



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

## CARTA PATENTE N.º PI 0202014-9

*Patente de Invenção*

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito : PI 0202014-9

(22) Data do Depósito : 31/05/2002

(43) Data da Publicação do Pedido : 04/05/2004

(51) Classificação Internacional : C12P 7/24; C12R 1/67; C12R 1/685; C12R 1/385; C12R 1/40

(54) Título : PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE OBTENÇÃO DE HELIOTROPINA

(73) Titular : Universidade Federal do Rio de Janeiro, CGC/CPF: 33663683005509. Endereço: Av. Brigadeiro Trompowski, S/N, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (BR/RJ). Cidadania: Brasileira.; Universidade Federal do Pará. Endereço: Av. Augusto Corrêa, S/N, Campus Universitário do Guamá, Belém, Brasil (BR), CEP: 66075900.

(72) Inventor : Alberdan Silva Santos, Professor Universitário. Endereço: Av. Pedro Álvares Cabral Passagem Padre Julião, 31, Telégrafo, Belém, Pará, Brasil, CEP: 66115110.; Octavio Augusto Ceva Antunes, Professor Universitário. Endereço: Rua Gustavo Samapio, 208/203, Brasil, CEP: 22060010.; Nei Pereira Junior. Endereço: Deb/EQ: Av. Brigadeiro Trompowski S/N Bloco E do Centro de Tecnologia da UFRJ, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil.

Prazo de Validade : 10 (dez) anos contados a partir de 03/12/2013, observadas as condições legais.

Expedida em : 3 de Dezembro de 2013.

Assinado digitalmente por  
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira  
Diretor de Patentes

15 de Novembro  
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
de 1889

Relatório Descritivo da Patente de Invenção  
"PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE OBTENÇÃO DE HELIOTROPINA."

Refere-se a presente invenção a um processo biotecnológico de obtenção de heliotropina, também conhecida como piperonal, através da oxidação microbiológica de isossafrol, no qual, microorganismos são utilizados como agentes biocatalíticos na presença de peróxido de hidrogênio em meio aquoso, em condições de temperatura, agitação e pH controlados. A heliotropina é uma substância química utilizada nas indústrias de flavors & fragrâncias e de cosméticos como fixadora de perfumes, sendo um fixador biodegradável. O presente processo descreve uma rota natural de produção deste fixador.

Sabe-se que os isômeros do isossafrol (E e Z) são obtidos, para fins industriais, através de conversões químicas, a partir do safrol, uma substância natural encontrada em concentrações majoritárias nos óleos essenciais de espécies vegetais pertencentes às famílias das Lauráceas e Piperáceas. Os isômeros do isossafrol são utilizados como fonte de produção de heliotropina (piperonal), um metilenodixobenzaldeído utilizado como fixador biodegradável de perfume na indústria de cosméticos. O processo químico de produção de heliotropina já é utilizado em escala comercial e, no Brasil, utiliza-se um processo químico através do método de ozonólise. Já são conhecidas no estado da arte, diversas patentes referentes a processos de produção de heliotropina, por meio de técnicas diferenciadas: oxidação do isossafrol por meio de catalizador a base de manganês, ácido para-toluenosulfônico, ácido sulfúrico e dicromato, a uma temperatura entre 65-80 °C, conforme descrito no documento de patente SU490793-A; preparação do piperonal a partir da

reação do 1,2-metilenodioxibenzeno com ácido glioxílico na presença de ácido forte, conforme os documentos de patente JP2001288179-A e W0200157016-A1; preparação do piperonal a partir da oxidação do 3,5-metilenodioxi-ácido mandélico com nitrito na presença de ácido sulfúrico de acordo com a patente JP08027144-A; produção de piperonal a partir da reação do 1,2-metilenodioxibenzeno com ácido glioxílico na presença de ácido sulfúrico, utilizando-se água como meio, conforme a patente JP07330755-A; preparação do piperonal a partir da oxidação do 3,4-metilenodioxido-ácido mandélico com ácido nítrico em uma mistura de solvente orgânico e água na presença de ácido sulfúrico, descrito na patente JP07258246-A; preparação de piperonal a partir da oxidação do 3,4-metilenodioxido-ácido mandélico com ácido nítrico na presença de ácido clorídrico, conforme as patentes EP429316-A, FR2653769-A e US5095128-A; preparação do piperonal através de técnica eletroquímica, sendo aplicado eletrólise no 3,4-metilenodioxi-cloreto de benzila em água ou em uma mistura de solvente orgânico e água na presença de um eletrólito, conforme as patentes JP62005977-A e JP92062313-B; preparação do piperonal por técnica eletroquímica a partir da oxidação do 4-metilmetilenodioxibenzeno com sulfato cérico, descrito na patente GB2165536-A; preparação do piperonal por meio de oxidação eletrolítica do isossafrol glicol na presença de eletrólitos tais como álcalis ou hidróxidos de metais alcalino terrosos, haleto, carbonatos ou hipocloritos ou haletos da amônia quaternária, conforme as patentes JP60070193-A e JP87056954-B; preparação do piperonal a partir da oxidação do álcool piperonílico usando um catalisador de platina e sais de ácidos inorgânicos de Pb, Fe, Bi e Ag na presença do dióxigênio, conforme as patentes

JP:55022615-A e JP87021789-B; preparação do piperonal em altos rendimento através da oxidação do álcool piperonílico com nitrato férrico, descrito na patente JP55000314-A; preparação do piperonal através da reação do 1,2-  
5 etilenodioxibenzeno com N-alkuil-formanilida na presença de cloreto de tionila, brometo de tionila e outros sob pressão reduzida, conforme as patentes JP54088269-A e JP86034432-B; preparação de heliotropina (3,4-metilenodioxibenzaldeído) a partir da reação de haleto de de heliotropila com um sal de  
10 metal alcalino do 2-nitropropeno na presença de um álcool, descrito na patente GB1538214-A; preparação do piperonal a partir do 1,2-metilenodioxibenzeno com N-alkuil-formanilida e um agente de condensação, conforme a patente US4157333-A; preparação do epóxido do isossafrol em altos rendimentos em  
15 presença de peróxido de hidrogênio e nitrilas (de fenila ou metila) entre 15-45°C, pH 8-10,5, na presença de etanol ou em metanol como solventes, usando-se preferencialmente tampão de carbonato de sódio, conforme as patentes JP62048682-A e JP4013510-B2; preparação do piperonal  
20 através da extração de heliotropo a partir de *Heliotropium dasycarpum* grass com etanol a 75-78%, onde a forma N-óxido da heliotropina é reduzida, alcalinizada com amônia, extraído com clorofórmio e recristalizada com acetona, conforme descrito na patente SU1163861-A; e preparação de  
25 vanilina e heliotropina a partir da oxidação de isossafrol e eugenol em solventes orgânicos polares e a exposição do sistema a radiação nuclear, conforme a patente SU 229485-A.

Com relação a produção de derivados da heliotropina, poucos processos biotecnológicos foram desenvolvidos. Um  
30 desses poucos processos se refere a produção de acetato de cianoidrina aromática, uma substância opticamente ativa obtida a partir do piperonal, por meio de ação enzimática

(lipase), conforme descrito nas patentes JP05153983-A e JP03254690-A.

Em geral, o piperonal pode ser produzido a partir de diversos análogos do safrol. Entretanto, para fins comerciais, o safrol ainda é a maior fonte para a produção do piperonal. O piperonal é produzido a partir do safrol por meio de processo químico: o safrol é isomerizado a isossafrol na presença de hidróxido de potássio e em seguida o isossafrol é submetido a reação com ozônio, sendo gerado o piperonal. Como inconvenientes desse processo, na primeira etapa as condições são drásticas e, na segunda etapa, o custo da produção de ozônio é alto, pois é necessário o uso de um reator para produzi-lo, a partir de oxigênio ou ar, além do consumo de uma grande quantidade de energia e não é classificado como "produto-verde".

Além dos inconvenientes do processo químico descritos acima, até o momento, não são conhecidos no estado da arte processos biotecnológicos para produção da heliotropina.

Oxidação microbiológica é um dos processos mais estudados na transformação de substâncias orgânicas ao lado da redução (Roberts, S.M. (2000). *Preparative Biotransformations (review). Journal of Chemical Society, Perkin Trans 1: 611-33.*). O processo de oxidação microbiológica mais simples e mais satisfatório é a incorporação direta de um átomo de oxigênio ao substrato exógeno (ou xenobiótico), a partir do oxigênio molecular, em virtude do dioxigênio ser o oxidante mais barato na indústria química (Moro-oka & Akita, 1998). Por este processo, podem ser produzidos álcoois a partir de hidrocarbonetos, derivados de fenol a partir de derivado do benzeno e álcoois alílicos e/ou epóxidos de alquenos. Termodinamicamente, estas reações são bastante diferentes

devido aos potenciais redox envolvidos. Cineticamente, considerando o mesmo substrato, tal como o limoneno, caminhos catalíticos diferentes podem acontecer, desta forma, produtos múltiplos são possíveis.

5 Embora tenham sido descritos muitos exemplos de oxidação biológica, poucas enzimas responsáveis por estas transformações foram identificadas, e muito poucas foram completamente caracterizadas. Porém, investigações específicas indicaram que pelo menos três tipos de enzimas  
10 podem ser envolvidas em oxidação microbiológica: monooxigenases heme-dependentes, peroxidases e metano monooxigenases (não-hemes dependentes).

A incorporação biológica de um átomo de oxigênio é catalisada por três grupos de enzimas acima, e estes grupos  
15 de enzimas efetuam as reações em condições moderadas, e são os grupos mais importantes de enzimas para a biotransformação (oxidação) de xenobióticos. Genericamente, enzimas monooxigenases dependentes do citocromo P450, são encontradas facilmente em todos os tipos de células vivas.  
20 Especificamente, as peroxidases só são encontradas em microorganismos ou vegetais especializados em expressá-las (Conesa, A.; Punt, P. J.; van den Hondel; Cees, A. M. J. J. (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, 93:143-158;  
25 Fatibello-Filho; Vieira, C. Iolanda (2002). Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, 25(3):455-464).

Muitos estudos foram efetuados em enzimas de mamífero devido o envolvimento de monooxigenases dependente de  
30 citocrtomo P450 no metabolismo de fármacos, principalmente nas células do fígado. A maior característica destas enzimas, é oxigenar xenobióticos lipofílicos que

posteriormente, tornam-se solúveis em água para facilitar excreções. Baseados neste fenômeno, muitos pesquisadores têm trabalhado na oxidação de substâncias lipofílicas (xenobióticas) por diferentes MOs, células vivas ou 5 preparações enzimáticas. Além disso, foi demonstrado que estas enzimas ou sistemas biomiméticos podem conduzir reações de oxidações enantiosseletivas.

Como enfatizado em literatura, principalmente por Faber, Kurt (1995, Biotransformations in organic chemistry 10 2<sup>a</sup>. edition, 101-218. Spring-Verlag, Berlin Heidelberg), a investigação sistemática de MOs é uma ferramenta muito importante para achar o microorganismo capaz de efetuar a reação com alta taxa de conversão, além de efetuar uma transformação química desejada. A base empírica deste 15 trabalho está baseado no fato que a maioria, se não todos os MOs, têm a maquinaria necessária para efetuar uma determinada transformação química. Claro que o substrato geralmente é xenobiotico ao MO e, por conseguinte, potencialmente tóxico ao MO. Deste modo a condução da 20 reação deve ser muito cuidadosa. Embora oxidações sejam conhecidas por mais de um século, a primeira reação sistematicamente estudada efetuada por MOs (enantiosseletivamente), foi a redução de cetonas ativadas. Tendo em mente as dificuldades potenciais, a 25 investigação sistemática microbiológica para a biotransformação de substâncias químicas (substratos xenobioticos) é certamente a única metodologia disponível para se conseguir uma determinada transformação bioquímica de uma substância orgânica.

30 Microorganismos inteiros, frações de microorganismos, células de animais e de plantas ou preparações enzimáticas cruas têm sido usadas como biocatalisadores seletivos (ou

específicos). As metodologias são relativamente rápidas, versáteis e, em princípio, podem ser usadas por qualquer químico treinado (com respeito ao protocolos de biossegurança).

5           Vários ensaios de transformações microbiológicas têm sido descritas na literatura. A quantidade de classes diferentes de substâncias usadas como xenobióticos e as diferentes MOs está crescendo rapidamente (Gonsalves, A M d'Á R & Pereira, M M (1996), State of the art in the  
10 development of biomimetic oxidation catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 113:29-211). A atração principal de usar MOs em vez das transformações químicas tradicionais é associada a vários fatores: o solvente normalmente é água (não muito barato, mas sempre amigável),  
15 as condições de reação são geralmente moderadas e podem ser criadas para reciclar o MO (por exemplo imobilizados). E, fundamentalmente, pode-se rotular o produto como oriundo de uma rota natural. Por conseguinte, o processo global normalmente economiza energia, comparado com o processo  
20 clássico e uma das reivindicações da sociedade por ser um processo de rota natural. Baseado nestes fatos a oxidação de isossafrol, 1,2-metilenodioxo-4-(1'-propenil)-benzeno no aldeído correspondente, piperonal ou heliotropina, 4-carboxialdeído-1,2-metilenodioxibenzeno, foi efetuado,  
25 conforme proposto na presente invenção, embora a literatura indique que essa substância que contém o grupo metilenodioxibenzeno se comportaria como um inibidor do citocromo P450, evidenciando que, possivelmente, peroxidases sejam responsáveis por esta transformação  
30 (Delaforge et al., 1999; Keseru, G M; Balogh, G T; Arvai, G and Bertók, B (1999) Metalloporphyrin Catalased Biomimetic Oxidation of Aryl Benzyl Ethers. Implications

for Lignin Peroxidase Catalysis. *Tetrahedron* 55, 4457-4466). Por outro lado o processo de biotransformação é muito atraente no ponto de vista industrial como uma alternativa ao processo químico que exige alta demanda de energia, em função da ozonólise. Adicionalmente, uma vez sendo o produto principalmente usado como fixador na indústria de fragrância e como um aditivo na indústria de aroma, práticas industriais ditas naturais, torna o processo proposto muito atrativo. Neste caso, o uso de um processo limpo, de condições moderadas e que economiza energia para obter um produto de considerável importância econômica, é o objetivo da presente invenção.

Embora pertencendo a uma classe importante de produtos naturais, os arilpropenoides, relatos de oxidação microbiológica destas substâncias não são comuns (Isolation of a *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Journal of Biotechnology*, 78: 1-9). A oxidação microbiológica de safrol, 1,2-metilenodioxo-4-(2'-propenil)-benzeno, e seu isômero correspondente, isossafrol, 1,2-metilenodioxo-4-(1'-propenil)-benzeno, até o momento não foi assunto de muitos estudos de biotransformação. Evidências apontam a alta toxicidade destas substâncias para MOs e as propriedades conhecidas de agir como inibidoras de monooxigenases dependentes do citocromo P450 (Kakko, I; Toimela, T and Tahti, H (2000) Piperonyl butoxide potentiates the synaptosome ATPase inhibiting effect of pyrethrin. *Chemosphere*, 40; 301-305), que são, provavelmente, as razões principais da escassez de interesse na oxidação microbiológicas de arilpropenoides com grupo metilenodioxila. Porém, a oxidação de substância contendo o grupo metilenodioxila através de catalisadores biomiméticos usando metaloporfirina sintética foi reportada

(Keseru, G M; Balogh, G T; Arvai, G and Bertók, B (1999) Metalloporphyrin Catalased Biomimetic Oxidation of Aryl Benzyl Ethers. Implications for Lignin Peroxidase Catalysis. *Tetrahedron* 55, 4457-4466).

5 De acordo com a presente invenção, uma substância pertencente a classe dos arilpropenoides contendo um grupo metilenodioxila, é submetida de forma original e com sucesso a um processo de oxidação microbologica, através de biotransformação do isossafrol (isômeros E e Z), usado  
10 como o substrato xenobiótico, para obtenção de piperonal por meio de oxidação bioenzimática, utilizando-se monooxigenases dependentes de citocromo P450 ou Peroxidases presentes em microorganismos tais como: *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus flavus*, entre outros.

15 Os microorganismos são capazes de efetuar um grande número de reações químicas e que são essenciais para manter o equilíbrio fisiológico celular. Essas reações são catalisadas por enzimas que fazem parte das rotas metabólicas produzidas pelos MOs para degradar e sintetizar  
20 diversas substâncias químicas. Até o momento mais de 2.000 enzimas foram catalogadas, das quais um grande número foi obtido de microorganismos. Cada uma destas enzimas aceita determinado substrato como sendo adequado para conduzir uma reação específica. Paralelamente, estas enzimas podem  
25 aceitar substratos xenobióticos e conduzir uma determinada reação de seu domínio. A este fenômeno, no qual o microorganismo ou uma de suas enzimas age como um catalisador transformando uma substância química xenobiótica em outra, dá-se o nome de biotransformação.  
30 Para que o microorganismo possa efetuar uma reação específica, tal como a oxi-redução, será necessário que o mesmo apresente a capacidade de expressar uma ou mais

enzimas oxidase ou peroxidase que possa atuar sobre o substrato efetuando a reação de interesse, como a inserção de um átomo de oxigênio na dupla ligação.

Entretanto, nem todos os microorganismos apresentam esta habilidade, sendo necessário conduzir-se ensaios para encontrar um ou mais microorganismos com as características catalíticas requeridas. Para este propósito o método da investigação sistemática microbiológica de biotransformação é normalmente usado, e consiste em testar um grande número de micróbios na presença do substrato proposto, além de proceder diversas técnicas de indução da enzima desejada, alterando as variáveis tais como: pH, temperatura, composição do meio de cultura, entre outras. Diversos ensaios de transformações microbiológicas foram conduzidos na presença de diferentes classes de substâncias usadas como xenobióticos. Entretanto, até o momento, nada foi relatado sobre investigação sistemática microbiológico de biotransformação que conduza estudos de oxidações de substâncias xenobióticas que possuam o grupo metilenodixila, como é o caso dos isômeros do isosafrol.

Para a produção de metilenodioxibenzaldeído através de biotransformações, a presente invenção utilizou 4-(-2-propenila-1,2-metilenodioxibenzeno), isossafrol, como xenobiótico, com o propósito de selecionar uma ou mais linhagens de microorganismos que apresente potencial de oxidar a dupla ligação desta substância.

O isosafrol, pode ser encontrado nas duas formas diastereoisoméricas: [E] e [Z], e são as substâncias de partidas na produção de 4-carboxialdeído-1,2-metilenodioxibenzeno), piperonal.

Industrialmente, isossafrol, [E] ou [Z], é obtido a partir do safrol, substância natural encontrada em óleos

essenciais de vegetais pertencentes às famílias das *Piperáceas* e *Lauraceas*, principalmente, e apresenta grandes aplicações na indústria de inseticidas e de cosméticos. De acordo com a presente invenção, a conversão microbiológica (bioenzimática) do isossafrol em substâncias oxidadas promoverá a obtenção de um produto com características naturais, o que na atual política ambiental, apresenta um interesse relevante para as indústrias que utilizam produtos com estas características, pois estes produtos são marcados com rótulos verdes para identifica-los como sendo de origens naturais, como é o caso de produtos gerados por processos biotecnológicos.

Na realização da presente invenção foram utilizados os microorganismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida*, envolvendo as enzimas Monooxigenases dependentes do citocromo P450 e/ou Peroxidases, tais como Ligninas peroxidases, Manganês peroxidase e Cloroperoxidases.

Na formação das composições químicas dos meios de culturas usados no ensaio microbiológico, cada linhagem de microorganismo liofilizado, foi suspenso, por exemplo, em 1 ml de solução aquosa de NaCl a 1%. As suspensões foram usadas como inóculos em meios de culturas sólidos, dispostos em placas de Petri contendo 20mL de meio, conforme resultados relacionados na tabela a seguir. Os meios de culturas foram esterilizados em autoclave a  $1\text{Kf}/\text{cm}^2$  durante 15 minutos. Só após a temperatura do meio atingir a temperatura ambiente é que se procedeu a transferência dos inóculos. Foram utilizados 0,2-2mL de peróxido de hidrogênio como agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) adicionados no meio de cultura de modo que a concentração

final foi de 1-2% v/v. O pH foi ajustado na faixa de 3-4,5 com ácido acético glacial. Os cultivos foram mantidos nas mesmas condições de agitação e temperatura iniciais.

| Substâncias químicas                            | Czapeck para fungos * | Caldo Sabouraud para leveduras * | LB-broth (Luria-Bertani-broth) para bactérias** |
|---|-----------------------|----------------------------------|---|
| Sacarose  | 20g/l                 | 30g/l                            |   |
| NaNO <sub>3</sub>                               | 2g/l                  |                                  |   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1g/l                  |                                  |   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 1,025g/l              |                                  |   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,01g/l               |                                  |   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,5g/l                | 0,2g/l                           |   |
| Neopeptona                                      |                       | 10g/l                            |   |
| Tripeptona                                      |                       |                                  | 10g/l   |
| Extrato de lêvedo                               |                       |                                  | 5g/l  |
| NaCl  |                       |                                  | 10g/l   |
| Agar  | 30g/l                 | 30g/l                            | 30g/l   |
| pH  | 3.5-7.0               | 4.5-7.0                          | 4.5-7.0   |
| Cultivos  | 27°C/5 dias           | 27°C/24 horas                    | 35°C/24horas                                    |

5 \* Compilado de Demain & Solomon, 1986; \*\* Compilado de Cappuccino, J. G. & Scherman, N. (1992) Microbiology: A laboratory Manual, 3rd Ed. Beijamings Curmmings, New York

Para confirmação do ensaio de biotransformação em  
 10 frascos Erlenmeyer, para cada linhagem de microorganismo  
 foram usados dois frascos Erlenmeyer de 250mL contendo  
 100ml de meio com pH não ajustado, mantido em 3, cada um.  
 Os frascos foram fechados com rolha de algodão hidrófilo e  
 juntamente com o meio de cultura foram autoclavados a  
 15 1Kf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos. Após o meio de cultura atingir  
 a temperatura ambiente, um volume de 1mL da suspensão de  
 esporos, obtidos no procedimento anterior, foi inoculado.  
 Os frascos foram rotulados e mantidos em sistema de  
 agitação a 150rpm e 26-30°C durante 96 horas. Após este  
 20 período, foram procedidas as adições do substrato e do  
 peróxido de hidrogênio, como no procedimento anterior e, a  
 cada 24 horas alíquotas de 2ml de cada frasco foram  
 retiradas, transferidas pra tubos de ensaios distintos e

submetidas às extrações. As amostras devidamente rotuladas foram enviadas para análises.

Na extração e separação dos produtos, em cada tubo de ensaio foram adicionados 2mL de acetato de etila PA, que no caso de bactérias e leveduras as alíquotas foram filtradas com membranas de 0,22 micrômetros, e a mistura foi submetida a agitação em agitador de vórtice por 20 segundos. A mistura foi deixada em repouso por 3 minutos para haver a separação das fases por decantação. A fase orgânica ou fase superior, que foi neutralizada com bicarbonato de sódio e usou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para remover as possíveis moléculas de água presentes, cerca de 1,5mL, foi removida por meio de uma pipeta Pasteur e filtrada e transferida para um frasco de vidro de 4mL com tampa de rosca e septo. O frasco foi rotulado e a amostra enviada para análise via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

De acordo com a presente invenção, fungos filamentosos são cultivados em meio sólido Czapeck, durante 5 dias (120 horas) a 26-30°C. Após este período, os esporos são retirados por meio de uma solução aquosa de NaCl a 1% em temperatura ambiente (~30°C). A suspensão de esporos é então transferida para uma solução nutritiva Czapeck (tabela-1), de modo que a concentração fique dentro da faixa de 300mg/L - 3000mg/L de esporos. A fonte de carbono é a sacarose na concentração de 30g/L. O sistema deve ser mantido em agitação (150rpm) durante 4 dias (96 horas) em temperatura 26-30°C. Após este período, o isossafrol deve ser incorporado a tween-80, água e peróxido de hidrogênio 30% na proporção (1:0,1:0,5:0,4). Em seguida uma alíquota desta suspensão deve ser adicionada ao meio de cultura de modo que a proporção seja de 1%-10% do volume total. O pH

deve ser ajustado na faixa de 3-4,5 com ácido acético. O sistema deve voltar para as mesmas condições iniciais. A máxima concentração de piperonal no meio deve ser monitorada via CG. Em seguida o piperonal deve ser extraído de acordo com o procedimento de extração adequado ao processo conduzido, se por batelada ou contínuo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo biotecnológico de obtenção de heliotropina **caracterizado pelo** fato do isossafrol ser submetido a um processo de oxidação microbiológica, na presença de peróxido de hidrogênio 30%, no qual micro-organismos e as enzimas, pertencentes ao grupo compreendido por monooxigenases e peroxidases, presentes nos ditos micro-organismos serem utilizados como agentes catalisadores em meio de cultura líquido, em condições de temperatura entre 25° e 35°C, agitação entre 100 e 150 rpm e pH entre 3 e 7 e tendo como agente dispersante do substrato um detergente não iônico, na qual a proporção dos componentes fundamentais isossafrol, detergente não-iônico, água e peróxido de hidrogênio 30% no meio de cultura seja, preferencialmente, igual a 1:0,1:0,5:0,4.
2. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato do isossafrol estar nas formas diastereoisoméricas E e Z.
3. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o microorganismo ser o *Aspergillus flavus*.
4. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o microorganismo ser *Aspergillus niger*.
5. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato ser o microorganismo ser o *Clodosporium sphaerospermum*.
6. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o microorganismo ser o *Pseudomonas aeruginosa*.
7. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o microorganismo ser o *Pseudomonas putida*.
8. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato da enzima presente no microorganismo ser Monooxigenases dependentes do citocromo P450.
9. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o pH da reação ser preferencialmente 3,5.
10. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o detergente não iônico ser o tween-80.
11. Processo de acordo com o reivindicado 1, **caracterizado pelo** fato de o processo ser em batelada.
12. Processo de acordo com o reivindicado em 1, **caracterizado pelo** fato de o processo ser contínuo.

## RESUMO

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE OBTENÇÃO DE  
HELIOTROPINA.

A presente invenção se refere a um processo de  
5 obtenção de heliotropina (piperonal) por uma rota natural,  
através da oxidação microbiológica do isossafrol nas formas  
diastereoisoméricas E e Z, no qual microorganismos e enzimas  
presentes nos ditos microorganismos são utilizados como  
agentes catalizadores na presença de peróxido de hidrogênio  
10 em meio aquoso, e em condições de temperatura, agitação e  
pH controlados.