solução de safranina (contracorante) e deixou-se durante 15 ou 30 segundos. Em seguida lavou-se em água corrente e secou-se com papel de filtro. Examinou-se ao microscópio com objetiva de imersão, anotando-se a cor dos microrganismos. Como os mesmos não

adquiriram nenhuma cor, isto indicou que o meio apresentava pureza microbiológica.

### 3.2.5.2 Determinação da concentração celular e da velocidade específica de crescimento

A concentração de células que foram submetidas ao processo de biotransformação foi determinada pelo método da massa seca<sup>43</sup> e pelo cálculo da velocidade máxima específica. Esse procedimento foi aplicado às linhagens *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* com os substratos ácido ricinoleico e ricinoleato de metila.

#### a) Método da massa seca - Determinação da concentração celular por gravimetria

Pipetou-se um volume conhecido (25 mL, por exemplo) do meio de cultura. Procedeu-se a filtração da suspensão em uma membrana Millipore de 0,45 µm de porosidade previamente pesada. As células retidas na membrana foram lavadas duas vezes com água destilada. A membrana contendo as células foi colocada numa estufa a 105 °C por 2 horas e meia. Após este tempo, resfriou-se em um dessecador por 30 minutos. Procedeu-se a pesagem da membrana com as células numa balança analítica.

Para o cálculo da concentração celular na amostra, expressa em gramas de matéria seca por litro, utilizou-se a seguinte equação:

$$X = ( M_t - M_m \times F ) \times 1000 / V \quad (1)$$

Onde: X = concentração celular  
(g/L)

$M_t$  = massa seca total (membrana + células) (g)

$M_m$  = massa da membrana (g)

F = fator de correção de umidade<sup>45</sup>

1-H/100 onde H= umidade do papel ≈ 1,6%

V = volume de amostra filtrada (mL)

O fator de correção de umidade ( F ) foi calculado a partir da técnica de peso constante onde três membranas foram colocadas em estufa e secas sob as mesmas condições empregadas para a amostra. O valor médio obtido após a secagem foi estimado para todas as amostras dos ensaios realizados.

#### **b) Determinação de velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ )**

A partir dos perfis de concentração celular, foi possível determinar através das amostras coletadas a diferentes tempos, as velocidades específicas de crescimento microbiano (dX/dt).

Dividindo-se as velocidades médias pela concentração celular no tempo relativo à retirada da amostra, obtém-se as velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ).

$$\mu_x = 1/X \cdot dX/dt \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

As velocidades instantâneas ou específicas foram determinadas segundo a metodologia descrita por LE DUY e ZAJIC (1973)<sup>46</sup> e citado por MORITZ (1998)<sup>47</sup>.

Para o cálculo das velocidades específicas, as curvas representando o comportamento provável da concentração celular ao longo dos processos de crescimento e biotransformação, foram obtidas a partir do *software* Microsoft Excel.

Para isso foram traçadas curvas suavizadas a partir dos pontos experimentais. As equações geradas a partir dos valores de tempo e concentração celular foram ajustados aos dados experimentais, obtendo-se, assim, as derivadas necessárias em função do tempo e dividindo-se pela concentração celular.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada através do coeficiente angular da reta plotando-se o logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo, quando o crescimento microbiano estava na fase exponencial de crescimento conforme metodologia utilizada pelos autores supracitados.

Para melhor entendimento da determinação da velocidade específica de crescimento é apresentado abaixo um exemplo para seu cálculo:

**Tabela 6. Valores relativos a concentração celular (X) e velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) em função do tempo**

Tempo( h)	X(g/L)	X calc	dX/dt	1/X*dX/dt
0	0,29	0,4576	-0,3592	0,0000
1	0,39	0,2416	-0,0782	0,0000
2	0,45	0,2902	0,1697	0,5847
3	0,61	0,5699	0,3843	0,6742
4	0,86	1,0476	0,5656	0,5399
9	5,17	5,2416	0,9734	0,1857
12	8,13	8,0052	0,8191	0,1023
15	9,81	9,8571	0,3655	0,0371
18	9,90	9,8992	-0,3873	0,0000

Através dos valores de tempo (h) e concentração celular (g/L) obteve-se a seguinte equação:

$$y = -0,005542x^3 + 0,148854x^2 - 0,359227x + 0,457566$$

$$R^2 = 0,999084$$

### 3.2.6 Método de Extração das Amostras

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida nos laboratórios da FURB - Universidade Regional de Blumenau – Blumenau – SC.

Foram retiradas alíquotas de 80 mL do meio de biotransformação MBAR que era composto de 20 g/L de extrato de carne e 10 g/L de ácido ricinoleico, em tempos de 0h, 12h, 18h, 24h e 36 h com a linhagem *Candida guilliermondii*. Essas alíquotas foram extraídas com éter etílico em funil de separação com o objetivo de recuperar os analitos (amostras a serem analisadas), concentradas em rota-evaporador e secas sob fluxo de N<sub>2</sub>. Em seguida, para serem submetidas ao cromatógrafo gasoso, as amostras foram diluídas com 2 mL de acetato de etila e guardadas no congelador até o momento da análise.

### 3.2.7 Procedimentos para Análise das Amostras por Cromatografia Gasosa

Todos os procedimentos descritos dos itens 3.2.7.1 até 3.2.7.6. foram necessários para a análise das amostras por cromatografia gasosa. As alíquotas foram armazenadas no congelador e quando da análise, foram previamente secas sob fluxo lento de gás nitrogênio. Quando as amostras preparadas no item 3.2.6. apresentavam ácido ricinoleico remanescente no meio de biotransformação eram esterificadas pelo método do diazometano (item 3.2.7.1.) e diluídas a 1 mL com acetato de etila. Foram retiradas alíquotas de 50 µL que foram silanizadas com BSTFA [ N,O- bis (trimetilsilil)trifluoracetamida] (item 3.2.7.2.). Foi adicionado a cada amostra 100 µL de padrão interno (estearato de metila) e completada ao volume de 5 mL com acetato de etila. A partir desta solução, retiraram-se alíquotas de 1,2 µL que foram injetadas manualmente no cromatógrafo gasoso usando as condições de análise descritas na Tabela 7.



### 3.2.7.1 Esterificação do ácido ricinoleico por diazometano

#### a) Preparação da solução estoque de diazometano

Aproximadamente 50 mL de etanol foram adicionados à uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Esta solução foi transferida para um balão de destilação de 200 mL, munidos de condensador e funil de adição contendo solução de p-tolilsulfonilmetilnitrosamida (0,2 mol) em éter etílico (250 mL). Aqueceu-se o balão em banho-maria a temperatura de 60-65°C, e lentamente por um período de 30 minutos gotejou-se a solução contida no funil de adição à solução do balão de destilação. Após o funil esvaziar-se, adicionou-se mais 30 mL de éter etílico e destilou-se até que a solução do balão de destilação tornasse incolor.

O destilado foi recolhido em um frasco coletor resfriado em banho de gelo. Devido a toxicidade do diazometano o processo foi realizado na capela.

#### b) Metilação do ácido ricinoleico

A solução de diazometano em éter etílico preparada no item anterior, foi adicionada até cessar evolução de nitrogênio às amostras de ácido previamente secas sob fluxo de gás nitrogênio e a solução adquirir uma coloração amarelada. Em seguida, as amostras ficaram na capela até a evaporação do éter etílico.

### 3.2.7.2 Silanização do ricinoleato de metila

Todas as amostras contendo ricinoleato de metila foram submetidas à silanização adicionando-se 30 µL de BSTFA [ N,O- bis (trimetilsilil)trifluoracetamida] a cada amostra a ser injetada no cromatógrafo gasoso. Após adicionar um fluxo rápido de N<sub>2</sub>, a mistura foi tampada e colocada na estufa a 60°C durante uma hora. Após este período o excesso de BSTFA foi evaporado sob fluxo de nitrogênio.

A análise cromatográfica foi feita no máximo em 48 horas após a silanização devido a instabilidade do derivado formado.

### **3.2.7.3 Preparação da solução padrão de gamadecalactona (GDL) para construção da curva de calibração**

Pesou-se 25,7 mg de gamadecalactona sendo em seguida transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com acetato de etila, resultando em uma solução estoque de concentração  $2570 \text{ mg.L}^{-1}$ . Usando uma seringa volumétrica de  $100 \mu\text{L}$ , foram retiradas alíquotas de  $97,2 \mu\text{L}$ ;  $194,5 \mu\text{L}$ ;  $292,0 \mu\text{L}$ ;  $390,0 \mu\text{L}$  e  $486,0 \mu\text{L}$ .

Essas alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e depois foi adicionado acetato de etila, resultando nas concentrações finais  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente. Esta faixa de concentração foi usada para construir a curva de calibração.

### **3.2.7.4 Preparação da solução padrão de ricinoleato de metila para construção da curva de calibração**

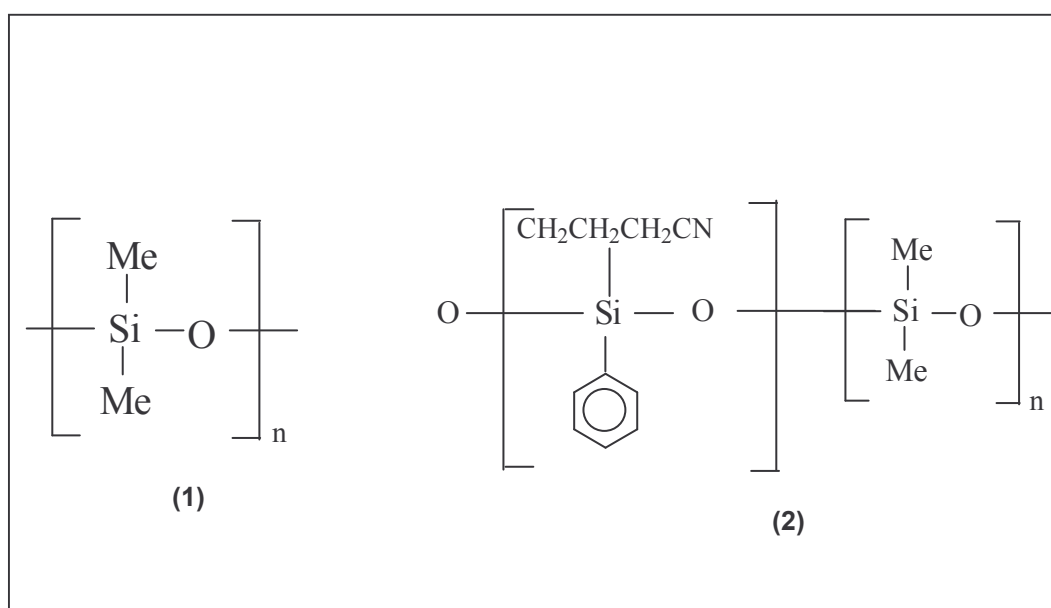
Para o ricinoleato de metila pesou-se 50 mg do mesmo, sendo em seguida transferido para um balão volumétrico de 10 mL e completando-o com acetato de etila. A partir dessa solução estoque  $5000 \text{ mg.L}^{-1}$ , usando uma micro seringa volumétrica de  $100 \mu\text{L}$ , alíquotas de 100, 200, 300, 400 e  $500 \mu\text{L}$  foram transferidas para mini-frascos a partir dos quais o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Após a silanização com  $30 \mu\text{L}$  de agente silanizante BSTFA (N,O-Bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida), os mini-frascos foram colocados na estufa por 1 hora a temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e depois o excesso de agente silanizante foi evaporado. As soluções foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e completadas ao volume com acetato de etila. A concentração final das soluções padrão de ricinoleato de metila foram 100, 200, 300, 400 e  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  e esta foi a faixa de concentração usada para construir a curva de calibração.

A curva de calibração foi determinada por cromatografia gasosa sob as condições de operação descritas na Tabela 7.

### 3.2.7.5 Otimização das condições cromatográficas

Foram injetadas 1,2  $\mu\text{L}$  das soluções estoque e trabalho para determinar as melhores condições de análise, temperatura da coluna, temperatura do injetor e do detector e programação de temperatura, estipulando o tempo de retenção e a área mínima a ser integrada dos picos cromatográficos.

Os testes foram realizados usando dois tipos de colunas capilares: fase líquida apolar DB-1 (100% dimetil-polisiloxano) **(1)** e a coluna capilar DB-17, fase líquida intermediária (14% cianopropilfenil, 86% dimetilpolisiloxano) **(2)** como mostra a figura 8.



**Figura 8. Representação das colunas capilares: fase líquida apolar DB-1 (1) e fase líquida intermediária DB-17 (2)**

Os melhores picos foram obtidos usando a coluna DB-1 apolar. Esta foi a coluna usada para a construção da curva de calibração e análise dos analitos/amostras após a extração. As condições cromatográficas otimizadas

para a separação da  $\gamma$ -decalactona e do ricinoleato de metila ( $C_{19}H_{36}O_3$ ) com a adição do padrão interno, estearato de metila [  $CH_3(CH_2)_{16}COOCH_3$  ], são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7. Condições cromatográficas otimizadas para construção das curvas analíticas e análise da gamadecalactona e do ricinoleato de metila com adição do padrão interno estearato de metila**

<b>COLUNA</b>	
Dimensões	30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno)
Material	Sílica fundida
Fase líquida	DB-1 (100% dimetil-polisiloxano)
Espessura do filme	0,25 $\mu$ m de filme de fase estacionária
<b>TEMPERATURA DO FORNO</b>	
Temperatura inicial	100°C
Programação	10°C/ min.
Temperatura final	310°C
<b>GÁS DE ARRASTE</b>	Nitrogênio
<b>TEMPERATURA DO INJETOR</b>	280°C
<b>FLUXO DO GÁS DE ARRASTE</b>	1,4 mL.min <sup>-1</sup>
<b>VOLUME DE AMOSTRA INJETADA</b>	1,2 $\mu$ L
<b>RAZÃO DE DIVISÃO (“ split ratio”)</b>	1:40
<b>DETECTOR</b>	Ionização de chama (DIC)
<b>TEMPERATURA DO DETECTOR</b>	320°C

### 3.2.7.6 Preparação do padrão interno – estearato de metila

Foi pesado 50 mg de estearato de metila e transferido para um balão volumétrico de 10 mL que foi completado com acetato de etila, resultando numa concentração final de 5000 mg.L<sup>-1</sup>. Foram retiradas alíquotas de 100 µL de solução e adicionou-se similarmente a cada solução de 5 mL de gamadecalactona e de ricinoleato de metila resultando em soluções com concentração final de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.2.8 Preparação do Ricinoleato de Metila Através da Esterificação do Ácido Ricinoleico por Metanol em Meio Ácido

Aqui descreve-se a preparação do ricinoleato de metila para utilização como substrato nos ensaios de crescimento celular e biotransformação. Foi uma adaptação do método desenvolvido por Endrizzi<sup>8</sup>.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram colocados 120 mL de metanol e adicionados cuidadosamente 4,0g (0,075 mol) de cloreto de amônio e 6 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi refluxada por 15 minutos e após resfriada a temperatura ambiente. Uma alíquota de 15 mL desta solução foi retirada e adicionada a 0,5 g (0,0017mol) de ácido ricinoleico e refluxados por uma hora. Após resfriamento, adicionou-se 50 mL de água destilada e a fase orgânica foi extraída com 25 mL de éter etílico. A extração foi repetida, e as fases orgânicas combinadas foram lavadas com três porções de 20 mL de água destilada. A fase etérea foi seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrado e o solvente foi evaporado sob vácuo. Obteve-se 12,6g do produto bruto, a partir de 420 mL de reagente de esterificação e 13,909g de ácido ricinoleico.

A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente acetato de etila/éter de petróleo, com frações de polaridade crescente, rendendo 11,74g do composto puro (rendimento 84,4%).(Anexo3)

### Análises espectroscópicas

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, TMS)  $\delta$ : **0,88** (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); **1,31~1,55** (m, 20H,  $-\text{CH}_2-$ ); **2,04** (q,  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{R}$ ); **2,20** (t, 2H,  $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH}$ ); **2,24** (t, 2H,  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH}$ ); **2,29** (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ); **3,60~3,65** (m, 4H,  $-\text{OCH}_3$  e  $\text{HC}-\text{OH}$ ); **5,35~5,6** (m, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz, TMS)  $\delta$ : 13,89 (C18); 22,46 (C17); 51,22 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ); 71,31 (C-OH); 125,22 e 132,85 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ); 174,08 ( $-\text{C}=\text{O}$ ); 24,75; 25,55; 27,20; 28,93; 29,22; 29,40; 31,69; 33,89; 35,21 e 36,70 ( $-\text{CH}_2-$ ).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3462 ( $\gamma$  - OH); 3015 ( $\gamma$   $=\text{CH}_2$ ); 2928,2855 ( $\gamma$  - C - H); 1465-1500 ( $\gamma$   $-\text{C}=\text{C}-$ ); 1742 ( $\gamma$   $\text{C}=\text{O}$ ); 1189 e 1225 ( $\gamma$  C - O); 724 ( $\delta$  H-C=C-H cis )

## CAPÍTULO IV

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para apresentação dos resultados dos ensaios realizados, reuniu-se o trabalho em três grupos, conforme descrito na Tabela 8, onde:

**Grupo I** : Ensaios realizados para determinação das curvas de crescimento das cepas estudadas (ensaios S1 à S6).

**Grupo II** : Ensaios realizados para avaliar a produção de gamadecalactona (GDL) pela biotransformação do ácido ricinoleico (ensaios G1 e G2).

**Grupo III** : Ensaios realizados para avaliar a produção de gamadecalactona (GDL) pela biotransformação éster metílico do ácido ricinoleico (ensaios G3 e G4).

Tabela 8. Descrição sumária dos ensaios realizados

Grupo	Ensaio	Microrganismo	Objetivo
I	S1 ( YMA )	<i>C. oleophila</i>	Determinação da curva de crescimento e identificação do meio no qual o microrganismo melhor se adapta
I	S2 ( MBAR )	<i>C. oleophila</i>	
I	S3 ( YMA )	<i>C. guilliermondii</i>	
I	S4 ( MBAR )	<i>C. guilliermondii</i>	
I	S5 ( MSA )	<i>C. guilliermondii</i>	
I	S6 ( MSB )	<i>C. guilliermondii</i>	
II	G1 ( MBAR )	<i>C. oleophila</i>	Detectar a presença de gamadecalactona pela biotransformação do ácido ricinoleico
II	G2 ( MBAR )	<i>C. guilliermondii</i>	
III	G3 ( MBRM )	<i>C. oleophila</i>	Detectar a presença de gamadecalactona pela biotransformação do ricinoleato de metila
III	G4 ( MBRM )	<i>C. guilliermondii</i>	

**NOTA: YMA = meio fermento-malte-ágar**

MBAR = meio de biotransformação com ácido ricinoleico

MBRM = meio de biotransformação com ricinoleato de metila

MSA = meio salino “A”

MSB = meio salino “B”

A respeito do Grupo I, são comparados entre si, os resultados encontrados nos ensaios com o meio YMA (ensaio S1) e com o meio de biotransformação MBAR (ensaio S2) para a linhagem *Candida oleophila* e, posteriormente, entre os ensaios com o meio YMA (ensaio S3), meio de biotransformação MBAR (ensaio S4), meio salino MSA (ensaio S5) e meio salino MSB (ensaio S6) para a linhagem *Candida guilliermondii*. Após esta análise preliminar, serão confrontados os resultados obtidos para as curvas de crescimento das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.



Para o Grupo II, a análise comparativa dar-se-á pela detecção por cromatografia gasosa de gamadecalactona (GDL) através da biotransformação do ácido ricinoleico pelas *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

E finalmente, a análise do Grupo III servirá para detectar por cromatografia gasosa a produção de gamadecalactona (GDL) através da biotransformação do ricinoleato de metila pelas mesmas linhagens citadas acima.

#### 4.1 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

Este item aborda os resultados obtidos nos ensaios pertencentes ao Grupo I onde determinou-se a curva de crescimento das linhagens de *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii* em diferentes meios de cultivo, mantendo-se as condições de temperatura e agitação constantes.

##### 4.1.1 Curva de Crescimento da Linhagem *Candida Oleophila* no Meio YMA (Ensaio S1) e no Meio de Biotransformação MBAR (Ensaio S2) com Ácido Ricinoleico

Este procedimento é utilizado para se conhecer a concentração de células que serão submetidas ao processo de biotransformação.

Determinou-se as curvas de crescimento da linhagem *Candida oleophila* nos meios YMA (ensaio S1) e MBAR (ensaio S2) em sistema descontínuo<sup>15</sup>, isto é, no qual o meio de cultura não é renovado a partir do momento em que é inoculado, utilizando as condições descritas na Tabela 4.1.

Para esses ensaios, tomou-se como base o trabalho realizado por OKUI (1963)<sup>7</sup>, onde a velocidade de agitação adotada pelo autor promoveu adequada homogeneização do meio e proporcionou boa transferência de oxigênio às células. Agitações maiores provocaram formação de espuma no meio de cultivo, prejudicando o processo de crescimento.

Tabela 9. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios S1 e S2

Parâmetros	Ensaio S1	Ensaio S2
Meio de cultura	YMA <sub>LÍQUIDO</sub>	MBAR
Volume do meio (mL)	250	250
Duração (h)	20	20
Rotação (rpm)	140	140
Temperatura (°C)	28	28
Equipamento empregado	Incubador rotatório	Incubador rotatório

A concentração celular da amostra, expressa em gramas de matéria seca por litro, foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$X = ( M_t - M_m \times F ) \times 1000 / V \quad (1)$$

Onde: X = concentração celular (g/L)

$M_t$  = massa seca total (membrana + células) (g)

$M_m$  = massa da membrana (g)

F = fator de correção de umidade<sup>45</sup>

V = volume de amostra filtrada (mL)

Optou-se pelo método da massa seca, pois permite o monitoramento do processo ao longo do crescimento celular.

Os resultados experimentais referentes aos ensaios S1 e S2 estão indicados nas Tabelas 10 e 11e Figuras 3 e 4.

Tabela 10. Valores obtidos de concentração celular (X) no meio YMA com a linhagem *Candida oleophila* em função do tempo para o ensaio S1

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,29
1	0,39
2	0,45
3	0,61
4	0,86
9	5,17
12	8,13
15	9,81
18	9,9

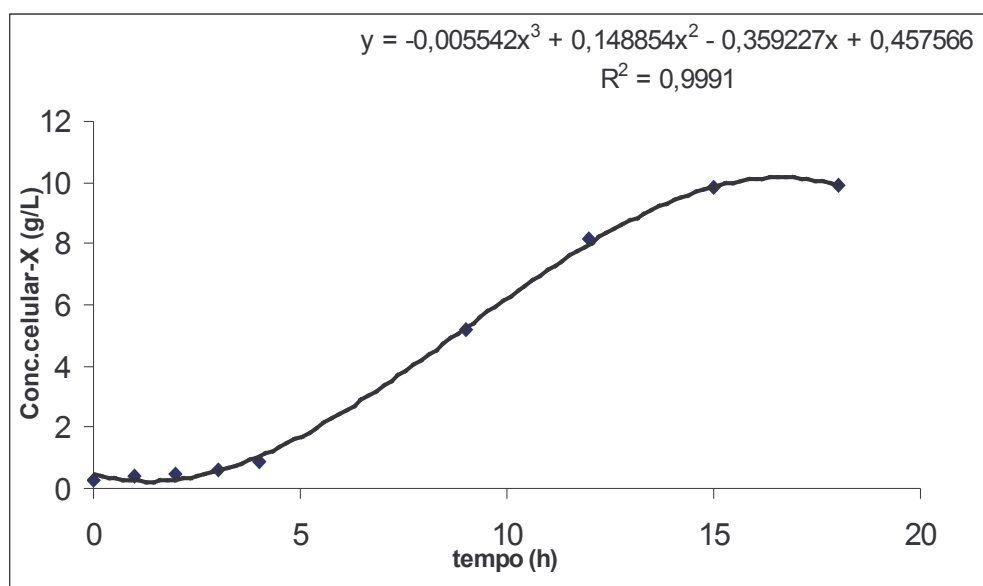


Figura 9. Concentração celular (♦) da linhagem *Candida oleophila* no meio YMA em função do tempo para o ensaio S1

Tabela 11. Valores obtidos de concentração celular (X) no meio MBAR com a linhagem *Candida oleophila* em função do tempo para o ensaio S2

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,38
1	0,50
2	0,57
4	0,48
9	2,76
12	4,14
15	4,78
18	4,96

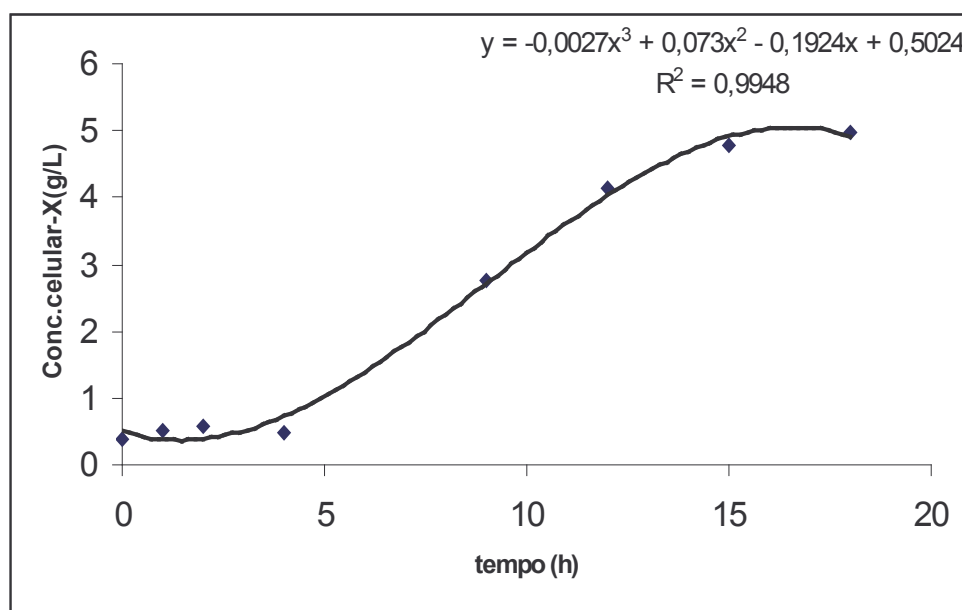


Figura 10. Concentração celular (◆) da linhagem *Candida oleophila* no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S2

Nesses ensaios verificou-se através das figuras 3 e 4 que a levedura *Candida oleophila* no meio MBAR (meio de biotransformação com ácido ricinoleico) apresentou menor concentração celular quando comparada às células cultivadas no meio YMA. Pelos dados das Tabelas 10 e 11, constatou-se que as células no meio YMA apresentaram um aumento de cerca 35 vezes da concentração inicial. Já o meio MBAR apresentou um aumento de 13 vezes o valor inicial.

Esta diferença na variação da concentração celular da *Candida oleophila* observada nos dois meios estudados, pode estar relacionada com a composição química do meio. O meio YMA é formado por compostos ricos em nitrogênio e carbono, que são componentes necessários ao processo de duplicação celular<sup>48</sup>, já o meio MBAR é composto de um meio menos diverso em nutrientes do que o anterior.

Outro aspecto importante deste trabalho foi a caracterização das fases da curva de crescimento da levedura que realizamos através do estudo de crescimento com a inoculação das células nos meios citados acima.

Estudos realizados por ENDRIZZI (1995)<sup>8</sup> relatam que a biotransformação do ricinoleato de metila se inicia somente ao final da fase exponencial de crescimento.

Portanto, utilizando-se os dados de velocidade específica de crescimento, que estão representados pelas linhas pontilhadas que marcam as fases de crescimento (Fig.2), é possível diferenciar os intervalos de cada uma de suas fases – latência, inicial, logarítmica ou exponencial, de diminuição do ritmo de crescimento e estacionária<sup>15</sup> conforme descrito no 1.3.1.

As fases de crescimento correlacionadas com a  $\mu_x$ , onde ocorre a máxima multiplicação celular, podem ser observadas nas Tabelas 12 e 13 e Figuras 5 e 6, utilizando a linhagem *Candida oleophila* nos meios YMA e MBAR.

Tabela 12. Valores relativos a concentração celular e a velocidade específica ( $\mu_x$ ) de crescimento em função do tempo para o ensaio S1

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,29	0,0000
1	0,39	0,0000
2	0,45	0,5847
3	0,61	0,6742
4	0,86	0,5399
9	5,17	0,1857
12	8,13	0,1023
15	9,81	0,0371
18	9,9	0,0000

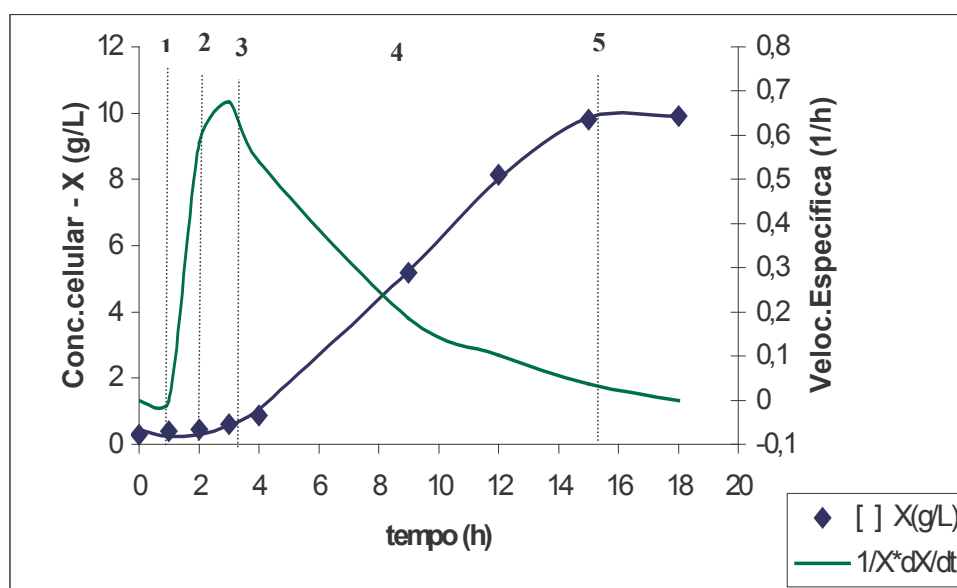


Figura 11. Representação da concentração celular (♦) e da velocidade específica (—) da linhagem *Candida oleophila* cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S1

Tabela 13. Valores relativos a concentração celular e a velocidade específica ( $\mu_x$ ) de crescimento em função do tempo para o ensaio S2

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,38	0,0000
1	0,50	0,0000
2	0,57	0,1727
4	0,48	0,3597
9	2,76	0,1713
12	4,14	0,0971
15	4,78	0,0351
18	4,96	0,0000

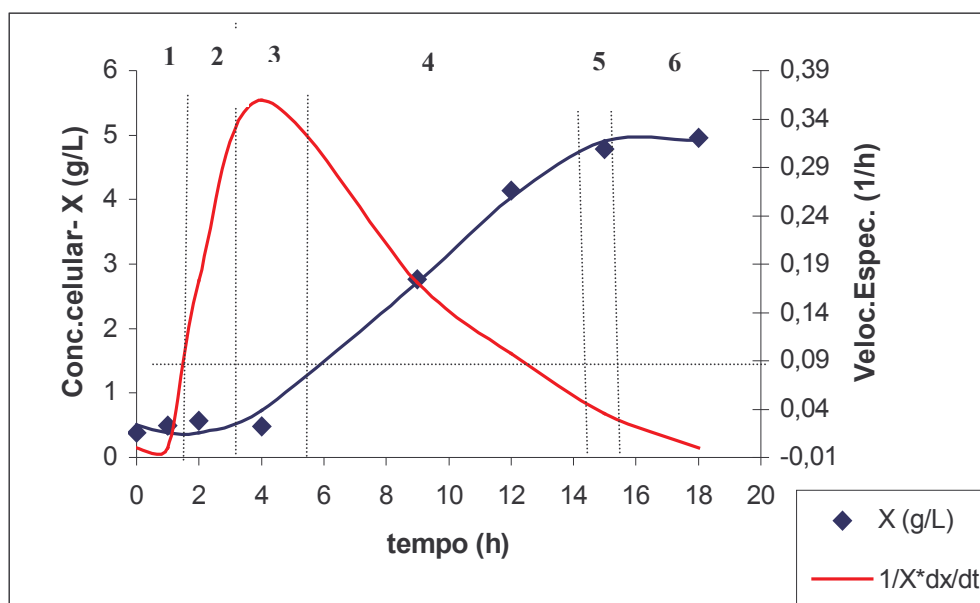


Figura 12. Representação da concentração celular (♦) e da velocidade específica (—) da linhagem *Candida oleophila* cultivada no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S2

Vale lembrar que o estudo da cinética de crescimento foi testado em diversos meios. A escolha dos meios YMA e MBAR para o estudo da cinética de crescimento da *Candida oleophila* baseou-se nos estudos prévios de cinética de crescimento da *Candida guilliermondii*, nos meios YMA, MBAR, MSA e MSB onde os dois primeiros apresentaram melhores resultados.

Em consequência disto, decidimos utilizar somente os dois primeiros meios (YMA e MBAR) para o estudo da cinética de crescimento da *Candida oleophila*.

Podemos notar que o perfil da velocidade específica de crescimento para a *Candida oleophila* é similar tanto para o meio YMA quanto para o meio MBAR. Nas condições apresentadas, observou-se para essa linhagem que a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) atingiu um valor máximo de  $0,67 \text{ h}^{-1}$  no meio YMA e enquanto no meio MBAR, a velocidade atingiu o valor máximo de  $0,36 \text{ h}^{-1}$ .

Este perfil de velocidade específica de crescimento foi observado quando as células se encontravam, em ambos os meios, na fase de crescimento exponencial após aproximadamente 4 horas do início do cultivo, coincidindo também suas fases de adaptação celular ao meio (fase lag)<sup>49</sup>.

Resguardadas todas essas semelhanças, optou-se por adotar o meio YMA como meio para o desenvolvimento do crescimento celular para a *Candida oleophila*. A razão dessa escolha deve-se principalmente, ao fato desse meio ter uma taxa de velocidade de crescimento 55% superior com relação ao meio MBAR, além de apresentar uma concentração celular duas vezes maior, num tempo de cultivo relativamente igual e um perfil de concentração celular semelhante ao que se refere a literatura.

Os valores de crescimento celular e velocidade máxima específica para os meios estudados encontram-se resumidos na Tabela 14.



**Tabela 14. Valores máximos de velocidade específica e concentração celular nos meios estudados após 18 h de cultivo da linhagem *Candida oleophila***

Meio de Crescimento	Concentração Celular (g/L)	Vel. Específica (h <sup>-1</sup> )
Ensaio S1 (YMA)	9,9	0,6742
Ensaio S2 (MBAR)	4,96	0,3597

#### 4.1.2 Curva de Crescimento da Linhagem *Candida Guilliermondii* nos Meios YMA, MBAR, MSA E MSB

Foram determinadas as curvas de crescimento para *Candida guilliermondii* CCT 2625 utilizando os meios de cultura YMA (ensaio S3), MBAR (ensaio S4), MSA (ensaio S5) e MSB (ensaio S6) em sistema descontínuo, utilizando as condições descritas na Tabela 15.

**Tabela 15. Descrição dos parâmetros utilizados nos ensaios S3, S4, S5 e S6**

Parâmetros	Ensaio S3	Ensaio S4	Ensaio S5	Ensaio S6
Meio de cultura	YMA	MBAR	MSA	MSB
Volume de meio (mL)	300	300	300	300
Duração (h)	48	48	48	48
Rotação (rpm)	200	200	200	200
Temperatura (°C)	28	28	28	28
Equipamento empregado	Incubador rotatório	Incubador rotatório	Incubador rotatório	Incubador rotatório

Os resultados experimentais referentes aos ensaios S3, S4, S5 e S6 estão indicados nas Tabelas 16 a 19 e Figuras 7 a 10.

Tabela 16. Valores obtidos de concentração celular no meio YMA com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S3

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,10
3	0,23
6	0,22
12	0,34
24	1,69
30	2,07
36	2,18
42	2,81
48	2,84

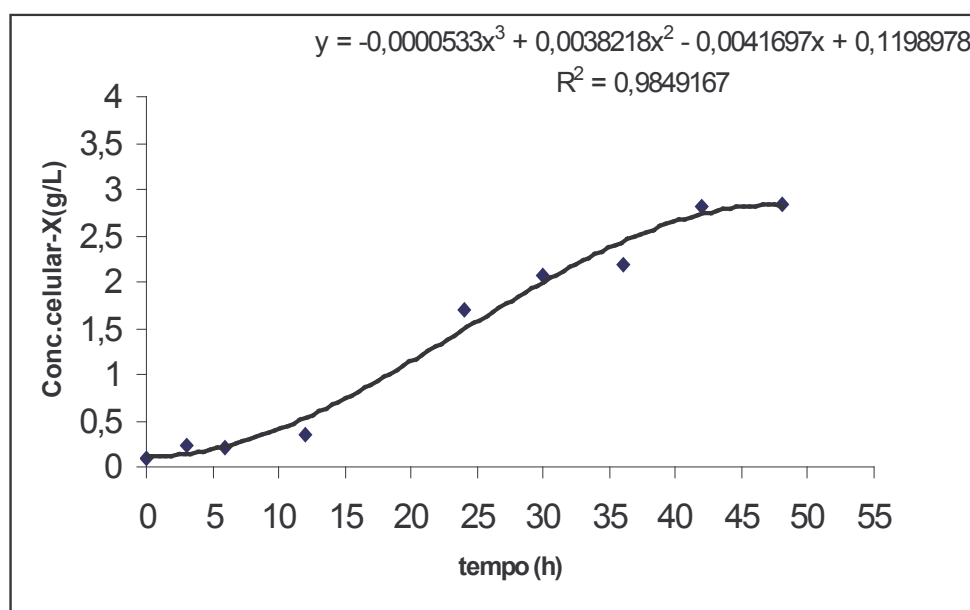


Figura 13. Concentração celular (♦) da linhagem *Candida guilliermondii* no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3

Tabela 17. Valores obtidos de concentração celular no meio MBAR com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S4

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,92
3	0,90
6	4,27
12	4,85
24	4,49
30	4,29
36	4,31
42	5,09
48	5,54

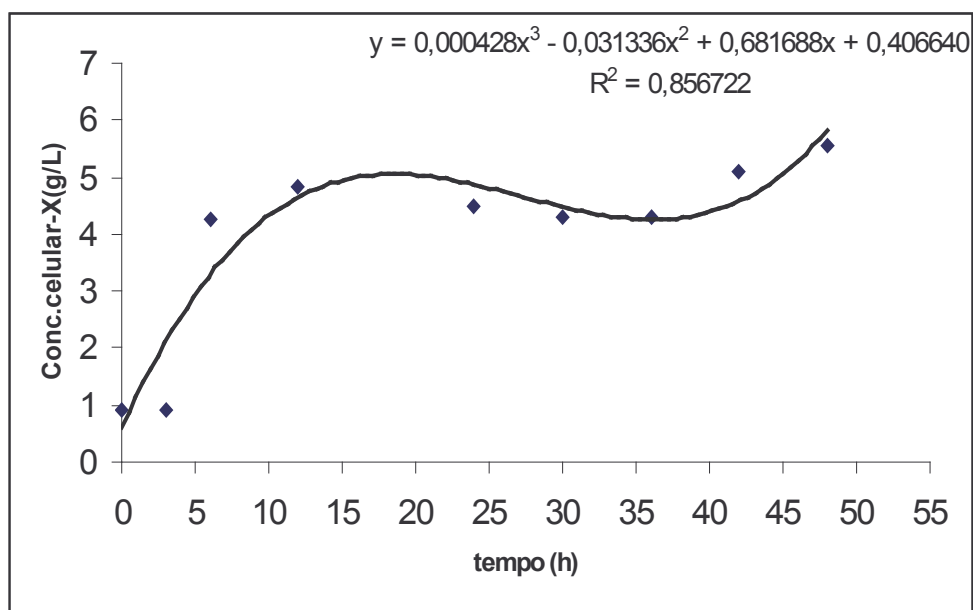


Figura 14. Concentração celular (♦) da linhagem *Candida guilliermondii* no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S4

Tabela 18. Valores obtidos de concentração celular no meio MSA com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S5

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,21
3	0,28
6	0,32
12	0,37
18	0,38
24	0,46
30	0,60
36	0,81
42	0,94
48	1,05

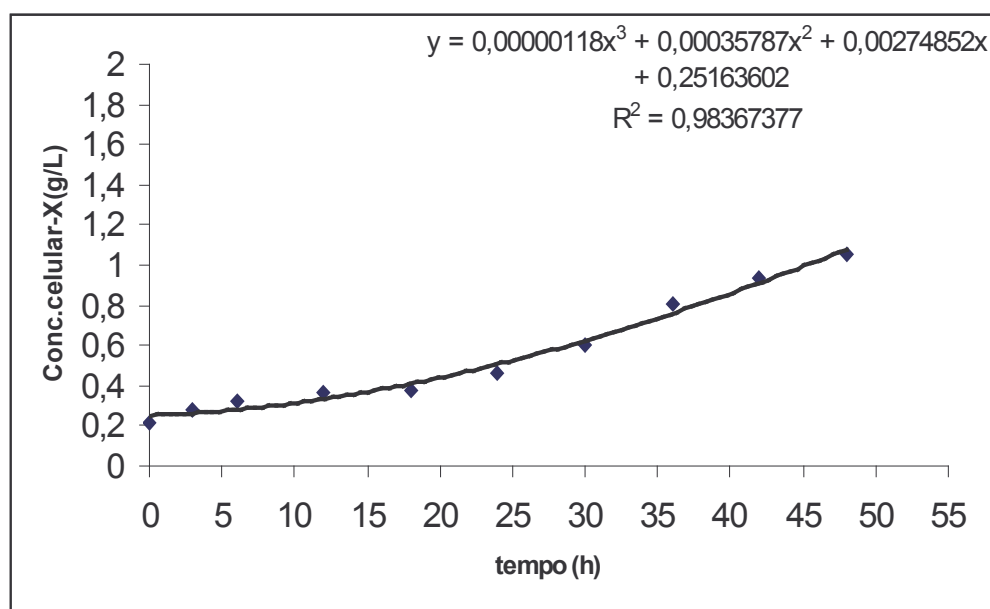


Figura 15. Concentração celular (♦) da linhagem *Candida guilliermondii* no meio MSA em função do tempo para o ensaio S5

Tabela 19. Valores obtidos de concentração celular no meio MSB com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S6

Tempo (h)	X (g/L)
0	0,05
3	0,07
6	0,10
12	0,15
18	0,19
24	0,26
36	0,54
48	0,59

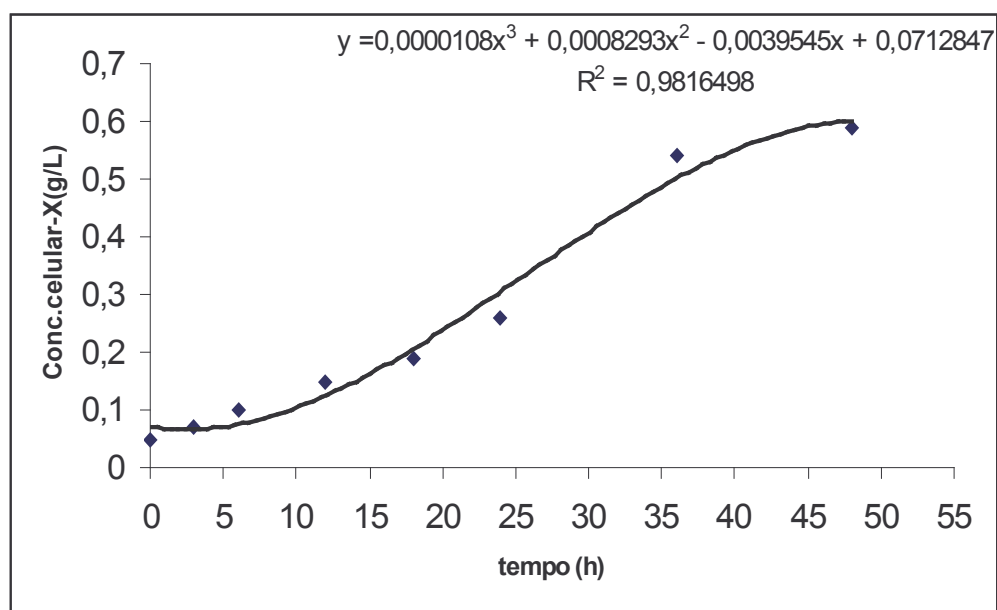


Figura 16. Concentração celular (♦) da linhagem *Candida guilliermondii* no meio MSB em função do tempo para o ensaio S6

Analisando as figuras da concentração celular versus tempo (Figuras 7 a 10), quando comparados os ensaios S5 e S6 com S3 e S4, nota-se que a concentração celular em 48 horas de cultivo entre os ensaios S5 e S6 não apresenta diferença expressiva ao passo que entre os ensaios S3 e S4, constatou-se que as células no meio YMA apresentaram um aumento de cerca de 28 vezes da concentração inicial e no meio MBAR apresentaram um aumento de 6 vezes do valor inicial.

Com base nos resultados de crescimento celular apresentados, verifica-se que o comportamento nos meios MSA (1,05 g/L) e MSB (0,59 g/L) diferem sob dois aspectos: quanto à concentração celular alcançada (56% maior para o meio MSA) e quanto ao perfil da curva de crescimento que para o meio MSB após 48 horas de cultivo está se encaminhando para a fase de declínio ou estacionária<sup>49</sup>, enquanto no meio MSA existe uma tendência à continuidade do crescimento celular. Como usamos o método da massa seca (item 3.2.5.2 - a) para a obtenção da concentração celular foi possível o monitoramento do processo ao longo de seu desenvolvimento, possibilitando escolher o tempo necessário para a sua duração.

A respeito dos ensaios S3 e S4, nota-se que a concentração celular para o meio MBAR (5,54 g/L) é 51% maior do que para o meio YMA (2,84 g/L), porém o perfil da curva de crescimento para o meio S4 difere do padrão esperado para a curva típica de crescimento celular. Como neste caso particular esse meio apresentava ácido ricinoleico que formava emulsão, isso pode ter prejudicado as amostras retiradas do caldo pois poderiam conter diferentes quantidades de ácido ricinoleico remanescente. Por isso os resultados apresentados para a concentração celular no meio de crescimento com o ácido ricinoleico foram desconsiderados devido sua infidedignidade. Já o meio YMA apresentou maior concentração celular em condições aceitáveis de cultivo e o perfil de curva de crescimento dentro do padrão esperado.

Vale ressaltar que todos os meios de cultura que continham ácido ricinoleico em sua composição apresentaram um comportamento bastante diferenciado dos outros meios. Julgamos que isso tenha ocorrido por dois

motivos principais: a baixa miscibilidade do ácido ricinoleico no meio de cultura que é aquoso e menor biodisponibilidade do ácido graxo comparada ao seu respectivo éster para a biotransformação com as linhagens utilizadas.

Estudos realizados por Lee<sup>37</sup> com o mesmo substrato, demonstraram que a adição do ácido ricinoleico ao meio de crescimento com *S. salmonicolor* logo no início do cultivo, diminuiu significativamente a população de microrganismos disponíveis. Também a população de *S. odor* diminuiu enquanto a concentração de ácido ricinoleico aumentou no meio de cultivo<sup>50</sup>. Além disso, o rendimento de gamadecalactona produzido pela *S. salmonicolor* após 4 dias de cultivo no meio suplementado com 0,06% de ácido ricinoleico foi 66,4 mg/L, maior do que no meio sem adição. Por outro lado, quando se aumentou a concentração do ácido ricinoleico resultou num decréscimo nos rendimentos de gamadecalactona (GDL) produzida pelas células de *S. salmonicolor*.

O meio YMA, apresenta similaridade quanto ao perfil do crescimento celular encontrado na literatura em estudos de bioconversão para a mesma linhagem<sup>8</sup>.

Inicialmente, usamos 15 horas como tempo de crescimento microbiano máximo, mas ao analisar as diversas curvas de crescimento observamos que este tempo sofria variações. Por isso, implementamos os cálculos de velocidade específica nas diversas rotas de crescimento, como primeira ação para otimização do processo.

A partir dos perfis de concentração celular da linhagem *Candida guilliermondii* nos meios YMA, MBAR, MSA e MSB, foram determinadas as velocidades específicas de crescimento celular representadas nas Tabelas 20 a 23 e Figuras 11 a 14, destacando as fases de crescimento através das linhas verticais pontilhadas.

Tabela 20. Valores obtidos de concentração celular e da velocidade específica da linhagem *Candida guilliermondii* cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ ( $h^{-1}$ )
0	0,10	0,0000
3	0,23	0,0000
6	0,22	0,0964
12	0,34	0,1878
24	1,69	0,0761
30	2,07	0,0499
36	2,18	0,0303
42	2,81	0,0123
48	2,84	0,0000

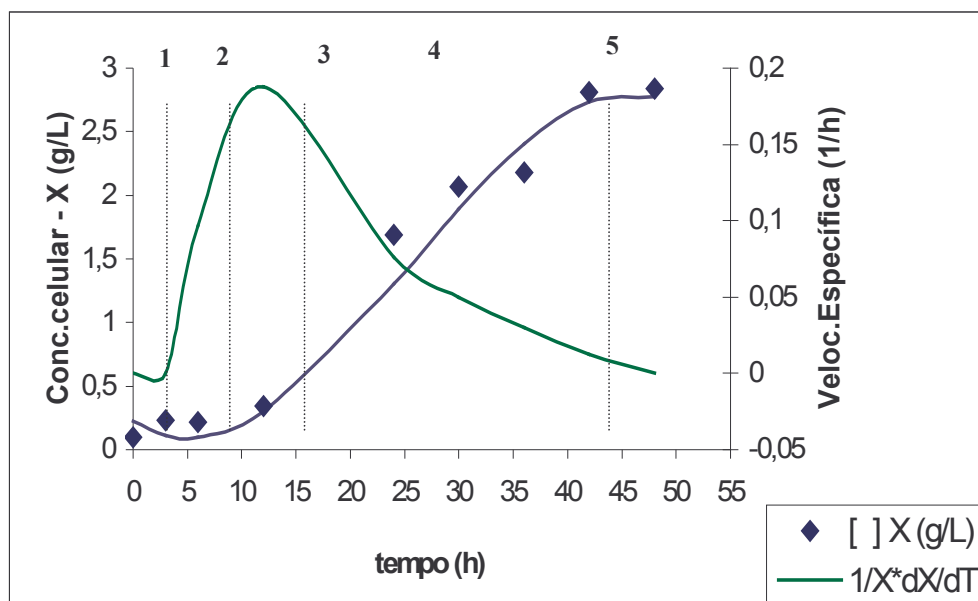


Figura 17. Representação da concentração celular (◆) e da velocidade específica (—) da linhagem *Candida guilliermondii* cultivada no meio YMA em função do tempo para o ensaio S3



Tabela 21. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MBAR com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S4

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,92	1,6764
3	0,90	0,2316
6	4,27	0,1017
12	4,85	0,0238
24	4,49	0,0000
30	4,29	0,0000
36	4,31	0,0208

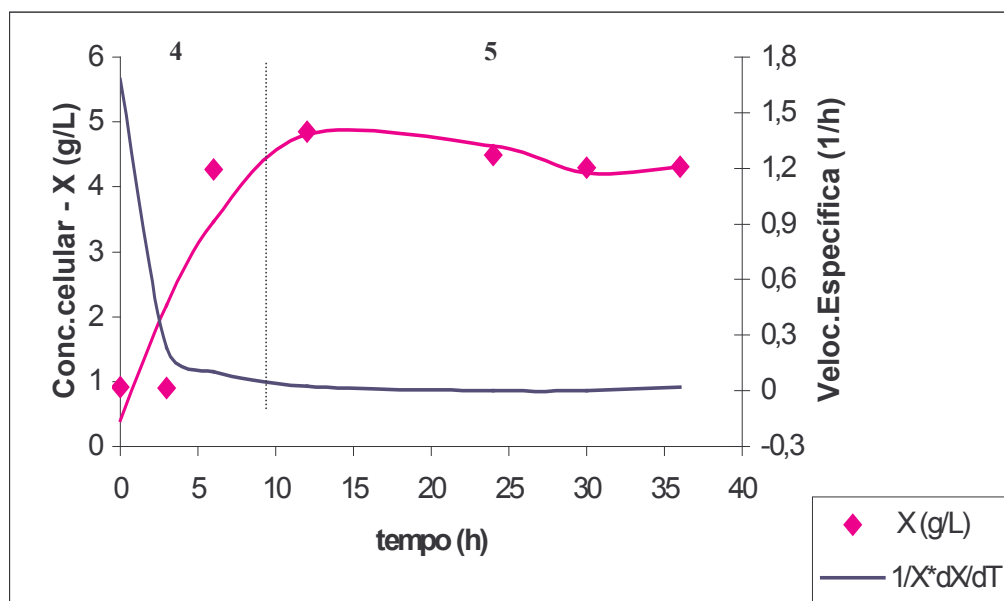


Figura 18. Representação da concentração celular (♦) e da velocidade específica (—) da linhagem *Candida guilliermondii* cultivada no meio MBAR em função do tempo para o ensaio S4

Tabela 22. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MSA com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S5

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,21	0,0109
3	0,28	0,0185
6	0,32	0,0246
12	0,37	0,0324
18	0,38	0,0353
24	0,46	0,0352
30	0,60	0,0337
36	0,81	0,0315
42	0,94	0,0292
48	1,05	0,0267

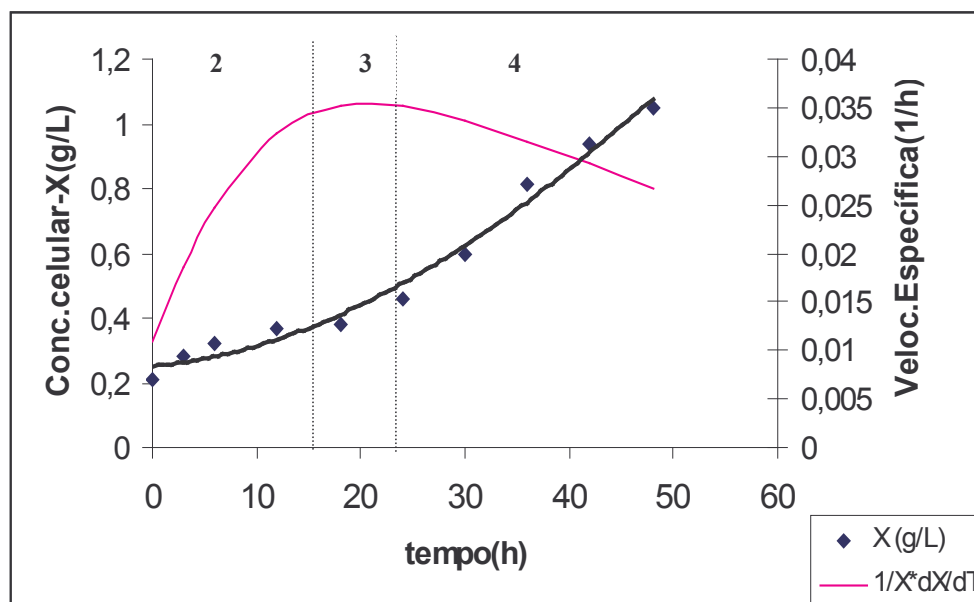


Figura 19. Representação da concentração celular (♦) e da velocidade específica (—) da linhagem *Candida guilliermondii* cultivada no meio MSA em função do tempo para o ensaio S5

Tabela 23. Valores obtidos de concentração celular e de velocidade específica no meio MSB com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo para o ensaio S6

Tempo (h)	X (g/L)	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,05	0,0000
3	0,07	0,0109
6	0,10	0,0643
12	0,15	0,0905
18	0,19	0,0748
24	0,26	0,0564
36	0,54	0,0275
48	0,59	0,0017

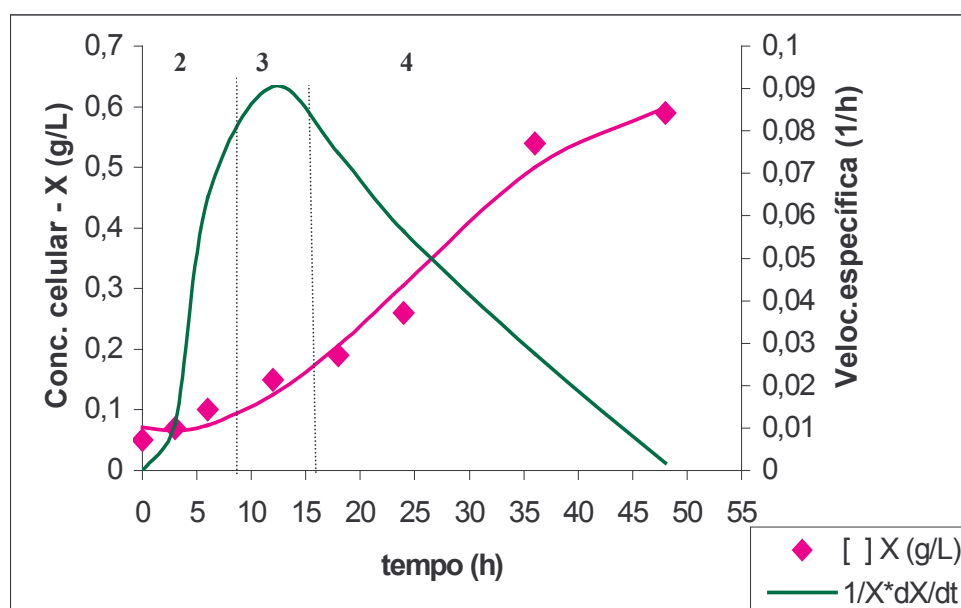


Figura 20. Representação da concentração celular (♦) e da velocidade específica (–) da linhagem *Candida guilliermondii* cultivada no meio MSB em função do tempo para o ensaio S6

A velocidade específica de crescimento atingiu um valor máximo de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  no meio YMA;  $1,68 \text{ h}^{-1}$  no meio MBAR;  $0,15 \text{ h}^{-1}$  no meio MSA e  $0,09 \text{ h}^{-1}$  no meio MSB. Quanto à concentração celular, o último meio apresentou a menor concentração em biomassa ( $0,54 \text{ g/L}$ ). Além de demonstrar um perfil de aumento celular após 48 horas de cultivo (Figura 14) , ressaltamos que as células do meio MSB continuam se multiplicando porém com velocidade cada vez menor.

Os meios salinos MSA e MSB foram adotados com adição de extrato de levedura ( $3 \text{ g/L}$ ), a fim de incrementar o meio de cultivo utilizado por Endrizzi<sup>8</sup>, igualando às quantidades de extrato de levedura do meio YMA utilizado nesse trabalho.

A partir deste comportamento, ressalta-se que a velocidade máxima de crescimento celular no meio YMA, coincide com a fase exponencial de crescimento que ocorre em torno de 12 horas de cultivo.

Já no meio MBAR e meio MSA o perfil da velocidade específica de crescimento apresenta um comportamento do tipo decrescente ao longo do crescimento que pode ser observado nas Figuras 12 e 13. Para o meio MBAR, o comportamento de redução na velocidade máxima de crescimento celular pode ter ocorrido, devido à fácil adaptação das células ao meio, impossibilitando o monitoramento de todas as fases de crescimento ao longo do desenvolvimento celular.

Baseados nesta análise e em estudos desenvolvidos por Dias (2001)<sup>51</sup>, em meio de cultivo similar ao desse trabalho e usando a mesma linhagem, identificou-se que o meio YMA apresentou melhores condições para o desenvolvimento do crescimento celular com a linhagem *Candida guilliermondii* o mesmo acontecendo para a *Candida oleophila*.

Os valores de velocidade específica para os meios estudados encontram-se resumidos na Tabela 24.

**Tabela 24. Valores máximos de velocidade específica e concentração celular encontrados nos meios estudados em 48 horas de cultivo da linhagem *Candida guilliermondii***

Meio de crescimento	Concentração celular (g/L)	Velocidade específica ( $h^{-1}$ )
Ensaio S3 (YMA)	2,18	0,1878
Ensaio S4 (MBAR)	4,31	1,6764
Ensaio S5 (MAS)	0,81	0,1524
Ensaio S6 (MSB)	0,54	0,0906

Esse mesmo microrganismo em condições similares de cultivo<sup>51</sup>, mostrou valores de velocidade máxima específica inferiores ao desse trabalho, pois no trabalho de Dias, o valor encontrado foi  $0,029 h^{-1}$ .

Após a análise dos dados obtidos estabeleceu-se como 15 horas (correspondente a fase exponencial de crescimento) o tempo de cultivo em incubador rotatório para o preparo do inóculo para o meio de biotransformação e a utilização do meio YMA como meio de cultivo para desenvolver o crescimento celular.

#### **4.1.3 Avaliação da Relação entre Linhagem Utilizada e Crescimento Celular**

Analisando-se os perfis do comportamento do crescimento celular e do comportamento cinético das duas leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*, constatamos que ambas possuem bem definidas todas as fases inerentes ao processo de crescimento celular<sup>49</sup> principalmente no meio YMA.

Ressaltamos que a linhagem *Candida oleophila* atinge uma velocidade específica máxima de crescimento igual a  $0,6742 h^{-1}$  após 3 horas do início do cultivo no meio YMA coincidindo com a fase exponencial de crescimento celular conforme indicado na Tabela 14. Para a linhagem *Candida guilliermondii*, a velocidade específica máxima de crescimento atinge um valor

igual a  $0,1878 \text{ h}^{-1}$  e também coincide com a fase de crescimento exponencial da levedura, ocorrendo contudo após 12 horas do início do cultivo (Tabela 24).

Observa-se que o perfil cinético das duas leveduras é semelhante, porém a adaptação da linhagem *Candida oleophila* ao meio de crescimento ocorreu mais rapidamente e a concentração de biomassa foi 70% maior (ou 3 vezes) ao término do cultivo, representando maior eficiência para o processo de crescimento celular em comparação com a linhagem *Candida guilliermondii*.

#### 4.1.4 Comportamento do pH nos Diferentes Meios de Crescimento

Sabe-se que a proporção de lactonização pode depender da acidificação causada no meio de cultura pelas leveduras. Durante a incubação, as espécies podem ser capazes de acidificar o meio, mas este não é um fator limitante para a produção de gamadecalactona (GDL) para algumas linhagens. Estudos mostram que algumas linhagens de *Candida* (*Candida famata* e *Candida succiphila*) não produzem nenhuma gamadecalactona (GDL) no meio não acidificado, outras como a *Pichia guilliermondii* produzem a mesma quantidade de gamadecalactona (GDL) no meio com ou sem acidificação<sup>8</sup>.

Neste trabalho o pH foi monitorado ao longo do tempo para os quatro meios utilizados para crescimento celular da *Candida guilliermondii* além daquele desenvolvido durante as biotransformações das linhagens estudadas.

Observou-se o mesmo pH inicial ( em torno de 6,7) para os meios MSA e MSB, ocorrendo um ligeiro aumento no pH do meio MSB entre 24 e 30 h (Tabela 25) , com um abaixamento subsequente até 48 h, chegando em torno de pH=6,65. Já para o meio MSA, ocorreu um declínio regular e constante do início ao final das 48h, atingindo um pH de 5,8.

Observou-se que houve uma diminuição no valor do pH de 7,66 para 5,92 e de 7,17 para 6,30 para os meios YMA e meio MBAR, respectivamente. Notou-se uma pequena oscilação no comportamento do pH do meio MBAR, provavelmente ocasionada pela presença do ácido ricinoleico no meio de crescimento. Este meio foi preparado para avaliar como seria o perfil de

crescimento tendo o substrato – ácido ricinoleico – como única fonte de carbono e como seria a adaptação celular ao mesmo.

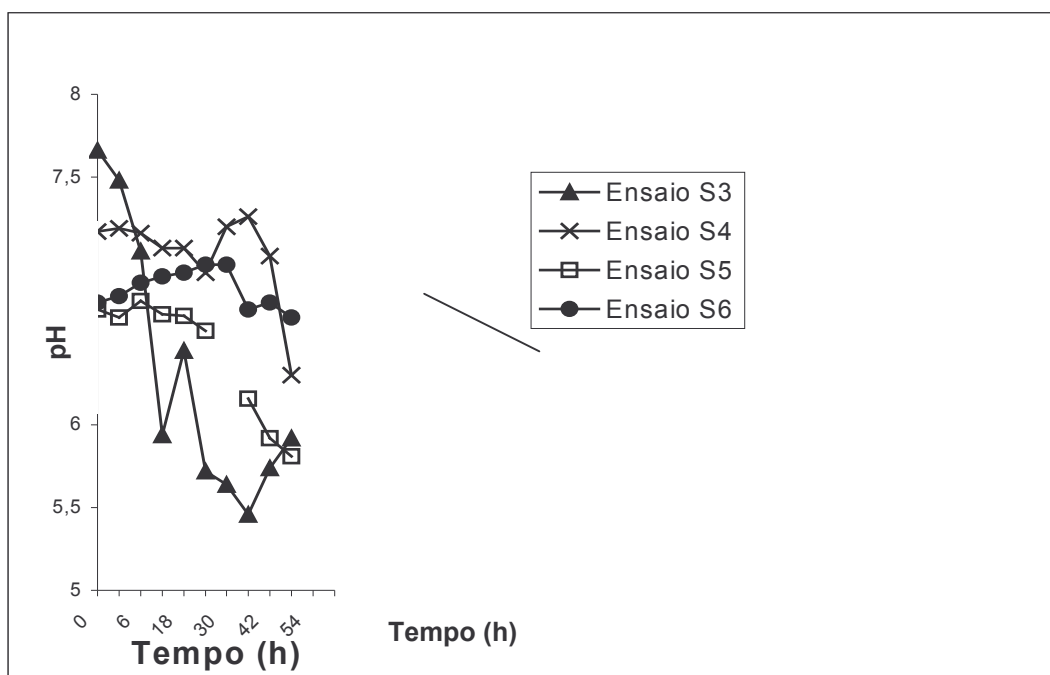
Comparando-se com trabalhos já desenvolvidos com outras linhagens de leveduras, o comportamento do pH da *Candida guilliermondii* nos meios estudados ficou dentro do esperado, embora para as *Candidas* exploradas por OKUI (1963)<sup>7</sup> – entre elas a *Candida guilliermondii* – o valor do pH do meio variou de pH inicial de 6,8; 6,4 após 48h; e 7,8 após 72h, contrariando os resultados obtidos nesse trabalho.

Já ENDRIZZI (1995)<sup>8</sup> obteve importantes variações de pH com a *Candida intermedia*: um pH inicial de 5,6 que alcançou em torno de 3,0 após 48h de incubação. No caso dos estudos de CHEETHAM (1990)<sup>52</sup>, os microrganismos *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces odorus*, o crescimento celular foi ótimo a pH 6,5 – 7,0, mas para a produção de gamadecalactona (GDL), ocorreu a pH alcalino (7,5-8,5).

Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 25.

**Tabela 25. Valores de pH encontrados nos meios de crescimento utilizados com a linhagem *Candida guilliermondii* em função do tempo**

Tempo (h)	pH Ensaio S3 (YMA)	pH Ensaio S4 (MBAR)	pH Ensaio S5 (MSA)	pH Ensaio S6 (MSB)
0	7,66	7,17	6,7	6,74
3	7,48	7,19	6,65	6,78
6	7,05	7,16	6,75	6,86
12	5,94	7,07	6,67	6,9
18	6,45	7,07	6,66	6,92
24	5,72	6,92	6,57	6,97
30	5,64	7,20	6,44	6,97
36	5,46	7,26	6,16	6,7
42	5,74	7,02	5,92	6,74
48	5,92	6,30	5,81	6,65
<b>Variação</b>	6,31 ± 0,81	7,04 ± 0,28	6,43 ± 0,37	6,82 ± 0,12



**Figura 21.** Representação dos valores de pH encontrados nos diferentes ensaios com os meios de crescimento utilizados com *Candida guilliermondii*

A partir de uma interpretação biotecnológica, para a análise dos resultados acima, podemos observar que os pHs sofreram pequenas variações ao longo do crescimento celular, nos quatro meios estudados concluindo que não alteram os perfis dos comportamentos ao longo dos ensaios. Conforme vários estudos já desenvolvidos<sup>8,51,52</sup>, essas leveduras podem atuar numa determinada faixa de pH sem prejuízo para o rendimento da concentração celular.

Por este motivo, não repetimos o monitoramento durante o crescimento celular com a linhagem *Candida oleophila*, comportamento confirmado pelo estudo desenvolvido por OKUI<sup>7</sup> que também não detectou uma alteração significativa do pH no meio de crescimento.



#### 4.1.5 Comportamento do pH nos Diferentes Meios na Fase de Biotransformação

Quanto ao comportamento do pH durante a fase de biotransformação, isto é, durante a degradação de um substrato por um determinado microrganismo, observou-se uma similaridade quanto ao pH inicial de cultivo da *Candida oleophila* (em torno de 6,2) utilizando como substrato tanto o ácido ricinoleico quanto o ricinoleato de metila (rotas COAR e CORM). A variação de pH ocorrida ao longo da biotransformação foi desprezível.

Já no ensaio envolvendo a *Candida guilliermondii* utilizando os mesmos substratos, isto é, ácido ricinoleico (CGAR) e ricinoleato de metila (CGRM), o primeiro inóculo iniciou com pH=6,7 e o segundo com pH=5,5, diferentemente do ocorrido durante o crescimento celular, os pHs dos meios de biotransformação sofreram um ligeiro aumento, atingindo pH=7,0 em ambas as rotas, não saindo da faixa de pH em que normalmente ocorre a biotransformação quando se utiliza leveduras.

A análise do comportamento do pH nos diferentes meios de biotransformação encontra-se resumida na Tabela 26.

**Tabela 26. Valores de pH encontrados no meio de biotransformação para os ensaios COAR, CORM, CGAR e CGRM**

Tempo (h)	pH Ensaio G1 (COAR)	pH Ensaio G2 (CGAR)	pH Ensaio G3 (CORM)	pH Ensaio G4 (CGRM)
0	6,34	6,74	6,2	5,43
12	6,46	6,69	6,24	5,49
18	6,48	6,72	6,18	5,65
24	6,51	6,77	5,88	6,12
36	6,52	6,71	5,65	6,17
48	6,52	7,04	5,87	6,93
<b>Variação</b>	6,41 ± 0,11	6,78 ± 0,13	6,00 ± 0,24	6,07 ± 0,56

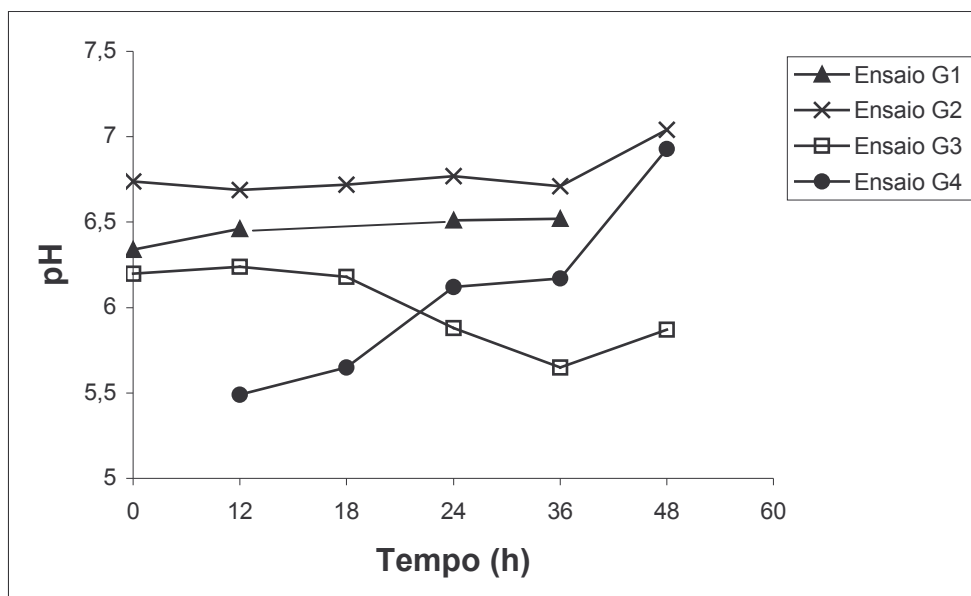


Figura 22. Representação da variação do pH para os ensaios COAR, CORM, CGAR e CGRM

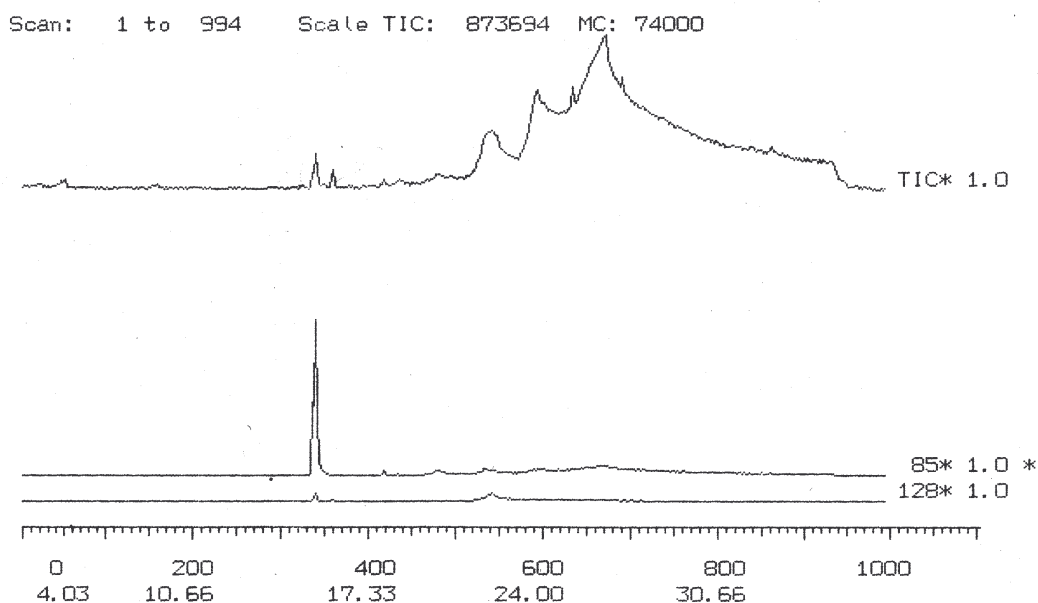
#### 4.2 DETECÇÃO DA GAMADICALACTONA PRODUZIDA NA BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO E DO RICINOLEATO DE METILA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Uma vez determinadas e otimizadas as condições para o melhor tempo de desenvolvimento do crescimento celular e comportamento do pH dos meios de crescimento e biotransformação, o próximo passo foi a detecção por cromatografia gasosa da possível presença de gamadecalactona produzida pela biotransformação do ácido ricinoleico e do ricinoleato de metila utilizando *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

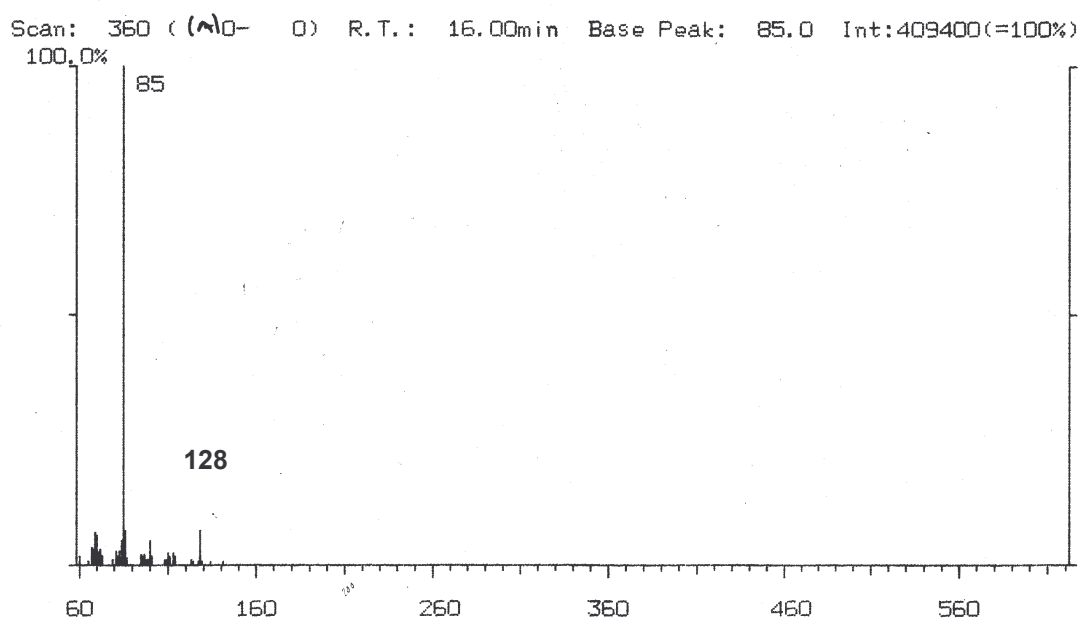
Todas as amostras submetidas à análise por cromatografia gasosa foram preparadas retirando-se alíquotas do meio de biotransformação a diferentes tempos ( $t = 0h$ ,  $t = 12h$ ,  $t = 18h$ ,  $t = 24h$ ,  $t = 36h$ ,  $t = 48h$ ), acidificadas e lactonizadas a quente, seguindo o procedimento adotado por OKUI<sup>7</sup>, pois espera-se que o ácido 4-hidroidecanóico resultante da  $\beta$ -oxidação do ácido ricinoleico, sofra lactonização após o processo de biotransformação. Este procedimento foi adotado quando utilizamos as leveduras *Candida oleophila* e

*Candida guilliermondii*. Porém, com o desenvolvimento da biotransformação nos meios MBAR (meio de biotransformação com ácido ricinoleico) e MBRM (meio de biotransformação com ricinoleato de metila) pela *Candida guilliermondii*, nenhum sinal referente à formação de gamadecalactona foi detectado.

Para as amostras retiradas do meio de biotransformação utilizando a levedura *Candida oleophila*, quando o mesmo apresentava como substrato o ácido ricinoleico, observou-se a formação de gamadecalactona nas amostras coletadas nos tempos: 30 min., 10 h, 18 h, 24 h e 34 h. O cromatograma da amostra coletada no tempo 24h, é mostrada na Figura 17; os demais são semelhantes.

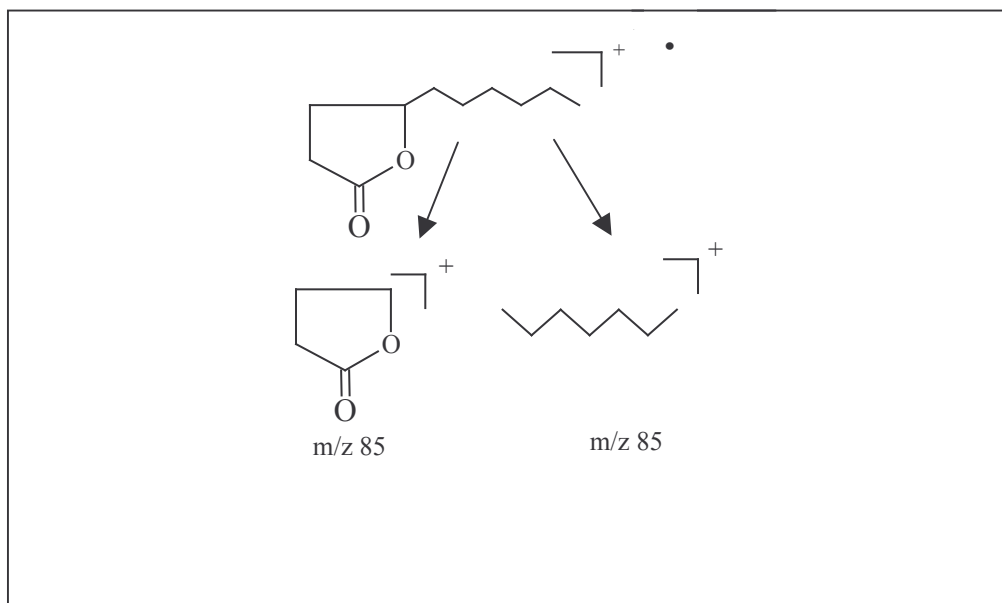


**Figura 23.** Cromatograma da amostra coletada no t=24h no meio de biotransformação com a linhagem *Candida oleophila* e o ácido ricinoleico



**Figura 24. Espectro de massa da gamadecalactona padrão**

Observou-se um discreto aumento no pico correspondente à gamadecalactona (tempo de retenção 15,90 min.) com o passar do tempo. Após 48h não há mais sinais de gamadecalactona (GDL), o que sugere que a lactona formada no caldo de fermentação foi totalmente consumida ou degradada. Os cromatogramas das amostras foram comparados com aquele utilizando-se padrão de gamadecalactona, cujo espectro de massa está representado na Figura 18. O espectro de massa da gamadecalactona (GDL), não apresenta íon molecular  $[M^{+}]$  em  $m/z = 170$ , sendo que o pico base aparece a  $m/z = 85$ , correspondente a fragmentação da gamadecalactona em duas partes, conforme Esquema 5.



**Figura 25. Fragmentação da gamadecalactona em dois picos base de  $m/z = 85$  u.m.a.**

Outro pequeno pico em  $m/z = 128$ , corresponde a perda do fragmento iônico  $m/z = 42$ , provavelmente correspondente ao fragmento  $\text{CH}_2 = \text{C}=\text{O}$  (ceteno). Não se quantificou a gamadecalactona (GDL) formada.

Como as análises cromatográficas realizadas com o ácido ricinoleico não revelaram presença expressiva de gamadecalactona (GDL) no meio de biotransformação, decidiu-se utilizar como substrato o ricinoleato de metila, baseado nos estudos realizados por Endrizzi<sup>8</sup> e pela maior biodisponibilidade apresentada por esse substrato quando está presente no meio de biotransformação.

A biotransformação do ricinoleato de metila nesse trabalho, ocorreu da mesma forma já mencionada para o ácido ricinoleico, centrifugando as células do meio de crescimento e transportando-as para o meio de biotransformação.

Após um período pré-determinado de 15h de crescimento celular, já no meio de biotransformação foram retiradas alíquotas de 20 mL nos tempos: 0h, 12h, 18h, 24h, 36h e 48h, respeitando-se o limite de 10% de conteúdo retirado de cada frasco de fermentação, porém não foi detectada nenhuma produção de gamadecalactona (GDL) por cromatografia gasosa nas condições experimentais adotadas.

Em um dos trabalhos de Okui <sup>7</sup>, o ricinoleato de metila permite o crescimento da *Candida intermedia*, mas as linhagens *C.molischiana* e *C.rhagii* que produzem lactona, não são capazes de manter suas biomassas (diminuição da massa seca durante a incubação). Para estas linhagens, a degradação do ricinoleato de metila pela  $\beta$ -oxidação poderia estar sendo bloqueada na etapa do ácido 4-hidroxicanônico, que é lactonizada a gamadecalactona (GDL) ou na etapa do ácido 2-hidroxiocanônico.

Como o ricinoleato de metila é a única fonte de carbono no meio de bioconversão, ele pode, dependendo da espécie de levedura, ser usado somente para produção de biomassa e/ou para produção de gamadecalactona (GDL). Como exemplo, podemos citar a *Candida famata* que utiliza-o para suprir a energia necessária para o crescimento porém não o converte em composto aromático enquanto a *Pichia guilliermondii* parece apenas convertê-lo a gamadecalactona (GDL), embora os rendimentos não sejam muito expressivos. Estudos realizados por Endrizzi e sua equipe<sup>8</sup> (Laboratoire de Biotechnologie, Dijon, France), mostraram que o consumo de aproximadamente 3g/L de ricinoleato de metila permite a produção de 200 mg/L de gamadecalactona (GDL) pela *Pichia guilliermondii* e somente 40 mg/L pela *Candida intermedia*. Em vista deste panorama, tem-se subsídios para o fato de o ricinoleato de metila não ser metabolizado a gamadecalactona (GDL) pela *Candida oleophila*.

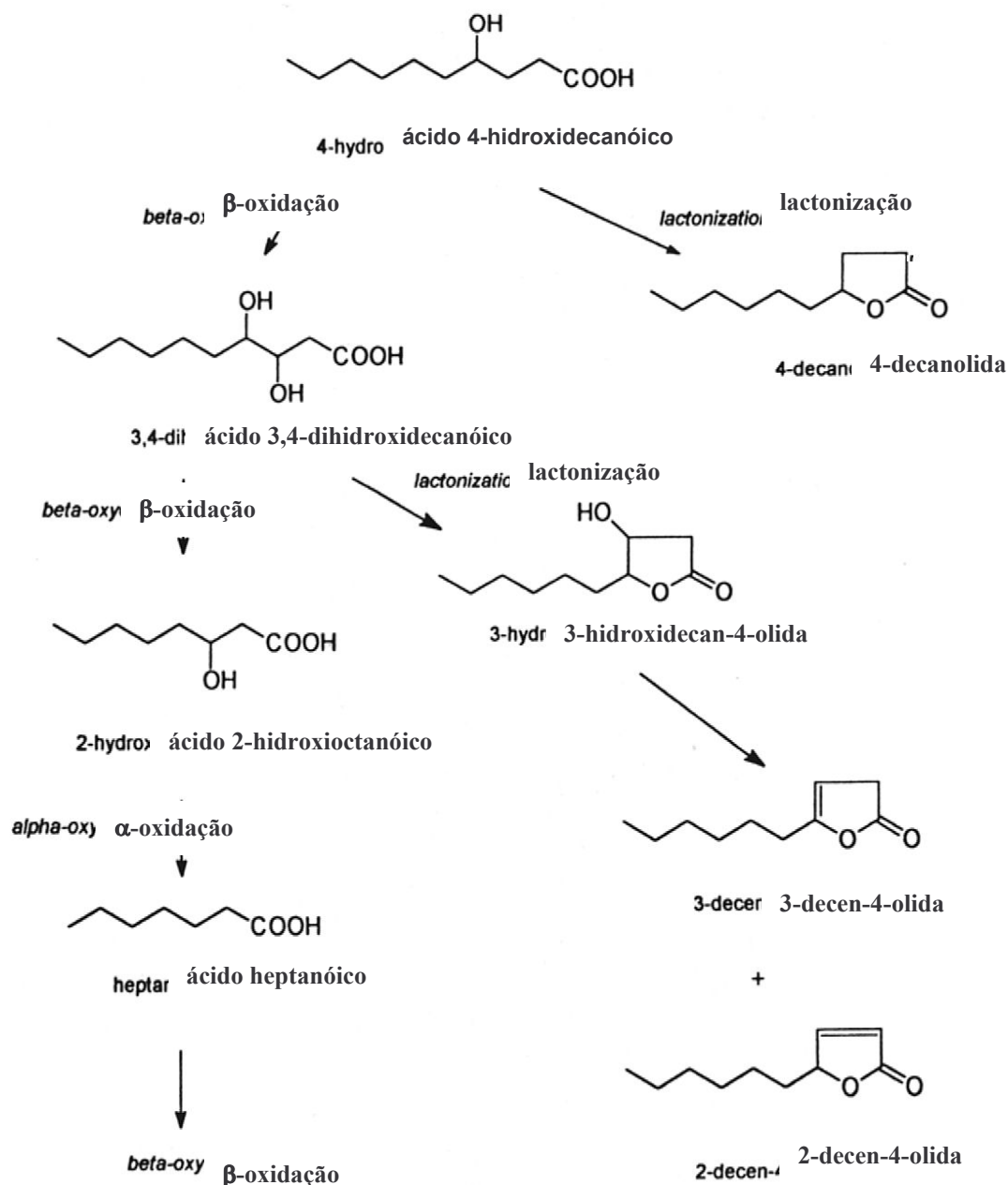
Outra hipótese é que algumas linhagens podem não possuir a capacidade de produzir a lactona<sup>6,7,8,53</sup>. Outras linhagens como, por exemplo, a *C. intermedia* é capaz de consumir a gamadecalactona após tê-la produzido; a *C. succiphila* não parece utilizar o ricinoleato de metila nem para o crescimento celular nem para a produção de gamadecalactona e a *C. famata* utiliza-o como suplemento energético para seu crescimento.

Uma dúvida então recai sobre o consumo total do ácido ricinoleico, a saber: se inicialmente foram colocados 10 g/L de ácido ricinoleico no meio de biotransformação e o rendimento final da lactonização não corresponde a esta concentração, quais as possíveis causas do consumo e/ou desaparecimento deste ácido ?

A literatura cita que a baixa produção de gamadecalactona (GDL)<sup>54</sup> em alguns casos deve-se ao fato de o ácido ricinoleico ser a única fonte de C em alguns meios de biotransformação, como é o caso desse trabalho, daí parte deste ácido é usado para manutenção do crescimento das funções celulares. A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de crescer durante a biotransformação.

Outros estudos<sup>36</sup> ainda evidenciaram que o ácido ricinoleico pode ser facilmente convertido ao ácido 4-hidroxidecanóico ou a gamadecalactona, porém por causa da grande toxicidade do ácido graxo livre, deve-se tomar grande cuidado na sua adição para a fermentação.

Observou-se no trabalho de Gatfield<sup>58</sup> que o ácido 4-hidroxidecanóico formado pode além de formar a gamadecalactona, seguir outras duas rotas para formação da 2-decen-4-olida ou sofrer  $\beta$ -oxidação com *Candida lipolytica*, como mostra o Esquema 6, o que pode contribuir para o baixo rendimento da gamadecalactona (GDL).



Esquema 5. Diferentes formas de degradação do ácido 4-hidrosidecanóico por leveduras.

Outro fator que pode ter contribuído para a não detecção ou baixa produção da gamadecalactona (GDL) foi a utilização de sistema descontínuo neste trabalho. Maume<sup>36</sup> observou que a produção de gamadecalactona (GDL) foi alta quando o substrato (óleo de rícino) estava presente desde o começo da fermentação e continuou sendo adicionado em estágios mais adiantados,



tornando a fermentação estável. Isto demonstra que o processo da  $\beta$ -oxidação e o consumo do ácido graxo podem ocorrer através de indução contínua.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO RICINOLEICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Construiu-se curvas de calibração para o ácido ricinoleico, uma vez otimizadas as condições de detecção por cromatografia gasosa para avaliar a quantidade de ácido ricinoleico remanescente no meio de cultura.

Através das curvas padrões objetivou-se avaliar a quantidade de ácido ricinoleico (convertido a ricinoleato de metila) remanescente no meio de biotransformação.

Não foi possível detectar o ácido ricinoleico por cromatografia gasosa devido a coluna disponível do aparelho não ser apropriada para quantificar ácidos carboxílicos. Portanto as amostras que continham ácido ricinoleico foram esterificadas e silanizadas antes de submetidas à detecção<sup>41</sup>. Tanto para os processos de crescimento quanto para os de biotransformação, preferiu-se a utilização do éster derivado do ácido ricinoleico.

As curvas analíticas foram obtidas pelo método do padrão interno<sup>55</sup>, por ser um método que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais como temperatura da coluna, fluxo do gás de arraste, quantidade de amostra e conhecimento exato dos volumes injetados, que prejudiquem a análise quantitativa.

O padrão interno utilizado foi o estearato de metila (item 3.2.7.6) do qual foram adicionados 100 $\mu$ L a cada solução de gamadecalactona e ácido ricinoleico esterificado a ser injetada para construção da curva de calibração.

A faixa de concentração usada para construir a curva analítica foi de 50 a 250 mg.L<sup>-1</sup> para a  $\gamma$ -decalactona e de 100 a 500 mg.L<sup>-1</sup> para o ricinoleato de metila. As soluções foram injetadas em triplicata e calculado o desvio padrão e o desvio padrão relativo<sup>57</sup>. Os baixos valores de desvio padrão relativo demonstram que foi obtida uma boa precisão das medidas. Após determinadas

as áreas dos picos, foram construídos gráficos relacionando-se a razão entre a área do analito e a área do padrão interno ( $A_a/A_{PI}$ ) contra a massa do analito dividida pela massa do padrão interno ( $m_a/m_{PI}$ ). O programa estatístico utilizado para construir os gráficos e encontrar as equações da reta foi o Origin 4.1.

As curvas de calibração encontradas para cada solução estão representadas pelas Tabelas 27 e 28 e Figuras 19 e 20.

**Tabela 27. Relação de  $A_a/A_{PI}$  e  $m_a/m_{PI}$  das soluções de ácido ricinoleico injetadas em triplicata para a construção da curva analítica usando método de padronização interna.**

$(m_a/m_{PI})^a$	$(A_a/A_{PI})^b$			Média	DP <sup>c</sup>	DPR <sup>d</sup>
1	0,522	0,503	0,515	0,5133	$9,99 \times 10^{-3}$	1,94
2	1,288	1,212	1,175	1,226	$5,48 \times 10^{-2}$	4,46
3	1,865	1,861	1,829	1,851	$4,46 \times 10^{-2}$	1,79
4	2,447	2,558	2,480	2,480	$2,25 \times 10^{-2}$	0,90
5	3,268	3,165	3,180	3,180	$1,17 \times 10^{-1}$	3,67

<sup>a</sup> $m_a$ -massa do ricinoleato de metila

<sup>a</sup> $m_{PI}$  – massa do padrão interno

<sup>b</sup> $A_a$ - área do ricinoleato de metila

<sup>b</sup> $A_{PI}$ - área do padrão interno

<sup>c</sup>DP – desvio padrão

<sup>d</sup>DPR – desvio padrão relativo

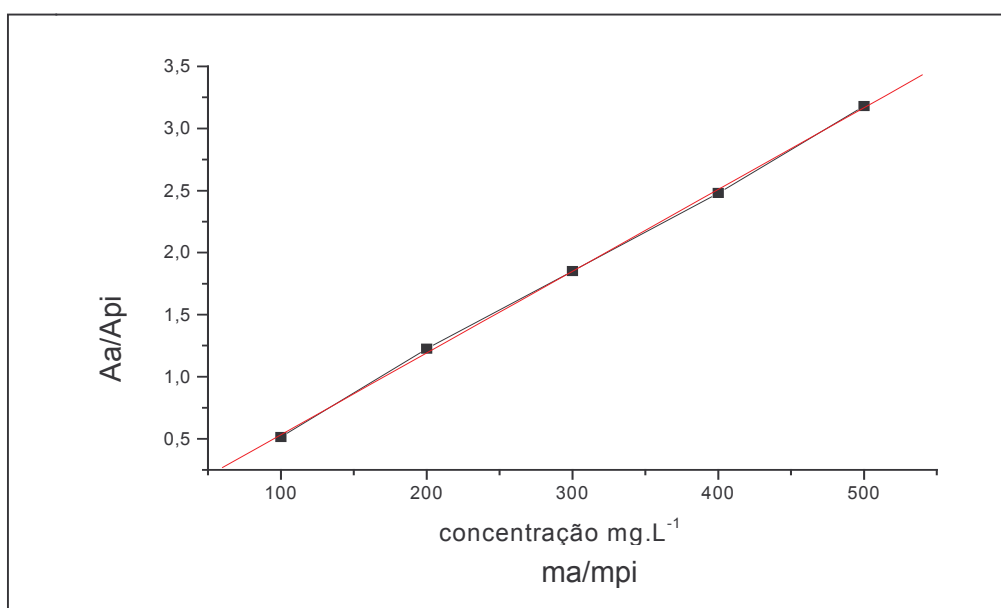


Figura 26. Curva analítica do ácido ricinoleico (como ricinoleato de metila) na faixa de concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> até 500 mg.L<sup>-1</sup> usando o método de padronização interna. O padrão interno utilizado foi o estearato de metila.

A equação da reta obtida através dos dados acima é (3)

$$Y = -0,12616 + 0,65874 x$$

$$R = 0,99971$$

$$\text{desvio padrão relativo} = 0,02921$$

Tabela 28. Relação de A<sub>a</sub>/A<sub>PI</sub> e m<sub>A</sub>/m<sub>PI</sub> das soluções de gamadecalactona na faixa de concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> até 250 mg.L<sup>-1</sup> injetadas em triplicata para a construção da curva analítica usando o método de padronização interna.

(ma/mpi) <sup>a</sup>	(Aa/A <sub>PI</sub> ) <sup>b</sup>			Média	DP <sup>c</sup>	DPR <sup>d</sup>
0,5	0,321	0,305	0,268	0,298	0,027	9,09
1,0	0,964	0,863	0,684	0,837	0,141	11,60
1,5	1,308	1,240	1,520	1,356	0,140	10,30
2,0	1,878	1,686	2,224	1,929	0,272	14,10
2,5	2,338	2,295	2,175	2,269	0,084	3,70

<sup>a</sup>ma-massa do ricinoleato de metila

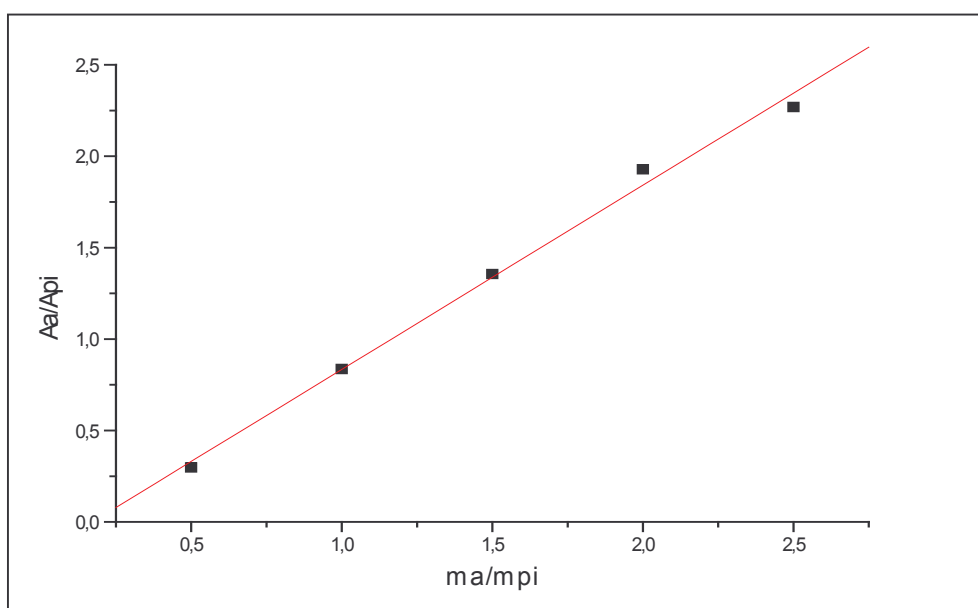
<sup>b</sup>Aa- área do ricinoleato de metila

<sup>c</sup>DP – desvio padrão

<sup>a</sup>m<sub>PI</sub> – massa do padrão interno

<sup>b</sup>A<sub>PI</sub>- área do padrão interno

<sup>d</sup>DPR – desvio padrão relativo



**Figura 27. Curva analítica da gamadecalactona na faixa de concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> até 250 mg.L<sup>-1</sup> usando o método da padronização interna. O padrão interno utilizado foi o estearato de metila**

A equação da reta obtida através dos dados acima foi:

$$Y = -0,1724 + 1,0068 x \quad (4)$$

$$R = 0,99708$$

$$\text{desvio padrão relativo} = 0,07036$$

#### 4.4 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção foi definido como a concentração de gamadecalactona e ácido ricinoleico esterificado que produz um sinal no detector igual a três vezes o nível de ruído da linha base determinado para a coluna DB-1 pelo método de diluições sucessivas. O limite de quantificação foi definido pelo intervalo de concentração no qual a intensidade da resposta do detector é diretamente proporcional à concentração da amostra<sup>56</sup>.

O limite definido como a mais baixa concentração de um analito/amostra que pôde ser estatisticamente distinguido de um branco foi de

10 mg.L<sup>-1</sup> para a gamadecalactona e de 25 mg.L<sup>-1</sup> para o ácido ricinoleico esterificado.

O limite de quantificação definido como a menor concentração para medidas quantitativamente precisas foi obtido a partir das concentrações de 50 mg.L<sup>-1</sup> para a gamadecalactona e 100 mg.L<sup>-1</sup> para o ácido ricinoleico esterificado.

#### **4.5 QUANTIFICAÇÃO DA GAMADECALACTONA E DO ÁCIDO RICINOLEICO ESTERIFICADO**

As amostras extraídas durante a biotransformação nos tempos 0h, 12h, 18h, 24h e 36h, e tratadas conforme descrito no Capítulo 3, item 3.2.7, foram injetadas no cromatógrafo em triplicata. Após a área do ácido ricinoleico esterificado e do padrão interno serem obtidas por integração automática, determinou-se as razões entre a área do ricinoleato de metila e a área do padrão interno ( $A_a/A_{PI}$ ). Interpolando as médias de  $A_a/A_{PI}$  nas curvas analíticas obtidas no item 4.3., determinou-se a razão  $m_a/m_{PI}$ . Multiplicando esta razão pela massa de padrão interno adicionado similarmente a cada amostra, calculou-se a concentração em miligramas por litro do ricinoleato de metila presente em cada tempo de extração. Os resultados encontrados estão demonstrados nas Tabelas 29 e 30.

**Tabela 29. Relação entre áreas do analito ácido ricinoleico esterificado e do padrão interno ( $A_a/A_{PI}$ ) para a injeção em triplicata das amostras e respectivas concentrações de ácido ricinoleico esterificado encontradas nas amostras nos tempos de 0 a 36 horas.**

Tempo (h)	$A_a/A_{PI}$			Média	DP	DPR	Concentração ricinoleato de metila(mg.L <sup>-1</sup> )*
0	0,236	0,227	0,216	0,226	53,49	$1,02 \times 10^{-2}$	4,51
12	0,119	0,127	0,114	0,120	37,30	$6,84 \times 10^{-3}$	5,70
18	0,190	0,165	0,180	0,180	46,50	$1,32 \times 10^{-2}$	7,33
24	0,364	0,355	0,417	0,378	76,59	$8,32 \times 10^{-2}$	8,78
36	0,122	0,125	0,115	0,121	37,53	$5,02 \times 10^{-3}$	4,16

NOTA \* Valores obtidos a partir da equação (2) para o ácido ricinoleico esterificado.

Multiplicando a razão ( $m_a/m_{PI}$ ) pela massa do padrão interno  $m_{PI}$  conhecido, obtém-se o valor da massa do ácido ricinoleico esterificado em cada tempo de extração através da seguinte fórmula:  **$ma = m_a/m_{PI} \times m_{PI}$  (5)**

O cálculo do desvio padrão relativo ficou abaixo de 10% para todas as amostras, demonstrando uma boa reprodutibilidade e precisão das medidas, validando o método do padrão interno como técnica de quantificação das amostras.

## CAPÍTULO V

### 5 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos, nos permite chegar a algumas conclusões a respeito do processo de biotransformação do ácido ricinoleico e do ricinoleato de metila na presença das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*.

Quanto à determinação das curvas de crescimento e velocidade máxima específica das linhagens estudadas em diferentes meios de cultivo foi possível concluir pelo estudo da cinética de crescimento da levedura *Candida guilliermondii* nos meios YMA, MBAR, MSA e MSB que os dois primeiros apresentaram melhores rendimentos para o crescimento celular. Analisando-se os perfis do comportamento celular e cinético da *Candida guilliermondii* nos quatro meios utilizados, o meio YMA é o que apresenta ambos os comportamentos bem definidos em todas as fases pertencentes ao processo de crescimento celular. A partir dessa constatação, optou-se pelos meios YMA e MBAR para o estudo da cinética de crescimento da *Candida oleophila* escolhendo-se também o meio YMA como meio de cultivo de crescimento por apresentar maior concentração celular quando comparada ao cultivo no meio MBAR, um perfil semelhante ao que se refere à literatura e uma taxa de velocidade máxima específica de crescimento 53% superior com relação ao meio MBAR.

Confrontando todos os aspectos analisados quanto ao crescimento celular das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*, observou-se que para o meio YMA, a taxa de velocidade específica máxima de crescimento da *Candida guilliermondii* foi  $0,1878\text{h}^{-1}$  e da *Candida oleophila* foi  $0,674\text{h}^{-1}$  e a concentração celular para a *Candida guilliermondii* atingiu 2,18 g/L e para *Candida oleophila* 9,9 g/L até o término do cultivo.

A partir desse perfil, pudemos constatar que a linhagem *Candida oleophila* apresentou maior eficiência no processo de crescimento celular,

gerando alta concentração de biomassa e um perfil de velocidade máxima específica de crescimento que permite identificar a fase de crescimento exponencial da levedura.

Quanto ao monitoramento do pH conclui-se que as oscilações ocorridas neste trabalho conforme Tabelas 25 e 26 não alteraram os perfis dos comportamentos ao longo dos ensaios, pois conforme estudos<sup>8,52</sup>, essas leveduras podem atuar em determinadas faixas de pH sem prejudicar o rendimento do processo, tanto que a oscilação entre os valores de pH ocorrida no meio de crescimento e no meio de biotransformação foi em torno de 0,76 pontos.

Quanto ao comportamento da linhagem *Candida guilliermondii* utilizada no meio contendo ácido ricinoleico como substrato, observou-se a ineficiência dessa levedura na produção de gamadecalactona (GDL); fato observado em outros trabalhos<sup>7</sup>. Não foi possível detectar a presença de gamadecalactona (GDL) em nenhuma das amostras retiradas ao longo do processo de biotransformação com o ácido ricinoleico com esta levedura. Embora seja apenas uma constatação sensorial e não uma análise qualitativa, todas as amostras exalaram cheiro semelhante ao da gamadecalactona (GDL) padrão adquirida da empresa Duas Rodas – Jaraguá do Sul (SC).

Quando com a *Candida guilliermondii* se utilizou como substrato o ricinoleato de metila, também não se observou a presença de gamadecalactona (GDL).

Quando a levedura utilizada foi a *Candida oleophila* em meio de biotransformação com ácido ricinoleico, foi detectado por cromatografia gasosa formação de gamadecalactona, em pequena quantidade, porém não foi quantificado. Este resultado nos remete a algumas evidências:

a) a concentração da gamadecalactona produzida apresentou baixo limite de detecção;

b) A gamadecalactona produzida foi totalmente consumida ou degradada no caldo de fermentação ou;



c) Ocorreu interrupção da degradação do ácido ricinoleico em algum estágio intermediário da biotransformação à gamadecalactona.

Quanto à quantificação da GDL e do ácido ricinoleico esterificado, o cálculo do desvio padrão mostrou que o mesmo ficou abaixo de 10% para todas as amostras, demonstrando uma boa reprodutibilidade e precisão das medidas, validando o método do padrão interno como técnica de quantificação das amostras.

### 5.1 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DESSE TRABALHO

Sugerimos que as próximas etapas sejam desenvolvidas levando-se em conta os resultados e comportamentos encontrados nestes preliminares para avaliar se a baixa produção de gamadecalactona (GDL) ocorreu devido às condições do meio de cultura e condições experimentais utilizadas e para isto sugere-se:

- Realizar o estudo com diferentes concentrações de substrato, tanto para o ácido ricinoleico como para o ricinoleato de metila com as duas linhagens estudadas;
- Testar o uso de um processo contínuo de inoculação dos meios de cultivo;
- Prolongar os tempos de biotransformação para monitorar as quantidades de produto encontrado;
- Quantificar a concentração de glicose no meio de cultivo, pois conforme Dufossé (1998), ela é um dos fatores limitantes para a produção de gamadecalactona;

- Quando possível, reduzir os tempos entre a retirada das amostras e a análise por cromatografia gasosa (sistema “on-line”).
  
- Utilizar antiespumantes como o Tween 80, para evitar a formação de emulsão nos meios de cultura inoculados com substratos como o ácido ricinoleico.

## REFERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGER, R.G. **Aroma Biotechnology**. Berlin: Springer Verlag, 1995.
2. BELIN, J.M.; BENSOUSSAN, M.; SERRANO-CARREON, L. Microbial biosynthesis for the production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, p.11-14.1992.
3. SCHREIER, P. Aspects of biotechnological production of food flavours. **Food Reviews International**, v.3, f.5, p.289-315.1989.
4. HANSSEN, H.-P; Fermentative Gewinnung von Duft-und Aromastoffen aus Pilzkulturen. **GIT Fachz. Lab.**, v.33, n.10, p.996-1004. 1989.
5. WINK, J.; LOTZ, A ; PRÄVE, P. Biotechnologisch hergestellte Aromastoffe. **Biotechforum**, v. 4, p.235-238.1987.
6. DUFOSSÉ, L. et.al. Production of  $\gamma$ -Decalactone and 4-Hydroxy-Decanoic Acid in the Genus *Sporidiobolus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.2, p.169-173.1998.
7. OKUI, S.; UCHIYAMA, M.; MIZUGAKI, M. Intermediates of the Oxidative Breakdown of Ricinoleic Acid by Genus *Candida*. **The Journal of Biochemistry**, Sendai, v.54, n. 6, p.536-541.1963.
8. ENDRIZZI, A; BELIN, J.M. Bioconversion of methyl ricinoleate to 4-hydroxy-decanoic acid and to  $\gamma$ -decalactone by yeasts of the genus *Candida*. **J. Basic Microbiol**, v.35, n.5, p.285-292. 1995.
9. FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3.ed. Berlin: Springer, 1997.
10. PATTERSON, R.L.S. et.al. Bioformation of Flavours. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992.
11. TRAMPER, J. Chemical versus Biochemical Conversion: When and How to Use Biocatalysts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p.290-295.1996.
12. BORZANI, W. Cinética de Reações Enzimáticas. In: \_\_\_\_\_ et.al. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v 1. p.197-216.
13. HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et.al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v 2. p.93-122.
14. SCHMIDELL, W; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: \_\_\_\_\_. et.al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v 2. p.179-192.
15. SCRIBAN, R. et.al. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985.

16. ALTERTHUM, F. Elementos de Microbiologia. In: BORZANI, W. et.al. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.v 1.p.1-32.
17. SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In:\_\_\_\_\_. et.al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.v 2.p.5-18.
18. STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of fermentation technology**. 2ed. Oxford: Butterwoth-Heinemann, 1995.
19. CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W. et.al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.v 2.p.193-204.
20. TYRREEL, M.N. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**, v. 44, n.1, p. 68-72.1990.
21. LATRASSE, A. et al. Chirality of the  $\gamma$ -Lactones Formed by *Fusarium poae* INRA 45. **Chirality**, v. 5, p. 379-384.1993.
22. MOSANDL, A.; GÜNTHER, C. Stereoisomeric flavor compounds. 20. Structure and properties of  $\gamma$ -lactones enantiomers. *J. Agric. Food Chem*, v.37, p.413-418.1989.
23. GUICHARD, E. et al. Chiral  $\gamma$ -lactones from *Fusarium poae*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 193:26-31, 1991.
24. TRESSL, R.; ALBRECHT, W. Biogenesis of aroma compounds through acyl pathways. In: PARLIMENT, T.H.; CROTEAU, R. **Biogeneration of aromas**. Washington: American Chemical Society, 1986.p.114-133.
25. FRONZA, G. et.al. Bioteneration of Aromas. **Chimia**, Milano, v.47, n.4, p.107-109, april. 1993.
26. JANSSEMS, L. et al. Production of Flavours by Microorganims. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215.1992.
27. SCHARPF JR, L.G. et al. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. In **Biogeneration of Aromas**, v.317, p.323-346.1986.
28. COLLINS, R.P.; HALIN, A.F. Essencial oil composition of *Ceratocystis virescens*. **Mycologia**, v. 69, p. 1129-1136. 1997.
29. DHAVLIKAR, R.S.; ALBROSCHT, G. Microbial transformation of terpenoids: Valencene. **Dragoco Report**, v. 20, p. 251-258. 1973.
30. VOISHVILLO, N.E. et al. Transformation of terpenes by microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.6, p. 409-418.1970.
31. OMELIANSKI, V.L. Aroma – producing microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v.8, p. 393-419. 1923.

32. ENDRIZZI, A. et.al. Production of Lactones and Peroxisomal Beta-Oxidation in Yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.16, f.4, p.301-329.1996.
- 33.FERON, G. Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of  $\gamma$ -decalactone. **FEMS Microbiology Letters**,v.149,p.17-24.1997.
34. CARDILLO,R. et.al. On the mode of conversion of racemic, C<sub>14</sub>-C<sub>19</sub>, gamma-hydroxy alkene fatty acids into C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>, optically active gamma-and delta-lactones in *Cladosporium suaveolens*. **Journal Organic Chemistry**, v.54, p.4979-4980.1989.
- 35.MAGA, J.A. Lactones in foods.**Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,p.1-56,sep.1976.
- 36.MAUME, K.A.; CHEETHAM, P.S.J. The production of  $\gamma$ -decalactone fermentation of castor oil. **Biocatalysis**, v.5, p.79-97.1991.
37. LEE, S.L. et al. Production of  $\gamma$ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, v.33, n.4, p.453-459.1998.
38. PAGOT, Y.; BELIN, J.M. Fatty acid cellular metabolism and lactone production by the yeast *Pichia guilliermondii*. **Appl.Microbiol.Biotechnol**, v.45, p.349-354. 1996.
- 39.TRESSL, R. et.al. Formation of lactones and terpenoids by microorganisms. In: CHARALAMBOUS, G.; INGLETT, G.E. **Flavor of Foods and Beverages: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 1978. p.145-168.
- 40.SERRANO-CARREON, L.; BENSOUSSAN,M.; BERLIN, J.M. Microbial biosynthesis for the production of food flavours.**Trends in Food Science & Technology**, v.3, p.11-14, jan.1992.
- 41.MADUREIRA, L.A.S. **Lipids in recent sediments of the eastern north atlantic**. (s.l), 1994.287f.Tese (doutorado) –University of Bristol.
- 42.NEDER, R.N. **Micrologia** – Manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992.
- 43.GUEDES, L.S.L.S. **Estudo do comportamento cinético de uma levedura amilolítica recombinante em fermentador**. São Paulo, 1995. 258f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Química , Universidade de São Paulo.
- 44.CARVALHAL, M.L.C. Técnicas básicas em microbiologia. In: BORZANI, W. et.al. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.v 1.p.33-62.
- 45.TAVARES, L.B.B. **Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas**. São Paulo, 1998. 157f. Dissertação (Doutorado) – Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo.
46. LE DUY,A.; ZAJIC,J.E. A geometrical approach for differentiation of experimental function at a point: Applied to growth and product formation. **Biotechnol.Bioeng.**, v.25,p.805-810.1973.

47. MORITZ, D.E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas**. Florianópolis, 1998. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina
48. PELCZAR JR., J.M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996.
49. MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Ann. Review of Microbiol**, v.3, p.371-394. 1949.
50. LIN, S.-J.; LEE, S.-L.; CHOU, C.-C. Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of  $\gamma$ -decalactone by *Sporobolomyces odorus*. **J Ferment. Bioeng**, v.82, p.42-45. 1996.
51. DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; LINARDI, V.R. Bioconversion of nitriles by *Candida guilliermondii* CCT 7207 cells immobilized in barium alginate. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.56, p.757-761. 2001.
52. MAUME, K.A.; CHEETHAM, P.S.J. The production of  $\gamma$ -decalactone fermentation of castor oil. **Biocatalysis**, v.5, p.79-97. 1991.
53. SPINNLER, H.E. et.al. Analysis of metabolic pathway by the growth of cells in the presence of organic solvents. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p.3373-3376. 1996.
54. PAGOT, Y. et.al. Utilization of a auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve  $\gamma$ -decalactone production yields. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.113-116. 1997.
55. LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: Acta, 1993.
56. VOGEL, A.I. **Textbook of practical organic chemistry**. 5.ed. Brian Stanley: Longman Scientific & Technical, 1989.
57. BACAN, N. et.al. **Química Analítica Elementar**. 2.ed. Campinas: Edgar Blücher Ltda, 1979.
58. GATFIELD, I.L. Production of Flavor and Aroma Compounds by Biotechnology. In: Meeting of the American Chemical Society, 190, 1985, Chicago. Food Technology. Germany: october, 1988. p.110-123.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### DESCRIÇÃO DO MÉTODO DAS DILUIÇÕES SUCESSIVAS UTILIZADO PARA O REPIQUE DAS CEPAS DA *CANDIDA GUILLIERMONDII*<sup>42</sup>

Em geral utilizamos células de culturas de crescimento denso que formam aglomerados de colônias, tornando-se necessário fazer diluições do inóculo, para que apareçam nas placas, colônias mais separadas.

A contagem pode ser expressa em número de microrganismos por mL de meio de cultura, através do seguinte procedimento:

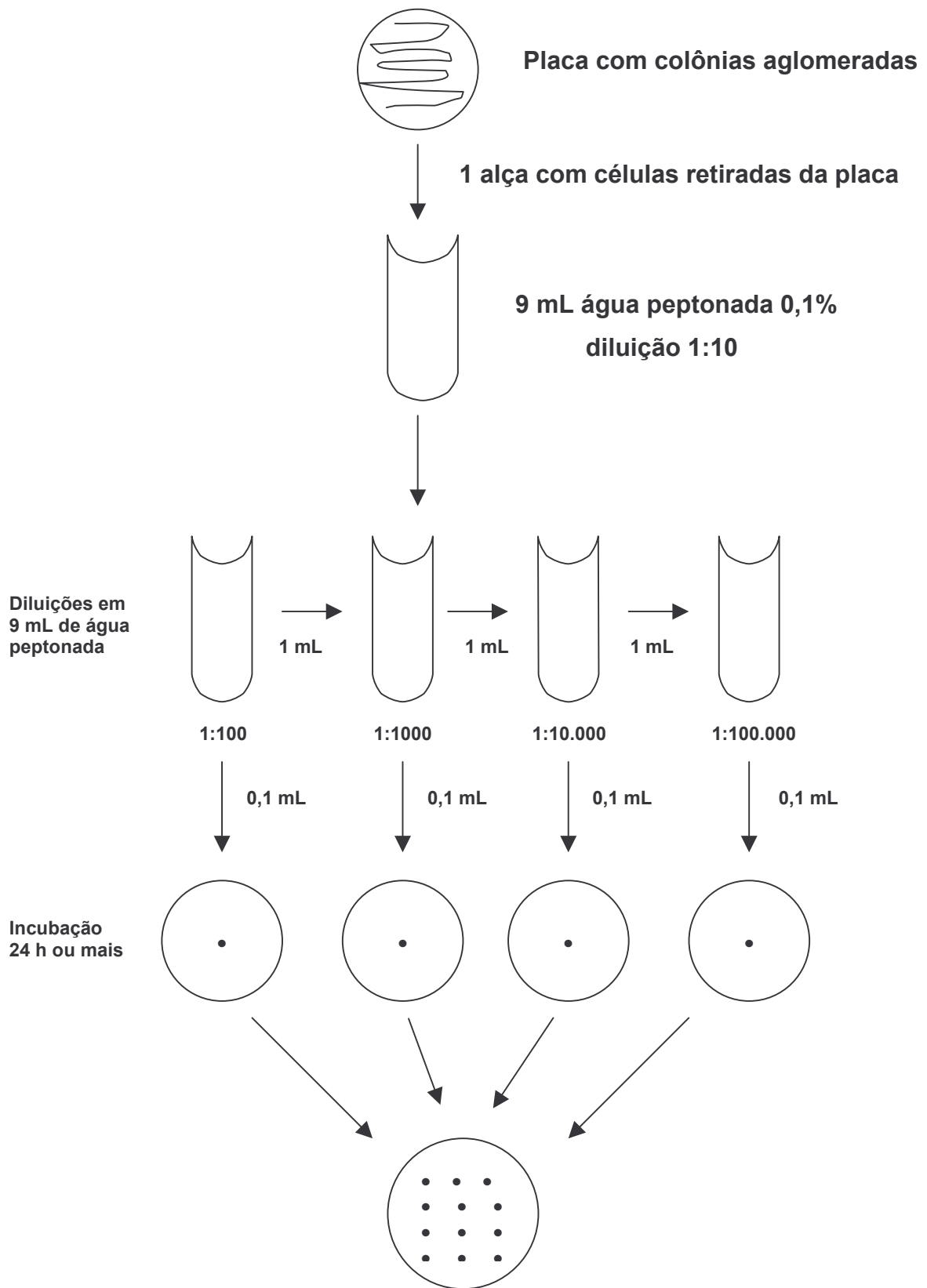
Coletou-se uma alça de *Candida guilliermondii* de uma placa de Petri contendo as colônias aglomeradas e colocou-se em um tubo com 9 mL de água peptonada (0,1%). Foi feito assim uma diluição de 1:10. Semeou-se 0,1 mL dessa diluição em placa de Petri com meio YMA solidificado e espalhou-se uniformemente por sua superfície com uma espátula Drigalski.

Pipetou-se 1 mL da diluição 1:10 em um tubo com 9 mL de água peptonada 0,1%. Fez-se uma diluição 1:1000. Semeou-se 0,1 mL em placa com YMA<sub>sólido</sub> e espalhou-se.

Continuou-se as diluições até 1:100.000 como mostra o Esquema 7 e incubou-se todas as placas a 28°C por 48 horas.

Do conjunto de placas incubadas, foram escolhidas as melhores dentro de uma diluição. As melhores são as que possuem de 30 até 300 colônias.





Esquema 6. Preparação de cepas em placas de Petri através do método das diluições sucessivas

**MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA  
BIOTRANSFORMAÇÃO COM AS *CANDIDA OLEOPHILA* E *CANDIDA  
GUILLIERMONDII***



**Figura 28. Método de repique das cepas utilizadas**



**Figura 29. Incubador rotatório**

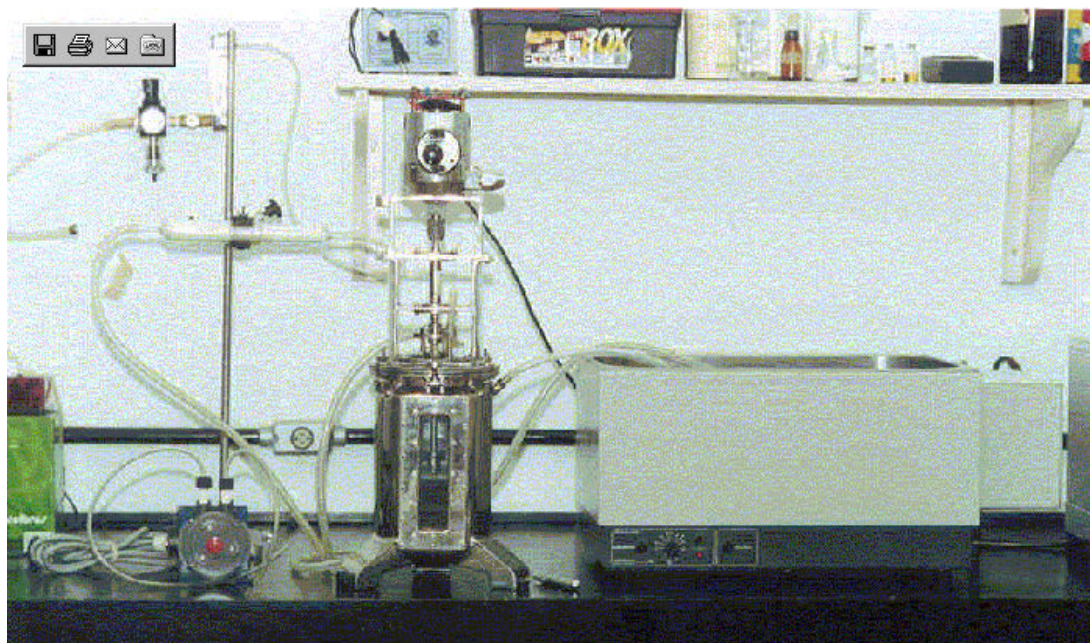
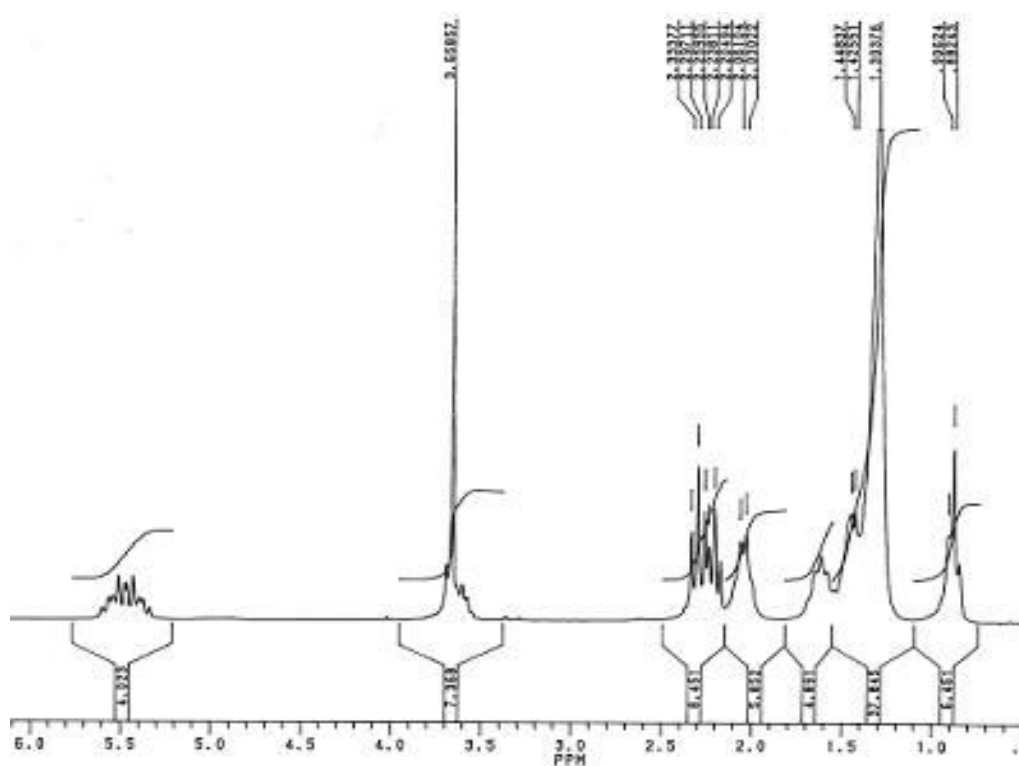
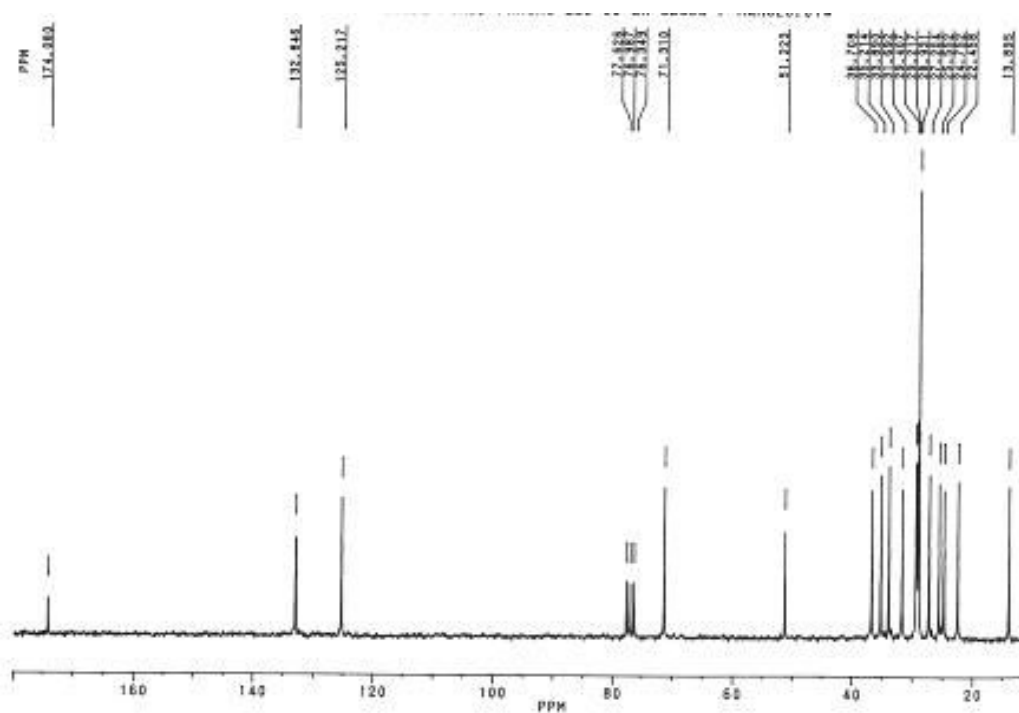


Figura 30. Biorreator

## ANEXO 3

## ESPECTROS DE RMN DO RICINOLEATO DE METILA

Figura 31. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (200 MHz) do ricinoleato de metilaFigura 32. Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (200 MHz) do ricinoleato de metila