



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LEONARDO LOPES LAUREANO PINTO

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁLCOOL FENILETÍLICO POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM
MEIO DE CULTURA DESENVOLVIDO COM UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE MAÇÃ (*Malus
domestica*)

CAMPINAS

2017

LEONARDO LOPES LAUREANO PINTO

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁLCOOL FENILETÍLICO POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM
MEIO DE CULTURA DESENVOLVIDO COM UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE MAÇÃ (*Malus
domestica*)**

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS COMO PARTE DOS REQUISITOS
EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Orientador(a): Prof^a Dr^a Glaucia Maria Pastore

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO LEONARDO LOPES LAUREANO PINTO, E ORIENTADA
PELA PROF^a. DR^a. GLAUCIA MARIA PASTORE

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 142290/2012-2
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4067-7468>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P658p Pinto, Leonardo Lopes Laureano, 1988-
Produção biotecnológica de álcool feniletílico por fungos filamentosos em meio de cultura desenvolvido com utilização de resíduos de maçã (*Malus domestica*) / Leonardo Lopes Laureano Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Glaucia Maria Pastore.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. Álcool feniletílico. 4. Maçã. I. Pastore, Glaucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biotechnological production of phenylethyl alcohol by filamentous fungi in culture medium developed with apple (*Malus domestica*) wastes

Palavras-chave em inglês:

Biotechnology
Fermentation
PEA (Phenylethylalcohol)
Apple

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Glaucia Maria Pastore [Orientador]
João Claudio Thomeo
Liliana de Oliveira Rocha
Mário Roberto Maróstica Junior
Vânia Battestin Wiendl

Data de defesa: 30-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profª Drª Glauca Maria Pastore (Orientadora)

Universidade Estadual de Campinas

Profº Drº João Claudio Thomeo - Titular

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Profª Drª Lílana de Oliveira Rocha - Titular

Universidade Estadual de Campinas

Profº Drº Mario Roberto Marostica Junior – Titular

Universidade Estadual de Campinas

Profª Drª Vânia Battestin Wiendl - Titular

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de SP

A ATA DA DEFESA COM AS RESPECTIVAS ASSINATURAS DOS MEMBROS ENCONTRA-SE NO PROCESSO DE VIDA ACADÊMICA DO ALUNO.

**“PATIENCE YOU MUST HAVE MY YOUNG PADAWAN”
MASTER YODA**

AOS MEUS PAIS, QUE DEDICARAM A CADA MINUTO UM AMOR INFINITO, PACIÊNCIA, APOIO E COMPREENSÃO. POR TODOS OS ENSINAMENTOS, AS LIÇÕES, OS MOMENTOS FELIZES E POR FAZEREM PARTE DESSA TRAJETÓRIA.

À MINHA AMADA GIULLIANA, NOIVA E COMPANHEIRA DE AVENTURAS, POR TODO SEU AMOR, DEDICAÇÃO, AFETO E CUMPLICIDADE. ESSA CONQUISTA É POR NÓS DOIS. TE AMO CADA MINUTO MAIS. PRINCIPESSA!

AGRADECIMENTOS

À professora Glaucia, minha orientadora, por todo o suporte, oportunidades, confiança e também compreensão durante todo o desenvolvimento da tese;

À CNPq, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse trabalho;

À todos os membros da banca examinadora, titulares e suplentes, por todas as valiosas observações e sugestões para o trabalho;

À todos os amigos que fiz durante todos esses anos no Laboratório de Bioaromas, foi um grande prazer estar ao lado de todos vocês que passaram e todos aos que ainda permanecem no laboratório. Foram muitos momentos juntos e muitos anos de companheirismo, agradeço imensamente a todos vocês que fizeram parte dessa caminhada: Molina, Mari, Ourinhos, Angel, Karine, Géssica, Verônica, Bruno, Marina, Renata, Jane, Ana Paula, Maysa, Henrique, Gustavo, Simiqueli, Cris, Carlos, Nayara, Adones, Michel, Aline, e todos os outros que provavelmente esqueci;

Ao grande Nadirzão, companheiro de todos os dias, que nos aguentava de bom e mau humor, haja o que houver. A Dorinha e a Débora, que me fizeram muita companhia nos momentos mais tensos que passei nesse último ano. Obrigado pela companhia viu mocinhas!

A todos os outros funcionários da FEA que fizeram parte desse processo: Marcão, Marquinhos, Cosme, Andrea, Camila, Nadeje, Rose (sem seus cafés eu provavelmente não teria acabado), e outros, por serem excelentes profissionais e pelo auxílio;

Aos meus queridos amigos da Rep. Intão na qual passei 6 anos e aprendi a trata-los como irmãos. Agradeço a cada um de vocês pelo apoio, compreensão, paciência e companheirismo: Bidê, Pigmeu, Tropeço, Marcola, Alê, Discípulo, Benê, Piniko, Queijo, Miuxa, Felipe, Diegão e Rafa;

Aos meus queridos amigos de graduação que fizeram, também, parte dessa experiência incrível que foi estar na UNICAMP todos esses anos: Piggy, Omelete, Madrugua,

Espanhola, Keka e todos os outros que, mesmo por um breve momento, estiveram aqui ao meu lado;

Gostaria de dedicar salve especial aos meus dois grandes amigos Bidê e Pigmeu: Esses meus dois irmãos sabem tudo que passamos juntos e que serão lembrados para todo o sempre ao meu lado. Obrigado por tudo meus caros;

Aos grandes amigos que a vida me proporcionou quando cheguei em campinas e espero manter contato com todos vocês: Leo Z, Joelma, Pandinhaaa, Zé Valdo, Camilo, Chuckoso, Eloá, Giba, Castioni, Geraldo, Aninha, e todos os outros que passaram por nossa humilde residência.

À minha querida família, meus pais e meu irmão e minha cunhada, por me acompanharem e me apoiarem perante minhas escolhas e decisões.

À minha segunda família, minha sogra, sogro e cunhados, que sempre muito abertos me recebiam de braços abertos sempre que precisei de qualquer coisa. Um agradecimento especial a minha cunhada por todas as tardes de noites jogando videogame e falando mal da vida de todo mundo para passar o tempo.

Aos meus queridos avós, maternos (*in memoriam*) e paternos, me apoiaram em cada minuto e rezaram por mim.

E, é claro, minha querida, amada e dedicada Giulliana.

Agradeço a cada dia de minha vida ter você ao meu lado, agradeço por cada minuto ao seu lado, bem como cada minuto em que, mesmo longe, sei que está aqui comigo. Agradeço por cada minuto ao telefone, por cada frase de afeto e por cada segundo de silencio confortante que você me proporcionou. Agradeço por cada “bom dia”, “boa tarde” e “boa noite” que tenho ao seu lado, agradeço por Deus ter te colocado em meu caminho.

Finalmente, agradeço a Deus por tudo que me proporcionou e a todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A maçã figura entre as 10 frutas mais comercializadas no Brasil, sendo produzidos cerca de 1,3 milhões de toneladas em 2015. A produção de suco de maçã concentrado tem se tornado comum, gerando um resíduo rico em pectina, açúcares e também compostos terpênicos. O α -farneseno é constituinte de óleos essenciais de frutas e é encontrado em frutos cerosos, sendo evidenciado como o principal composto volátil presente no *headspace* de maçã e também utilizado como substrato em processos de biotransformação para a produção de compostos de aroma por fungos filamentosos. A primeira parte do trabalho visou avaliar a concentração de α -farneseno em maçãs das variedades Gala e Fuji através do processo de extração e análise dos compostos voláteis, sendo analisados os parâmetros tempo de estabilização do *headspace* (t_{est}), tempo de exposição da fibra no *headspace* da amostra (t_{exp}) e temperatura (temp), sendo estabelecidos como os melhores parâmetros t_{est} em 30 min, t_{exp} em 30 min e temperatura de 60°C. A segunda parte do trabalho avaliou, de acordo com os parâmetros estabelecidos, a diferença na concentração de α -farneseno entre diferentes amostras e, ficou evidente, que os teores de α -farneseno são muito maiores na maçã *in natura* e em sucos naturais ($1,40 \times 10^{10}$ e $7,42 \times 10^9$, respectivamente) em relação aos sucos comerciais (chegando a $1,39 \times 10^8$). Na terceira parte do trabalho, foram selecionados 40 fungos filamentosos de diferentes fontes e avaliado o potencial de produção de compostos aromáticos de todos em meio de cultura líquido desenvolvido através da utilização do bagaço de maçã, foram selecionados 3 fungos considerados produtores, no qual dois deles produziram um mesmo composto de interesse, o álcool feniletílico. A última parte do projeto teve como foco o processo produtivo do álcool feniletílico pelos dois fungos selecionados. Foram realizadas as análises de composição centesimal, análise dos teores de açúcares presentes e avaliação da produção, onde não foi necessário a alteração do meio de cultura. O perfil de consumo dos açúcares foi condizente com o esperado e, quanto a produção avaliada por área do composto em GC-FID, o tempo de 144 horas foi considerado insuficiente (tendo uma produção final, de 602,4 unidades de área) sendo novamente realizado o processo elevando-se o tempo de processo até 216 horas, atingindo uma produção de 1730,6 unidades de área. Por fim, foi realizado o processo fermentativo comparando-se a capacidade de produção do composto pelo fungo em diferentes meios de cultura com limitação de substrato para melhor avaliação do metabolismo do mesmo. Ficou evidenciado que o composto é produzido em presença de glicos e farneseno individualmente, no entanto a produção é elevada quando em presença de ambos os compostos, como no meio de cultura desenvolvido.

ABSTRACT

The fruticulture are one of the highlights of the Brazilian agrobusiness. The Apple is among the 10 most commercialized fruits, being produced around 1.3 millions tons in 2015. The production of concentrate apple juice is becoming commom, generating wastes rich in pectin, sugars and also terpenic compounds. The α -farneseno is a constituent of essential oils of fruits and found in waxed fruits, being evidenced as the major volatile compound in apple headspace and also used as substrate in biotransformation processes for the production of aroma compounds by filamentous fungi. The first part of the work aimed to evaluate the concentration of α -farnesene in Fuji and Gala apples evaluating the parameters time of stabilization of the headspace (t_{est}), time of exposition of the SPME fiber in the headspace of the sample (t_{exp}) and temperature (temp), being considered the best parameters parameters t_{est} in 30 min, t_{exp} in 30 min e temperature in 60°C. The second part of the work aimed the evaluation, the difference in the concentration of α -farsenene in different samples; It was clear that the content (in total area) was higher in in natura apples and natural juice ($1,40 \times 10^{10}$ e $7,42 \times 10^9$, respectively) in relation with the commercial juice samples (minimun at $1,39 \times 10^8$). The third objective of this study was to verify the ability to produce aromatic compounds by 40 filamentous fungi in a developed liquid culture medium composed by apple wastes. Among the isolated fungi, three were selected based in the ability to produce aromatic compounds and two of them were able to produce phenylethylalcohol (PEA). The last part of the work aimed to determine PEA production by two selected fungi. For this purpose, a centesimal composition and sugar content were assessed, along to the PEA production by the selected fungi and the medium was not changed. After 144 hours of process, the production of PEA, presented in GC-FID area content, could not reach maximum levels (with a final production of 604,2 area units), however, after 216 hours the production profile reached a production of 1730,6 area units. In order to analyse the differences in PEA production based on substrate limitations, culture media containing glucose only, α -farnesene only and both substrate were analysed. The PEA production were observed in all of culture media, with the lowest production in the glucose only medium and the highest production in the glucose/ α -farnesene medium; highlighting that these two compounds are present in the culture medium developed by the current study, which makes it a valuable alternative for PEA production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural e características básicas do Álcool Feniletílico.....	- 37 -
Figura 2. Reação de Friedel-Craft para a produção de Álcool Feniletílico.....	- 42 -
Figura 3. Reação de redução do óxido de estireno para a síntese de Álcool Feniletílico.....	- 43 -
Figura 4. Via de Ehrlich para a produção de Álcool Feniletílico por micro-organismos.	- 45 -
Figura 5. Representação gráfica da superfície de resposta obtida através dos dados da concentração de alfa-farneseno em maçã gala.....	- 60 -
Figura 6. Representação gráfica da superfície de resposta obtida através dos dados de alfa-farneseno em maçã fuji.	- 63 -
Figura 7. Representação gráfica da superfície de resposta obtida pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã gala.	- 68 -
Figura 8. Representação gráfica da superfície de resposta obtida pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã fuji.....	- 70 -
Figura 9. Amostragem das amostras comerciais de suco de maçã analisadas quanto ao teor de alfa-farneseno.	- 77 -
Figura 10. Fórmulas estruturais dos compostos (a) 1-hexanol e (b) beta-cariofileno.....	- 91 -
Figura 11. Cromatograma representando o processo produtivo de 1-hexanol e beta-cariofileno pelo fungo "FX_A".	- 92 -
Figura 12. Representação gráfica da produção de 1-hexanol pelo fungo "FX_A".	- 93 -
Figura 13. Representação gráfica da produção de beta-cariofileno pelo fungo "FX_A".	- 94 -
Figura 14. Fórmula estrutural do Álcool Feniletílico.	- 96 -
Figura 15. Cromatograma representando o processo de produção do Álcool Feniletílico pelos fungos "CSC2_F1" e "CSC2_P3".	- 96 -

Figura 16. Representação gráfica da produção do Álcool Feniletílico pelos micro-organismos "CSC2_F1" e CSC2_P3", resultados em unidades de área obtidos em GC-FID.....	- 98 -
Figura 17. Representação gráfica da produção do Álcool Feniletílico pelos micro-organismos "CSC2_F1" e CSC2_P3", resultados em unidades de área obtidos em GC-MS.....	- 99 -
Figura 18. Gráficos de consumo dos açúcares pelo fungo "CSC2_F1" durante o processo fermentativo.....	- 105 -
Figura 19. Gráfico do crescimento da biomassa seca do fungo "CSC2_F1" durante o processo fermentativo.....	- 105 -
Figura 20. Representação gráfica da produção de Álcool Feniletílico pelo fungo "CSC2_F1"	- 107 -
Figura 21. Cromatograma da produção de Álcool Feniletílico pelo fungo "CSC2_F1" até 216h.....	- 108 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis utilizadas no estudo primário das condições de extração dos compostos voláteis de maçã.....	- 50 -
Tabela 2. Dados do estudo primário das condições de extração do alfa-farneseno	- 58 -
Tabela 3. Coeficientes de regressão linear da variedade gala.	- 59 -
Tabela 4. Tabela ANOVA completa da variedade gala.	- 60 -
Tabela 5. Coeficientes de regressão linear da variedade fuji.	- 61 -
Tabela 6. Tabela ANOVA completa dos dados da variedade fuji.	- 62 -
Tabela 7. Estudo das condições de extração dos compostos voláteis de maçã.	- 65 -
Tabela 8. Resultados da avaliações das condições de extração de alfa-farneseno em maçã	- 66 -
Tabela 9. Coeficientes de regressão linear do segundo estudo da variedade gala.....	- 67 -
Tabela 10. Tabela ANOVA dos dados do segundo estudo das condições de extração para a variedade gala.....	- 67 -
Tabela 11. Coeficientes de regressão linear do segundo estudo da variedade fuji.....	- 69 -
Tabela 12. Tabela ANOVA dos dados do segundo estudo das condições de extração para a variedade fuji.	- 69 -
Tabela 13. Análise dos dados obtidos pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã fuji.....	- 71 -
Tabela 14. Análise dos dados obtidos pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã gala.	- 73 -
Tabela 15. Análise do teor de alfa-farneseno nas diferentes amostras analisadas	- 80 -
Tabela 16. Lista de micro-organismos isolados para testes.....	- 85 -
Tabela 17. Resultados de produção dos compostos 1-hexanol e beta-cariofileno pelo fungo "FX_A" . . .	- 93 -

Tabela 18. Áreas correspondentes a produção do Álcool Feniletílico analisados em GC-FID e GC-MS pelos fungos "CSC2_F1" e "CSC2_P3"	- 97 -
Tabela 19. Determinação da composição centesimal do bagaço de maçã e do meio de cultura desenvolvido utilizando o mesmo bagaço.	- 103 -
Tabela 20. Avaliação da concentração dos açúcares presentes durante a fermentação do meio com o fungo "CSC2_F1"	- 104 -
Tabela 21. Produção de Álcool Feniletílico pelo fungo "CSC2_F1".	- 106 -
Tabela 22. Produção do Álcool Feniletílico em diferentes meios com limitação de fontes de carbono..	- 109 -

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ppm – Parte por milhão

ppb – Parte por bilhão

FDA – Food and Drugs Administration

μm - micrometro

ng – nanogramas

ngL⁻¹ – nanograma por Litro

mg – miligramas

ton – toneladas

min - minutos

PEA – Phenylethyl Alcohol

2-PE – 2-Phenyl Ethanol

MO(s) – Micro-Organismo(s)

SPME – Solid Phase Micro Extraction

GC-FID – Gas Chromatography Flame Ionization Detector

GC-MS – Gas Chromatography Mass Spectrometer

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

Temp – Temperatura do processo de análise dos compostos voláteis

t_{est} – Tempo de estabilização dos compostos voláteis no *headspace*

t_{exp} – Tempo de exposição da fibra no *headspace* da amostra analisada

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	- 19 -
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 21 -
2.1.	AVALIAÇÃO MERCADOLÓGICA E DISPONIBILIDADE DA MAÇÃ.....	- 21 -
2.2.	PRODUÇÃO DE AROMAS NATURAIS POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	- 23 -
2.3.	PRODUÇÃO DE AROMAS POR FUNGOS	- 28 -
2.4.	UTILIZAÇÃO DE TERPENOS COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AROMAS.....	- 31 -
2.4.1.	FARNESENO: INTERESSE, OCORRÊNCIA NA NATUREZA E PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA	- 33 -
2.4.2.	DISPONIBILIDADE MERCADOLÓGICA DO FARNESENO	- 35 -
2.5.	ÁLCOOL FENILETÍLICO	- 36 -
2.5.1.	CARACTERÍSTICAS BÁSICAS	- 36 -
2.5.2.	CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DO ÁLCOOL FENILETÍLICO.....	- 39 -
2.5.3.	PRODUÇÃO DO ÁLCOOL FENILETÍLICO.....	- 40 -
2.5.3.1.	SÍNTESE QUÍMICA	- 41 -
2.5.3.2.	REAÇÃO DE FRIEDEL-CRAFT	- 42 -
2.5.3.3.	SÍNTESE DE GRIGNARD	- 42 -
2.5.3.4.	REDUÇÃO DO ÓXIDO DE ESTIRENO	- 43 -
2.5.3.5.	ROTAS BIOQUÍMICAS	- 44 -
2.5.3.6.	VIA DE EHRLICH	- 44 -
2.5.3.7.	SÍNTESE <i>DE NOVO</i>	- 45 -
3.	OBJETIVOS	- 47 -
3.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	- 47 -
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 47 -
4.	MATERIAL & MÉTODOS	- 48 -
4.1.	ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS	- 48 -

4.1.1.	SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	- 48 -
4.2.	LEVANTAMENTO DO PERFIL VOLÁTIL DE MAÇÃ E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FARNESENO	- 49 -
4.2.1.	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE A-FARNESENO DE MAÇÃ	- 50 -
4.2.2.	ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	- 51 -
4.3.	PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	- 51 -
4.3.1.	DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO	- 52 -
4.3.2.	PROCESSO FERMENTATIVO.....	- 53 -
4.4.	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PELA TÉCNICA DE SPME.....	- 54 -
4.5.	ANÁLISE DOS ESPECTROS CROMATOGRÁFICOS	- 54 -
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 55 -
	- PARTE I -	- 56 -
	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO FARNESENO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DETECÇÃO DE FARNESENO EM MAÇÃS GALA E FUJI	- 56 -
5.1.	ESTUDO PRIMÁRIO DA EXTRAÇÃO DE A-FARNESENO NAS VARIEDADES FUJI E GALA.	- 58 -
5.1.1.	VARIEDADE GALA	- 59 -
5.1.2.	VARIEDADE FUJI	- 61 -
5.1.3.	COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIEDADES GALA E FUJI	- 63 -
5.2.	ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE A-FARNESENO NAS VARIEDADES GALA E FUJI	- 64 -
5.2.1.	VARIEDADE GALA	- 66 -
5.2.2.	VARIEDADE FUJI	- 68 -
5.2.3.	COMPARAÇÃO DO SEGUNDO ESTUDO ENTRE AS VARIEDADES GALA E FUJI	- 70 -
5.3.	CONCLUSÃO	- 75 -
	- PARTE II-	- 76 -
	AVALIAÇÃO DO TEOR DE FARNESENO EM SUCO DE MAÇÃ NATURAL E AMOSTRAS COMERCIAIS	- 76 -
5.4.	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ.....	- 79 -

5.5.	CONCLUSÃO	- 81 -
	- PARTE III-	- 83 -
	DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA DE BAGAÇO DE MAÇÃ E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.	- 83 -
5.6.	MICRO-ORGANISMOS SELECIONADOS.....	- 83 -
5.7.	DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA.....	- 85 -
5.8.	PROCESSO FERMENTATIVO.....	- 88 -
5.9.	RESULTADOS OBTIDOS	- 89 -
5.9.1.	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS PELO FUNGO “FX_A”	- 90 -
5.10.	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS PELOS FUNGOS “CSC2_F1” E “CSC2_P3”	- 95 -
5.11.	CONCLUSÃO	- 99 -
	- PARTE IV-	- 101 -
	PRODUÇÃO DE ÁLCOOL FENILETÍLICO PELO FUNGO “FUJI CASCA 2 F1”	- 101 -
5.12.	RESULTADOS OBTIDOS	- 102 -
5.13.	CONCLUSÃO	- 111 -
6.	CONCLUSÃO GERAL	- 111 -
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	- 112 -
8.	REFERÊNCIAS	- 114 -

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura é um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro. Com sua grande variabilidade climática e a possibilidade de uma vasta gama de produtos diferenciados em todo o país a fruticultura apresenta resultados expressivos e oportunidades para os produtores locais e pequenos negócios em todo o país. Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas da China e da Índia, o que mostra a relevância deste setor para a economia nacional (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2015).

No ano de 2013 o Brasil foi responsável pela produção de aproximadamente 43 milhões de toneladas de frutas e foram utilizados cerca de 2,2 milhões de hectares para a produção das mesmas. Deste total, estima-se que cerca de 23 milhões de toneladas foram destinados a indústria do processamento, que atende basicamente os segmentos de sucos, néctares, drinques de frutas e polpas (Sebrae, 2015).

Dentre todos os frutos produzidos pelo agronegócio brasileiro, a maçã figura entre as 10 frutas mais cultivadas do país e também entre as mais exportadas. Segundo os dados do Sebrae, foram produzidos aproximadamente 1,3 milhões de toneladas de maçã pelo setor agroindustrial brasileiro, onde cerca de 45 mil toneladas foram exportadas, o que representou US\$31 milhões de dólares. Porém, segundo os dados apresentados, menos de 5% dos frutos produzidos foram exportados, significando que grande parte do total foi destinada ao mercado interno brasileiro, para ser consumido *in natura* ou para a indústria de processamento (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2015).

Dentro do contexto da fruticultura brasileira um grande destaque deve ser dado aos resíduos agroindustriais gerados por esse mercado. É certo que grande parte dos frutos é comercializado *in natura*, porém todos os frutos que não atendem os níveis de qualidade do mercado nacional e internacional são destinados as indústrias para beneficiamento. O processo de produção de suco de maçã concentrado tem se tornado muito comum no Brasil, gerando uma grande quantidade de resíduos (Janzanetti, Franco e Wosiack, 2003).

No caso da produção de sucos de maçã concentrados, o resíduo gerado está fortemente associado à pectina, porém ainda há a presença de açúcares e compostos terpênicos associados, principalmente, à casca e à cera da fruta *in natura*. Assim como outros resíduos da indústria de alimentos, é de extrema importância o estudo da aplicação desses resíduos em diferentes processos biotecnológicos para um melhor aproveitamento e diminuição do resíduo gerado.

Os méritos do trabalho estão associados diretamente ao aproveitamento dos resíduos gerados pelo processo de produção de suco da maçã, agregando valor ao mesmo uma vez que esse é, em grande parte, direcionado à alimentação de ruminantes como fonte de fibras. O ineditismo do projeto está diretamente relacionado ao aproveitamento do resíduo aliado ao isolamento de micro-organismos com potencial para produção de compostos aromáticos por fermentação líquida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AVALIAÇÃO MERCADOLÓGICA E DISPONIBILIDADE DA MAÇÃ

A maçã (*Malus domestica sp.*) é um fruto de clima temperado e sua produção no Brasil está em crescimento, mas mesmo sendo muito consumida no país até pouco tempo atrás grande parte da produção do fruto era importado pelo mercado nacional. Nos últimos 20 anos a produção do fruto no Brasil cresceu, chegando a uma produtividade de aproximadamente 1,4 milhões de toneladas do fruto ao ano (dados de 2014), índice ainda muito baixo perto de países como a China, maior produtor mundial da fruta, com uma produção de cerca de 16 milhões de toneladas da fruta anualmente (IBGE, 2015).

A produção anual de maçã pelo setor agroindustrial brasileiro tem crescido nas últimas décadas. Levantamentos mostram um crescimento anual na produção deste fruto onde, na safra de 2005, fora registrada uma produção de 850 mil toneladas do fruto chegando a um aumento de quase 50% do total da produção na safra de 2014, atingindo 1,4 milhões de toneladas (IBGE, 2015). Segundo as projeções para os cultivares de maçã no país, acredita-se que será alcançado um total de 1,6 milhões de toneladas nos próximos 5 anos (FAO, 2015).

Esse crescimento na produção de maçã no Brasil fez com que o país passasse a ser auto suficiente na quantidade de maçã consumida e, mesmo que de maneira pouco impactante, começasse a exportar o fruto para o mercado europeu (IBGE, 2015).

Pela variabilidade do clima e localização geográfica interessantes para a produção de maçã, os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina se destacam na produção da maçã, resultando na quase totalidade da produção localizada na região Sul do país, onde mais de 99%

dos frutos são produzidos. O estado do SP ocupa a segunda posição apresentando em torno de 0,6% da produção anual da safra 2014 exatamente pelo fato de ambos terem climas que mais se assemelham as áreas tropicais a qual os frutos são adaptados (IBGE, 2015).

É certo que grande parte dos frutos produzidos é comercializado para consumo *in natura*, entretanto, parte dos frutos não atendem os níveis de qualidade do mercado nacional e nem internacional e acabam sendo destinados para as indústrias de beneficiamento. O processo de produção do suco de maçã concentrado tem se tornado muito comum no Brasil, gerando um resíduo composto pela casca e polpa da maçã (Janzanetti, Franco e Wosiack, 2003).

No processo de produção das polpas e sucos concentrados, grande parte do resíduo gerado está fortemente associado com a pectina, porém ainda existem muitos compostos como açúcares e outros associados. Dentre todo esse resíduo gerado ainda temos grandes proporções de casca, associada também à camada cerosa, que é responsável pela retenção de grande parte dos compostos relacionados ao *flavour* dos frutos e que, conseqüentemente, acaba sendo subutilizada e aplicada no processo produtivo de rações para animais de grande porte por apresentarem alto teor de fibras e baixo valor agregado (Janzanetti, Franco e Wosiack, 2003).

Os compostos voláteis presentes no *bouquet* de aromas da maçã são muito variáveis, sendo os principais fatores a variação do cultivar avaliado e as condições de cultivo. Em Estudos realizados por Janzanetti, Franco e Lanças (2000) com maçãs Fuji, ficou evidenciado que o α -

farneseno, juntamente com alguns ésteres de maior peso molecular, são os compostos majoritários na porção volátil de frutos da maçã.

A presença de compostos terpênicos nos resíduos de bagaço de maçã indicam que essa pode ser uma potencial matéria-prima para a produção de novos meios de cultura para a produção de compostos voláteis. Na última década, diversos estudos evidenciaram a utilização de compostos terpênicos (monoterpenos e sesquiterpenos) como fontes de carbono para a produção de compostos aromáticos por biotransformação. (Maróstica Jr. & Pastore, 2006; Maróstica Jr. & Pastore, 2007; Bicas, 2009; Bicas, Dionísio & Pastore, 2009; Pimentel, 2012; Molina *et al.*, 2013; Molina, 2014; Paulino, 2014).

2.2. PRODUÇÃO DE AROMAS NATURAIS POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

O consumo de alimentos e bebidas está diretamente relacionado ao estímulo dos sentidos humanos. O sabor de um alimento é nada mais que uma resposta integrada às sensações de gosto e aroma. O gosto é atribuído aos compostos não voláteis presentes nos alimentos como os açúcares, sais e ácidos enquanto o aroma é uma mistura complexa de substâncias voláteis, representadas por diversas classes químicas que apresentam diferentes propriedades físico-químicas (Franco, 2003).

Os aromas sempre fizeram parte da história da humanidade, sendo que antigamente eram utilizados para verificar se um alimento estava adequado para o consumo ou para diferenciar plantas nocivas das comestíveis (Dubal *et al.*, 2008). A sensação de um aroma é desencadeada por uma mistura complexa de moléculas de diversas classes químicas, que

ocorrem em pequenas concentrações, detectadas pelas células receptoras específicas do epitélio olfatório, localizadas na cavidade nasal (Berger, 1995).

Os compostos de aroma são moléculas de baixa massa molecular que, apesar de não representar função nutritiva nos alimentos, são frequentemente utilizados como aditivos na indústria de alimentos, bebidas, perfumes e cosméticos com a função de realçar, reforçar, adicionar ou melhorar o odor do produto. Estes compostos podem ser extraídos diretamente de fontes vegetais, mas podem também, ser produzidos por agentes químicos ou biológicos (Berger, 1995).

Os compostos de aroma não apresentam uma única estrutura ou função química específica, podendo ser hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres, lactonas, ésteres, entre outros. Podem apresentar-se em diferentes matrizes alimentícias em concentrações muito baixas (na faixa de parte por milhão, ppm, ou até mesmo parte por bilhão, ppb) e podem apresentar diferentes polaridades, solubilidades, volatilidade, temperatura e pH de estabilidade (Bicas, 2009).

Nas últimas décadas, o avanço da área de alimentos (tecnologia, desenvolvimento e indústrias) fez a utilização de aromas artificiais crescer exponencialmente e, com isso, despertou um alerta para o consumo de compostos artificiais que, por sua vez, levou a um aumento da preferência dos consumidores por produtos rotulados como naturais em relação aos artificiais. Essa preferência abriu um campo enorme na área biotecnológica de produção de aromas naturais, também chamados de bioaromas ou aromas biotecnológicos (Dubal *et al.*, 2008).

A definição da natureza de aromas naturais varia de acordo com as diferentes agências regulatórias presentes nos diferentes países ou regiões. A legislação brasileira (ANVISA, Resolução nº 2, 2007) define como aromas naturais aqueles obtidos por métodos físicos, microbiológicos, fermentativos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes ou aromas naturais, semelhantemente às legislações das agências norte-americana (FDA: Code of Federal Regulations, 21CFR101.22) e europeia (Council Directive 88/388/EEC) (Brasil, 1999; Chiappini, 2008; Demyttenaere, 2001).

A obtenção de aromas de fontes naturais apresenta uma alta dependência da sazonalidade das matérias-primas, fatores climáticos que possam influenciar de forma determinante na produção dos compostos do metabolismo secundário das plantas e também da necessidade de alta tecnologia para separação desses compostos (Bicas, 2009).

Nesse contexto, a grande quantidade de matéria-prima requerida para a extração dos compostos, juntamente aos altos custos de processo, a geração de resíduos (devido ao uso de solventes orgânicos) e, conseqüentemente, os problemas ecológicos de resíduos gerados e do extrativismo acabam sendo fatores limitantes para a aplicação dessa tecnologia para uma grande variedade desses compostos (Bicas, 2009; Maróstica Jr. & Pastore, 2006).

Dados fornecidos por Krings e Berger (1998) mostram que durante a década de 90 cerca de 80% dos aromas consumidos mundialmente pela indústria foram produzidos quimicamente. Entretanto alguns mercados mais exigentes, como a Alemanha, já possuíam cerca de 70% do seu mercado de aromas dominado pelos aromas naturais, uma tendência que viria a dominar outros países nos anos seguintes, por conta do apelo aos alimentos naturais, maior valor nutricional e potencial a saúde humana.

O mercado de aromas e fragrâncias tem crescido muito desde aquela época quando, segundo Somogyi (1996) essa parcela do mercado havia sido responsável pelo montante de aproximadamente US\$ 9,7 bilhões. Na década seguinte houve um grande crescimento, atingindo cerca de US\$ 12,6 bilhões em 2006 (IAL Consultants, 2007), subindo até US\$ 21,8 bilhões em 2011 e ultrapassando a marca de US\$24,1 bilhões em 2015 (Leffingwell and Associates, 2015). A projeção estima um crescimento para os próximos anos, onde deve-se atingir a marca de US\$30 bilhões até o ano de 2020 (IAL Consultants, 2016).

A obtenção em escala industrial por extração de fontes naturais mostra-se inviável mercadologicamente. Somente compostos que não podem ser quimicamente reproduzidos acabam sendo obtidos por essa via e, portanto, a síntese química tem uma predominância no processo de produção de compostos de aroma no mundo. Segundo Xu, Hua & Ma (2007) no mercado mundial de aromas apenas 5% do total ainda é produzido pelo processo de extração de fontes naturais e dos 95% restantes existe um amplo domínio de métodos químicos de produção desses compostos.

A biotecnologia surgiu como uma alternativa proeminente, permitindo estudos para obtenção de compostos de aroma que atendam às exigências dos consumidores e das agências regulatórias, visando obter produtos cada dia mais naturais e diminuindo o impacto ambiental causado por esses processos, sendo importante ressaltar a preferência notável e crescente dos consumidores por alimentos que contenham ingredientes naturais em sua formulação em detrimento dos aditivos sintéticos (Serra, Fuganti e Brenna, 2005).

O processo de produção de aromas por vias biotecnológicas apresenta-se basicamente por duas vias: a síntese *de novo* e a biotransformação/bioconversão. O processo de síntese *de*

novo implica na produção de aromas utilizando-se apenas os meios de culturas convencionais, sem a adição de substratos especiais e depende do arsenal metabólico do micro-organismo para a produção de aromas. Já o processo de biotransformação/bioconversão tem como objetivo a utilização de um substrato pré-selecionado e apenas parte da rota metabólica do micro-organismo capaz de biotransformar o substrato em um produto específico (Serra, Fuganti e Brenna, 2005).

Muitos outros fatores corroboram para a ascensão dos processos biotecnológicos e produção de compostos de aromas como redução de custos, melhoramento de processos e, principalmente, na possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes como, por exemplo, resíduos ricos em compostos terpênicos e carotenoides (Pandey *et al.*, 2000; Bauer, Garbe e Surburg, 2001; Lee, Schmidt-Dannert, 2002; Maróstica Jr. e Pastore, 2007; Bicas, 2009; Bicas, Dionísio e Pastore, 2009).

Para evidenciar a diferença marcante nos valores para a obtenção desses compostos, Feron *et al.* (1996) ressaltou que um aroma produzido quimicamente apresenta uma discrepância significativa, sendo expressivamente mais barato. No caso da produção da vanilina, por exemplo, o composto sintético pode ser comercializado por US\$12 kg⁻¹ enquanto o preço da vanilina natural obtida do processo de extração de favas de baunilha pode chegar a um custo de US\$4.000 kg⁻¹.

Grande parte dos resíduos gerados pela indústria agroalimentar é sumariamente descartado no meio ambiente ou aproveitado como fonte de alimentação para animais de grande porte devido ao seu baixo custo. No entanto, o aproveitamento destes resíduos poderia contribuir positivamente para a redução dos impactos ambientais e obtenção de

produtos com maior valor agregado. Desta forma o aproveitamento representa uma ótima alternativa para a obtenção de insumos para a indústria, seja ela química, farmacêutica, cosmética ou alimentícia (Maróstica Jr. & Pastore, 2007).

Uma vasta gama de processos pode ser viabilizada com a utilização desses resíduos pela indústria como, por exemplo, utilização como substrato para conversão ou crescimento de biomassa microbiana. Diversas classes de micro-organismos são utilizadas pela indústria de produção de aromas como fungos, bactérias e leveduras provenientes das mais diversas fontes como solo, resíduos, frutos, sementes e, inclusive, tem-se aumentado o interesse em micro-organismos endofíticos (Bicas, 2009; Pimentel, 2012; Strobel *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2013; Molina, 2014).

A biotecnologia é uma área em plena expansão nos últimos anos e pode trazer excelentes ganhos dentro dos processos produtivos de compostos aromáticos e também para um melhor aproveitamento e agregação de valor aos resíduos agroindustriais gerados no nosso país e no mundo. Os processos hoje conhecidos encontram-se em pleno desenvolvimento visando melhoramento dos resultados, maiores rendimentos, menores influências e, conseqüentemente, produtos naturais com maior relevância industrial.

2.3. PRODUÇÃO DE AROMAS POR FUNGOS

Desde o aparecimento e, principalmente, dos estudos dos alimentos produzidos por processos fermentativos como cervejas, vinhos, queijos e molho de soja, entre outros, foi também descoberto que os processos microbianos têm desempenhado um papel de extrema importância na mistura complexa dos aromas presentes nesses alimentos.

O descobrimento dos primeiros compostos de aroma presentes nos alimentos data de cerca de 200 anos atrás com a identificação do benzaldeído (Liebig and Woehler, 1837). O início da produção moderna de compostos aromáticos foi marcado pela identificação e síntese da vanilina (Tiemann and Haarmann, 1874; Reimer and Tiemann, 1876).

No entanto, as primeiras publicações mais detalhadas sobre a produção microbiológica dos compostos aromáticos vieram somente algum tempo depois, após a década de 1920 (Omelianski, 1923). Passados alguns anos desse fato, na década de 1950, o aparecimento e desenvolvimento da técnica de cromatografia gasosa foi decisiva no processo de separação e identificação de compostos voláteis em detrimento dos métodos orgânicos clássicos de análises desses compostos (Krings e Berger, 1998).

Estudo conduzido por Pyysalo e Suihko (1976) teve como propósito analisar e evidenciar a concentração, bem como caracterizar, dos diferentes aromas detectados em algumas espécies de fungos filamentosos (cogumelos). Nesse estudo foram capazes de detectar 1-octen-3-ol (aroma característico de cogumelo) na concentração de 0,010 mg/kg, 1-octen-3-ona (aroma de cogumelos cozidos) na concentração de 0,004 mg/kg, trans-1-octenal (doce, fenólico) na concentração de 0,003 mg/kg, 3-octanol (aroma de óleo de fígado de bacalhau) na concentração de 0,018 mg/kg, 3-octanona (odor doce, frutado) na concentração de 0,050 mg/kg, octanol (doce, detergente e sabão) na concentração de 0,48 mg/kg, 1-octan-3-il acetato (aroma de cogumelo fresco) na concentração de 0,09 mg/kg e 1-octan-3-il propionato (aroma de cogumelo fresco, doce e frutado) na concentração de 0,22 mg/kg.

A utilização de micro-organismos para processos de produção de compostos de aroma foi se desenvolvendo com o passar dos anos e, dentre eles, o espectro de compostos voláteis produzidos por fungos é o que mais se aproxima da grande variedade de aromas produzidos pelas plantas na natureza (Krings e Berger, 1998).

Após o desenvolvimento dessa área, foi possível identificar uma grande gama de processos para a produção dos mais diversos compostos por fungos como Vanilina (Falconnier *et al*, 1994), benzaldeídos (Fabre, Blanc e Goma, 1996), metil salicilato (Welsh, 1994; Manley, 1994), metil benzoatos e etil benzoatos (Kawabe e Morita, 1993), álcool feniletílico e ésteres (Welsh, 1994; Berger, 1995; Berger, 1996), 1-octanol e 1-octanona (Armstrong *et al*, 1993; Assaf, Hadar e Dosoretz, 1995), pirazinas (Seitz, 1994), linalol, geraniol e citronelol (Welsh, 1994; Krings, Abraham e Berger, 1995), cumarinas (Berger, 1995), metil cetonas (Armstrong *et al*, 1993; Hagedorn e Kaphammer, 1994), os jasmonatos e o ácido jasmônico (Miersch *et al*, 1993) entre muitos outros descritos.

Os primeiros estudos documentados para diferentes compostos estão sempre relacionados com o *screening* inicial de micro-organismos e sua capacidade geral de produção de compostos de aroma, entretanto técnicas mais modernas podem ser também aplicadas nessa área, como a engenharia genética, que tem ganhado muita força e é aplicada como parte do processo de elevação da eficiência dos processos e biocatálise (Krings e Berger, 1998).

2.4. UTILIZAÇÃO DE TERPENOS COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AROMAS

Os compostos terpênicos são hidrocarbonetos insaturados derivados da polimerização de unidades de isopreno (C_5H_8) e estão amplamente associados às características odoríferas e de atração de agentes polinizadores e são exaustivamente encontrados na indústria de aromas e fragrâncias (Langenheim, 1994; Bicas *et al.*, 2008; Paulino, 2014).

As diferentes classes de compostos terpênicos são classificadas de acordo com o número de moléculas de isopreno que compõem a sua estrutura e, conseqüentemente, o número de carbonos presentes. São encontrados como monoterpenóides (dez carbonos), sesquiterpenóides (quinze carbonos), diterpenóides (vinte carbonos), triterpenóides (trinta carbonos) e tetraterpenóides ou carotenoides (quarenta carbonos) (Ruzicka, 1953).

O Termo GRAS (Generally Recognized As Safe) foi cunhado em resposta à uma recomendação sobre Aditivos Alimentares criada pela agência nacional americana de Comidas, Drogas e Cosméticos - Lei pública 85-929,72 Stat. 1784 (1958) – que isentava dúvidas sobre aditivos alimentares que eram “geralmente reconhecidos pelos profissionais qualificados, com treinamento científico adequado e a experiência necessária, serem seguros para uso sob as condições de utilização pretendida”. Sob essas condições, as substâncias consideradas “GRAS” não devem ser considerados aditivos e são excluídas da avaliação pré-mercadológica exigida pelos órgãos oficiais - Food and Drugs Administration (FDA), no caso dos EUA (Smith *et al.*, 2009)

Uma característica interessante observada nos compostos terpênicos é que grande parte dessas moléculas são consideradas GRAS e, por esse motivo, esses compostos são muito utilizados como aditivos alimentares e fragrâncias pelas indústrias (Teceção, Van Keulen & Fonseca, 2001). Alguns poucos compostos terpênicos são considerados inseguros para a indústria de alimentos e cosméticos e não devem ser utilizados como 2-isopropylidenecyclohexanona e pulegona (Smith *et al*, 2009).

Muitos compostos terpênicos são encontrados em grandes quantidades em óleos essenciais e suas principais características odoríferas são atribuídas a mono e sesquiterpenóides, por serem voláteis devido à menor massa molecular de suas estruturas. Em muitos casos, o odor presente em frutas, ervas e especiarias são resultantes de alguns compostos terpênicos voláteis (Teisseire, 1994; Krings *et al.*, 2006).

Uma possibilidade para a produção de aromas naturais é a utilização de terpenos, pois diversas características os tornam substratos ideais para processos biotecnológicos. Compostos terpênicos são bons pontos de partida para a síntese de produtos químicos refinados devido à sua similaridade estrutural com os produtos resultantes e representam um grande potencial para experimentos de conversão microbiana (Molina, 2014).

A crescente demanda por produtos naturais e funcionais tem intensificado as pesquisas e aplicações dessa tecnologia. A produção de compostos de aroma está intimamente ligada às pesquisas nas áreas de biocatálise e biotransformação por micro-organismos selecionados, aliados a busca por metodologias mais simples, mais baratas e com melhores rendimentos (Molina, 2014).

2.4.1. FARNESENO: INTERESSE, OCORRÊNCIA NA NATUREZA E PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA

O sesquiterpeno farneseno é um constituinte natural de óleos essenciais de frutas, atingindo concentrações de até 1% em óleo essencial de limão comercial, por exemplo. Além disso, está presente também na serosidade da casca de maçã, toranja, casca de limão, laranja, mandarim e no pimentão (Krings *et al.* 2006). A análise de compostos de voláteis de *headspace* em maçã mostrou que o α -farneseno é o principal composto volátil, totalizando aproximadamente 30% do *headspace* (Whiting, 1998).

O α -farneseno é caracterizado como tendo um aroma amadeirado, verde e com notas de lavanda. Existem vários compostos secundários obtidos através do α -farneseno que podem apresentar os mais diferenciados aromas como, por exemplo o α -sinesal que apresenta o aroma de laranja, descrito como o cheiro da casca fresca da fruta da espécie *Citrus sinensis* (Rutaceae) e também o farnesol, encontrado em óleos essenciais de flores e apresenta aroma agradável de flor de tília, lírio do vale e muito utilizado em perfumarias (Breitmaier, 2006).

O α -farneseno é comumente encontrado na cera que envolve a casca de peras e maçãs e sua biossíntese aumenta durante o amadurecimento da fruta ou estocagem refrigerada, pois está diretamente relacionada com o aumento da produção de etileno interno (Ju e Curry, 2000). Os produtos de oxidação derivados do farneseno têm sido relacionados com a ocorrência de uma doença fisiológica que resulta no aparecimento de manchas escuras ou marrom na casca dos frutos cerosos (como maçãs e peras) após a mesma ser removida da estocagem refrigerada (Anet, 1972; Ingle e D'Souza, 1989; Whitaker *et al.*, 2000). Assim, este composto tem sido objeto de estudo com foco no amadurecimento de maçãs, no entanto,

estudos utilizando o α -farneseno como substrato em conversões microbianas ainda é muito incipiente.

A primeira tentativa de biotransformação de farneseno para produzir *R*-sinensal, aroma cítrico potente com *threshold* ao redor de 50 ng kg⁻¹, resultou em um rendimento muito baixo de produção (Abraham, Arfmann e Giersche, 1992). Em um estudo mais aprofundado, Krings *et al.* (2006) realizaram uma seleção de micro-organismos com potencial para biotransformar o α -farneseno. Todas as linhagens selecionadas produziram 3,7,11-trimetildodeca-1,3(E),5(E)10-tetraen-7-ol, um composto com aroma cítrico agradável e picos de concentração de 170 mg L⁻¹. Outro produto encontrado e citado como o aroma mais interessante obtido foi menth-1-en-3-[2-metil-1,3-butadienyl]-8-ol diastereomérico, descrito como aroma de damasco.

Segundo Maróstica Junior *et al.* (2006), após análises químicas e analíticas dos compostos voláteis formados pelo processo de biotransformação do farneseno, ficou evidenciado a habilidade de fungos filamentosos para convertê-lo em compostos derivados oxifuncionais, sendo este trabalho o primeiro a comprovar a biotransformação do farneseno.

Diante desses fatos, o presente trabalho buscou o reaproveitamento de um resíduo da indústria agroalimentar para o desenvolvimento de um meio de cultura com altos teores de farneseno em sua composição e avaliação da potencialidade do meio para a produção de compostos aromáticos por fermentação submersa realizada com fungos isolados de fontes ricas em compostos terpênicos.

2.4.2. DISPONIBILIDADE MERCADOLÓGICA DO FARNESENO

Apesar de ser pouco explorado até o momento, o farneseno tem ganhado espaço em pesquisas mundiais, porém, não na área de alimentos funcionais e compostos aromáticos, mas sim, pela possível aplicação como biodiesel em substituição ao combustível fóssil.

Na última década foram investidos milhões de dólares pela empresa Amyris na obtenção do produto comercial chamado Biofene®. Esse produto nada mais é que o farneseno comercial que, por suas propriedades físico químicas, pode ser um substituto viável para a substituição, principalmente, do óleo diesel. Porém essa aplicação está longe de ser considerada a única opção para esse composto (Oliveira, 2008).

A produção do BioFene® pela Amyris abriu um novo leque de opções para esse composto, uma vez que a obtenção desse composto por extrativismo e a purificação do mesmo eram muito dispendiosas e custosas para as empresas. A disponibilidade do farneseno comercial fez com que novas empresas se interessassem novamente em investir no estudo desse composto surgindo parcerias com a empresa fabricante do composto para fornecer matéria prima para suas pesquisas (Oliveira, 2008).

Empresas multinacionais como a Givaudan, líder mundial do mercado de aromas e fragrâncias, e a Soliance, uma das líderes do mercado de insumos para cosméticos (que viria a ser comprada pela própria Amyris alguns anos depois), firmaram parcerias com a empresa americana produtora do composto afim de conseguirem incentivos para estudos de utilização desse farneseno para a produção de compostos de interesse. A Givaudan firmou parceria com a Amyris para estudos do farneseno para a produção de compostos de aroma, enquanto a

Soliance firmou a parceria para o uso desse composto como substrato para a indústria de cosméticos.

Diante do crescente interesse por esse composto, inclusive de indústrias multinacionais, este trabalho teve como destaque a utilização de uma fonte significativamente mais barata de farneseno como matéria prima para o desenvolvimento de um meio de cultura onde micro-organismos selecionados de fontes ricas em compostos terpênicos fossem testados para avaliar o seu potencial para a produção de compostos de aroma.

2.5. ÁLCOOL FENILETÍLICO

2.5.1. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS

O álcool feniletílico, álcool fenético ou PEA (*phenylethyl alcohol*), apresenta fórmula molecular $C_8H_{10}O$, é um composto que ocorre naturalmente em diversos tipos de plantas e flores, sendo altamente aromático e com odor floral semelhante ao de pétalas de rosas (Figura 1). Este composto é encontrado em baixíssimas concentrações, mesmo em óleos essenciais, e este fato aumenta o grau de dificuldade na obtenção natural desse composto (Etschmann *et al*, 2002).

Formula: C₈H₁₀O
Peso molecular: 122
CAS: 60-12-8
FEMA-GRAS: 2858

Percepção olfativa:

No ar: 12-24 ng/L
Na água: 1000 µg/L (ortonasal)

Dados Físicos:

Aspecto:	Líquido transparente com um leve brilho
Ponto de ebulição:	219,8°C
Ponto de Fusão:	-27°C
Flash Point TCC:	102°C
Densidade (20°C):	1.0202
Índice de Refração (20°C):	1.5325
Solubilidade:	Em água 19g/L à 20°C, solúvel também em álcoois, ésteres, aldeídos, óleo mineral, entre outros solventes

Nomes adicionais: 2-fenil etil álcool
β-fenil etil álcool
Feniletil álcool
Benzil carbinol
β-hidroxi-etil benzeno
Francês: Alcool phenethylique
Alemão: Phenylethylalkohol
Inglês: Phenylethylalcohol
Espanhol: Alcohol feniletílico

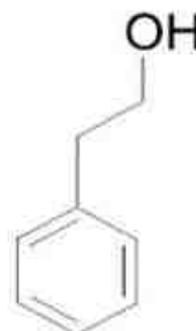


Figura 1. Fórmula estrutural e características básicas do Álcool Feniletílico.

Essa característica aromática é muito desejada pelas indústrias de perfumes e cosméticos, evidenciando o alto interesse desses setores por esse composto. O Álcool Feniletílico e também encontrado em pequenas proporções dentro da indústria de alimentos, principalmente quando produzido naturalmente, porém pela dificuldade desse processo esse composto tem sido, de maneira majoritária, produzido quimicamente (Clark 1990; Fabre, Blanc e Goma, 1998).

Segundo Etschmann *et al* (2002) e Tieman *et al* (2007) esse composto pode ser encontrado em diversos produtos que passaram por fermentação e, conseqüentemente, em produtos alimentícios tais como queijos, vinhos e pães. A indústria de alimentos tem usado

esse composto como aditivo, em especial para adicionar características de notas frutadas, para modificar as composições de aromas e contribuir para a melhoria das características organolépticas e aceitação dos produtos ao qual são adicionados (Beluci, Moraes, 2016).

As informações sobre a produção mundial e comércio global são muito escassas e com alto grau de dificuldade para obtenção. Segundo Clark (1990) e Solmogyi (1996), dados mostram que, na década de 1990, a produção anual foi estimada em torno de 7000 toneladas, sendo 6000 ton destinadas ao mercado de fragrâncias, 10 toneladas aplicadas como flavorizantes e as 990 ton restantes utilizadas como matéria-prima para a síntese de outros compostos. Outro dado disponível, de Huang, Lee e Chou (2000) sugere que o álcool feniletílico seja o segundo álcool em produção e comercialização no mundo, estando atrás apenas do álcool etílico.

Hua e Xu (2011) estimam que em 2010, de acordo com comunicação com a companhia chinesa Apple Flavor & Fragrances Group Co. Ltd (uma das empresas líderes mundiais do segmento), a produção do Álcool Feniletílico foi de cerca de 10 mil ton, sendo a maioria obtida por síntese química através do benzeno ou estireno e o valor médio para comercialização foi de U\$5,00/kg.

De acordo com Etschmann *et al* (2002), através de comunicação direta com Paul Kaders (Hamburgo, Alemanha) o valor comercial do álcool feniletílico naquela época era variável de acordo com as especificações, porém o produto quimicamente produzido estava disponível pela empresa por U\$3,50/kg, enquanto o mesmo produto rotulado como “natural” era comercializado por essa mesma empresa por um valor de U\$1.000,00/kg.

2.5.2. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DO ÁLCOOL FENILETÍLICO

Bem como a maioria dos compostos químicos, o álcool feniletílico possui diversas outras denominações usuais e oficiais. Os principais nomes são álcool feniletílico ou 2-feniletanol (2-PE) e phenylethyl alcohol (PEA), porém pode ser encontrado também como álcool 2-feniletílico, álcool β -feniletílico, benzil carbinol, β -hidroxi-etil-benzeno, bem como suas variações de acordo com outras línguas (Garavaglia, 2006).

O composto pode ser percebido pelo olfato humano em baixíssimas concentrações. Etschmann *et al* (2002) apresenta dados que dizem que o olfato humano consegue reconhecer o composto em concentrações de apenas 12 a 24 ngL^{-1} no ar e 1000 ngL^{-1} em solução aquosa, enquanto Vandamme e Soetaert (2002) em torno de 125ppm em soluções aquosas. Em ambos os casos, fica evidenciado a grande volatilidade e a necessidade de baixíssimas concentrações do composto.

A maior aplicação desse composto está, sem dúvidas, no mercado de fragrâncias por seu odor floral-adocicado, com notas de pétalas de rosas e mel. Sua grande estabilidade em meios alcalinos também o torna particularmente apropriado para a aplicação para sabonetes. Menores quantidades são utilizadas diretamente aos alimentos e também como matéria-prima para a produção de outros compostos, principalmente seus ésteres. Dentre os ésteres formados a partir do álcool feniletílico, tem um destaque especial o acetato de feniletila (GRAS 2857), composto com odor floral, muito utilizado também na indústria de aromas e fragrâncias (Bedoukian, 1986; Clark, 1990; Bauer, Garbe e Surburg, 2001).

Segundo estudos o álcool feniletílico já foi detectado em diversos alimentos como mel de tomilho (Piasenzotto, Gracco e Conte, 2003), no aroma de mel de cambará brasileiro (Moreira e De Maria, 2005), nas frações voláteis do azeite de oliva (Cajka *et al*, 2010; Kandylis *et al*, 2011), em concentrações altas em vinhos *cabernet sauvignon* nacional (Santos, 2006) e também no café torrado (Silwar, Kamperschröer e Tressl, 1987).

O composto é muito encontrado na natureza e, principalmente, em óleos essenciais de diversas flores como jacintos, jasmíns, narcisos e lírios, no entanto a concentração desse composto é geralmente tão baixa que sua extração mostra-se inviável. A única exceção são as rosas que, dependendo de muitas variáveis, podem conter até 60% de álcool feniletílico. Outros produtos que apresentam esse composto, também em baixa concentração, são os produtos fermentados como cacau, folhas de chá e café, pães, vinho, cidra, cerveja, queijos e molho de soja (Kieser *et al*, 1964; Lee e Richard, 1984; Rodopulo, Lyudnikova e Bezzubov, 1985; Clark, 1990; Jollivet *et al*, 1992; Gessenmeier e Schieberle, 1995; Hegarty *et al*, 1995).

2.5.3. PRODUÇÃO DO ÁLCOOL FENILETÍLICO

De um ponto de vista puramente químico, não existem diferenças entre as moléculas aromáticas sintetizadas quimicamente, encontradas na natureza e produzidas em laboratório, uma vez que são idênticas a nível molecular. Ainda assim, os consumidores mais críticos têm preterido moléculas artificiais em favor das moléculas naturais ou “consideradas naturais” como as produzidas por processos biotecnológicos (Etschmann *et al*, 2002).

Em relação aos métodos comerciais de produção desse composto, pouquíssimas informações são encontradas oficialmente das indústrias de produção de compostos

aromáticos, justamente porque sua metodologia é quase sempre obliterada, uma vez que seu “know-how” não necessariamente é protegido por patentes válidas, fazendo com que se valham, principalmente, da não divulgação das informações como métodos de proteção (Etschmann *et al*, 2002).

A indústria mostra-se muito empenhada no processo de obtenção do composto natural, mas devido à inviabilidade econômica da obtenção através da extração de rosas ou óleos essenciais, outras metodologias estão sendo aplicadas como recuperação desse composto por destilação de alguns resíduos (Savina, Kohler e Brunerie, 1999). Assim como, por ser um álcool superior, é um metabólito que pode ser obtido através de fermentação, portanto a produção biotecnológica do composto tem se tornado uma opção viável, porém com necessidade de aprimoramento (Etschmann *et al*, 2002).

2.5.3.1. SÍNTESE QUÍMICA

Segundo Krings e Berger (1998), cerca de 80% dos aromas e fragrâncias consumidas mundialmente, dentre eles o álcool feniletílico, são produzidos por síntese química. Existem poucas informações divulgadas oficialmente sobre a produção mundial e comercialização do álcool feniletílico no mundo, porém a estimativa mais recente obtida foi, segundo Hua e Xu (2011), de uma produção mundial média de 10 mil toneladas do composto no ano de 2010, sendo 90% desse total produzido quimicamente.

O composto pode ser sintetizado quimicamente a partir de diferentes compostos como tolueno, benzeno, estireno ou até mesmo o metilfenilacetato, porém esses compostos

apresentam características que os tornam danosos à saúde humana e ao meio ambiente (Serp, Von Stockar e Marison, 2003).

Dentro da síntese química, diversos processos podem ser aplicados para a produção do álcool feniletílico e, dentre eles, destacam-se a reação de Friedel-craft, a síntese de Grignard e a redução do óxido de estireno.

2.5.3.2. REAÇÃO DE FRIEDEL-CRAFT

É uma reação catalisada entre o óxido de etileno e o benzeno quando em presença de quantidades molares de cloreto de alumínio. O processo de adição do cloreto de alumínio gera uma hidrólise entre os compostos, liberando no meio o álcool feniletílico (Figura 2).

Esse processo apresenta diversas desvantagens, porém a alta corrosividade dos catalisadores utilizados destaca-se como a mais prejudicial, originando uma grande quantidade de resíduos, de difícil tratamento, a alta toxicidade ao meio ambiente ao qual é exposto e dificultando o processo de purificação do produto final (Kirm *et al*, 2005)

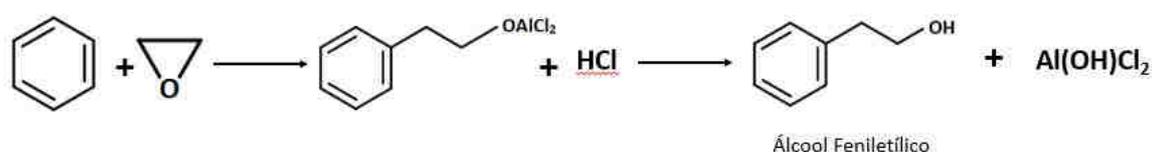


Figura 2. Reação de Friedel-Craft para a produção de Álcool Feniletílico.

2.5.3.3. SÍNTESE DE GRIGNARD

É uma reação que apresenta como composto principal o clorobenzeno, sendo convertido a cloreto de fenilmagnésio que, ao reagir com óxido de etileno, origina o cloreto de

feniletóximagnésio e, por fim, ao ser exposto a altas concentrações de ácido sulfúrico é decomposto formando o álcool feniletílico.

A grande quantidade de passos necessária para a descrição do processo de produção do composto evidencia o alto teor de resíduos que é gerado por esse processo, podendo contaminar o meio ambiente (Garavaglia, 2006).

2.5.3.4. REDUÇÃO DO ÓXIDO DE ESTIRENO

O óxido de estireno tem a propriedade de ser hidrogenado a baixas temperaturas na presença de níquel de Raney como catalisador e baixas concentrações de hidróxido de sódio. O álcool feniletílico, de fato, é produzido como um subproduto da formação do óxido de propileno, produto da reação entre o óxido de estireno e o hidróxido de sódio (Figura 3).

A maior dificuldade observada nesse processo produtivo se dá pelo fato de o álcool feniletílico ser um subproduto e, conseqüentemente, apresentar uma maior dificuldade no processo de purificação do composto (Jianfeng, Min e Zhenmei, 2009; Etschmann e Schrader, 2004).

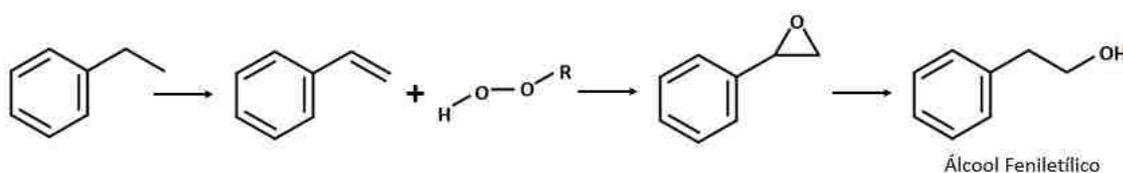


Figura 3. Reação de redução do óxido de estireno para a síntese de Álcool Feniletílico.

2.5.3.5. ROTAS BIOQUÍMICAS

De modo geral, diversos micro-organismos apresentam a capacidade para produzir o Álcool Feniletílico, em especial leveduras e fungos. No entanto a concentração desse composto produzidos pelo metabolismo natural dos micro-organismos (MOs) selecionados nos meios fermentados é considerada muito baixa (Fabre, Blanc e Goma, 1997; Janssens *et al*, 1998; Fabre, Blanc e Goma, 1998).

O composto pode ser obtido de acordo com diferentes rotas metabólicas tendo diferentes moléculas como substrato. Alguns processos fermentativos apresentam a produção do álcool feniletílico tendo a glicose como fonte primária de carbono, enquanto outros processos ocorrem pela adição de L-fenilalanina (L-PHE), seu precursor natural, no meio de cultura (Wittmann, Hans e Bluemke, 2002).

2.5.3.6. VIA DE EHRLICH

O processo de bioconversão de aminoácidos em diferentes álcoois superiores foi demonstrado no início do século XX através da chamada via de Ehrlich. Em 1907, Ehrlich demonstrou que vários álcoois precediam da degradação metabólica de diferentes aminoácidos mediante mecanismos de reações de desaminação, descarboxilação, redução ou desidrogenação. Durante o século seguinte, diversos estudos precedentes dessa descoberta foram realizados e comprovou-se a utilização de diferentes aminoácidos como precursores de diferentes álcoois obtidos por processos fermentativos como a leucina (LEU) sendo transformada em álcool isoamílico (odor característico de banana) e a valina sendo transformada em álcool isobutílico (Lepe e Leal, 1992).

A composição dos aminoácidos presentes no processo produtivo, bem como os micro-organismos utilizado e as condições de cultivo, dão condições para a produção de diferentes álcoois através da via de Ehrlich.

Na Figura 4, encontra-se as principais reações envolvidas no processo de produção de álcool fenilético através da L-fenilalanina (PHE) de forma natural por micro-organismos. A reação se inicia com uma reação de transaminação, tendo como subproduto a reação da amônia com o α -cetoglutarato e originando glutamato. A PHE transaminada dá origem ao fenilpiruvato, o qual é descarboxilado até fenilacetaldeído e, por fim, sofre uma redução originando o álcool fenilético (Etschmann, Sell e Schrader, 2003).

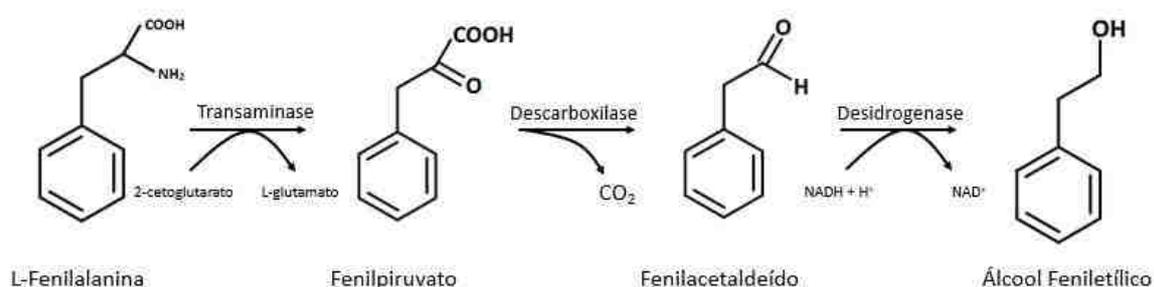


Figura 4. Via de Ehrlich para a produção de Álcool Fenilético por micro-organismos.

2.5.3.7. SÍNTESE DE NOVO

Mesmo com a atividade independente da via de Ehrlich, grandes quantidades de álcool fenilético podem ser obtidas a partir do metabolismo da glicose por diferentes micro-organismos, através da chamada síntese *de novo*. Muitos dos processos utilizados pelos micro-organismos para a produção do álcool fenilético são a partir da “via de chiquimato” ou “via do cinamato” (Serp, Von Stockar e Marison, 2003).

Dentre as vias possíveis de degradação de compostos intracelulares, a via de chiquimato se faz presente perante a presença da eritrose-4-fosfato, obtida através do ciclo das pentoses, e do fosfoenolpiruvato, obtido pela via glicolítica. Durante o processo esses compostos são condensados através da ação da enzima DAHP (3-dioxo-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase) dando origem ao chiquimato (ou ácido chiquímico) que, por sua vez, pode ser transformado em aminoácidos aromáticos (Etschmann *et al*, 2002; Garavaglia, 2006).

O ácido chiquímico é, então, submetido às reações catalisadas por diferentes enzimas. Primeiramente há a formação do corismato (através da ação da corismato sintase), subsequentemente convertido em prefanato (enzima corismato mutase), onde este passa por uma desidratação (enzima prefanato desidratase) originando o fenilpiruvato (Lehninger, Nelson e Cox, 1995).

A obtenção desse composto torna possível a obtenção do álcool feniletílico por duas vias: através da transaminação com glutamato (que atua como doador de grupos amino) ou seguindo a já mostrada via de Ehrlich, sendo descarboxilado até a formação do álcool feniletílico (Garavaglia, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo principal a utilização do bagaço de maçã, um resíduo agroindustrial rico em compostos terpênicos, para o desenvolvimento de um meio de cultivo para a produção de compostos de aroma com a utilização de micro-organismos selecionados de diferentes fontes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal do trabalho é a reutilização do bagaço de maçã, um resíduo agroindustrial em crescimento no mercado nacional, o bagaço de maçã, para o desenvolvimento de um meio de cultivo. O bagaço de maçã mostrou-se interessante para o processo uma vez que é rico em compostos terpênicos e açúcares que podem ser reaproveitados como fonte de energia e acelerar o processo produtivo de compostos de aroma num processo de fermentação submersa por fungos filamentosos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da concentração de farneseno em maçãs das variedades Fuji e Gala *in natura*;
- Avaliação da concentração farneseno em sucos de maçã natural e comerciais.
- Escolha da melhor variedade de maçã para o desenvolvimento do meio de cultura;
- Seleção de micro-organismos diretamente de maçãs, folhas, frutos e solo de plantação de maçã com potencial para a produção de compostos de aroma;
- Desenvolvimento de um meio de cultura contendo bagaço de maçã para a produção de compostos de aroma por fermentação submersa;
- Desenvolvimento de um processo fermentativo para a produção de compostos de aroma em meio fermentado contendo bagaço de maçã por fungos filamentosos;

- Análise por GC-FID e GC-MS dos compostos voláteis formados pelo processo fermentativo;

4. MATERIAL & MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos foram isolados de diferentes matrizes como solo, folhas e frutos de uma área produtora de frutos das variedades Gala e Fuji provenientes do estado de Santa Catarina, localizados nas cidades de Videira e Fraiburgo. Os micro-organismos selecionados para o processo produtivo foram Fungos filamentosos encontrados em diferentes partes do fruto e, também, do solo.

4.1.1. SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Os micro-organismos selecionados para o trabalho foram obtidos das matrizes supracitadas e também foram testados alguns micro-organismos da coleção do Laboratório de Bioaromas, do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, onde o trabalho foi desenvolvido.

Primeiramente, as diferentes partes dos frutos selecionados (polpa, casca, semente e talo) foram inoculadas sob condições estéreis em placas de Petri com meio YM (Yeast Malt) sólido (em g/L): 10 g de glicose; 5 g de peptona bacteriológica; 3 g de extrato de malte; 3 g de extrato de levedura e 20 g de ágar bacteriológico) adicionando 0,01 v/v (1%) de cloranfenicol 0,4%, para se inibir o crescimento de bactérias. As placas foram incubadas em estufa bacteriológicas a 30°C por 48-96h, tempo necessário para o desenvolvimento dos fungos.

Esse procedimento foi repetido até que as colônias estivessem totalmente isoladas nas placas de Petri. Os micro-organismos que apresentaram produção de compostos voláteis pela fermentação submersa foram estocados em geladeiras em tubos de ensaio inclinados com meio de cultura YM agarificado e também em freezer em microtubos de 1,5 mL com meio YM líquido com 30% de glicerol.

4.2. LEVANTAMENTO DO PERFIL VOLÁTIL DE MAÇÃ E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FARNESENO.

O seguinte projeto teve como prioridade estudar o uso de resíduos provenientes da produção do suco de maçã no Brasil e, portanto, torna-se essencial o levantamento dos perfis voláteis das maçãs Gala e Fuji, assim como de seu suco, de seu bagaço e das diferentes partes do fruto, bem como a otimização do processo de extração desses compostos voláteis.

Segundo os estudos de Janzanetti, Franco e Lanças (2000) com maçãs Fuji, o α -farneseno é o composto majoritário na porção volátil de frutos da maçã, que é o objeto principal de estudo do trabalho. Diante disso, o levantamento do perfil volátil foi com o fruto inteiro, com a casca, com o suco e com o bagaço, obtidos através da produção do suco de maçã feito em um processador de alimentos.

A análise foi feita através da técnica de SPME (solid phase micro-extraction) do *headspace* do frasco vedado com a utilização de uma fibra de revestimento misto PDMS-DVB (Supelco, Bellfonte, PA, USA). As análises foram feitas em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard modelo G7890A com Detector de ionização em chamas (GC-FID, em inglês Gas Chromatography Flame Ionization Detector) e também em cromatógrafo gasoso Hewlett-

Packard modelo G6890 Plus acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS, em inglês, Gas Chromatography Mass Spectrometer).

A fibra utilizada foi pré-condicionada para as análises no GC-FID por 30 minutos a 250°C para limpeza total da fibra antes das análises, seguido de uma exposição por um período de 30 minutos no *headspace* de cada amostra para adsorção dos compostos voláteis finalizando com a injeção das amostras (dessorção de 10 minutos a 250°C) nos equipamentos.

4.2.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE α -FARNESENO DE MAÇÃ

O planejamento experimental adotou como variáveis o tempo de estabilização dos compostos voláteis no vial sob agitação magnética, o tempo de exposição da fibra no *headspace* e a temperatura durante a estabilização e exposição. O trabalho foi realizado com 3 variáveis e, portanto, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR). Todos os pontos analisados são apresentados na Tabela 1

Tabela 1. Variáveis utilizadas no estudo primário das condições de extração dos compostos voláteis de maçã.

Variáveis	Código	-1,68	-1	0 (PC)	+1	+1,68
Tempo estabilização	X ₁	14	20	30 min	40	46
Tempo exposição	X ₂	14	20	30 min	40	46
Temperatura	X ₃	25	40	60°C	80	95

Os níveis avaliados foram determinados tendo como base o processo de avaliação de compostos voláteis em frutos e processos fermentativos para produção de compostos de aroma por trabalhos anteriores do laboratório de Bioaromas. Trabalhos anteriores (Pimentel, 2012; Molina, 2014) utilizaram como padrão os valores utilizados como ponto central dessa análise, sendo avaliados variações nos níveis analisados para melhor determinação dos resultados apresentados.

4.2.2. ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

A análise dos compostos foi realizada por GC-FID para a análise da concentração dos compostos e em GC-MS para a identificação dos mesmos. Em ambos os equipamentos foram utilizadas colunas capilares de sílica fundida HP-5MS (J&W Scientific, Folsom, Califórnia, USA) de 30m x 0,25mm de diâmetro interno e 0,5 μ m de espessura de fase estacionária foi utilizada para separar os componentes voláteis. Hélio foi utilizado com gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura do detector de ionização em chama foi mantida a 250°C. A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 40°C, permanecendo nesta por 2 minutos, subindo a uma taxa de 4°C/min até atingir 220°C onde permaneceu nesta temperatura por 10 minutos (método adaptado de Krings *et al*, 2006).

4.3. PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

O processo produtivo foi dividido basicamente em duas frentes, onde a primeira foi o desenvolvimento de um meio para a fermentação utilizando do bagaço de maçã como substrato e o segundo passo foi a inoculação dos micro-organismos para testes fermentativos

e avaliação do potencial desses micro-organismos (MOs) para produção de compostos aromáticos.

4.3.1. DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO

Primeiramente, foi necessária uma avaliação do potencial da utilização do bagaço de maçã diretamente para o processo fermentativo. Para a obtenção do bagaço de maçã e realização dos testes iniciais foram obtidas maçãs das variedades Gala e Fuji, trituradas em uma centrífuga para sucos (Philips Walita Juicer RI1861 700W) e o bagaço foi coletado para o prosseguimento das análises.

Durante o processo de propagação da biomassa fúngica posterior ao processo produtivo, os micro-organismos são inoculados em meio GAY (Glucose/Asparagin/Yeast Extract) composto por 30 g/L de glicose, 4,5 g/L de L-asparagina, 3 g/L de extrato de levedura, 1,5 g/L de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1 mL de solução traço.

Para o desenvolvimento do meio de cultivo, o mesmo foi suplementado com a mesma solução utilizada para o crescimento de biomassa, com a intenção de se otimizar o processo produtivo, o que surtiu o efeito esperado. Com isso o de cultivo foi composto por 20g de bagaço a cada 100mL de água suplementada com (em g/L): 1,5g de fosfato monobásico de Potássio (KH_2PO_4), 0,5g de sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 1 mL de solução traço ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; qsp 100 mL H_2O).

Após a adição do bagaço na água suplementada já autoclavada, o processo foi continuado com a homogeneização do bagaço com a utilização de um mixer de mão (Ford F-690 400W) seguido por esterilização por filtração (2 minutos de filtração em papel filtro Whatman n° 1 com porosidade de 1 µm e filtração em filtro sartorius 0,22 µm) antes da inoculação dos MOs.

4.3.2. PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo iniciou-se com a inoculação dos micro-organismos foram testados em um meio de cultura chamado de pré-inoculo. As culturas selecionadas foram primeiramente isoladas e crescidas em meio YM sólido como no processo de seleção, em seguida uma pequena porção de aproximadamente 1cm² do ágar foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio GAY.

Após ser transferido para o Erlenmeyer o ágar foi homogeneizado no meio de cultura com a utilização de ultraturrax (Ika, Wilmington, NC, USA) e o meio colocado em shaker climatizado a 30°C a 150rpm por 72 horas para o desenvolvimento do chamado pré-inoculo. Após transcorrido o período de 72 horas, a biomassa desenvolvida foi filtrada à vácuo, em condições estéreis em câmara de fluxo, em kitassato em filtro de papel Whatman n°1.

Após a filtração, 1g de biomassa foi inoculado em um vial âmbar de 100mL contendo 20mL do meio de cultura de maçã e re-introduzido em shaker agitado nas mesmas condições do crescimento (150rpm/30°C) por um período de 144h para o processo fermentativo, sendo analisado a cada 24h (0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h) por SPME em CG-FID e CG-MS (método adaptado de KRINGS *et al.*, 2006).

4.4. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PELA TÉCNICA DE SPME

O processo de análise dos compostos voláteis formados foi feito pela técnica conhecida como SPME (*Solid phase micro extraction*), onde foi possível adsorver os compostos de interesse através da exposição de uma fibra previamente escolhida no *headspace* da amostra onde encontram-se os compostos voláteis de interesse. Para a análise dos compostos voláteis de aroma foi escolhida uma fibra de revestimento PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) de 65µm de espessura de filme e com 10mm de comprimento (Supelco, Bellefonte, PA, EUA).

Para a realização das análises de *headspace* das amostras, a fibra foi previamente condicionada no CG a 250°C por 30 minutos para a limpeza completa da mesma. Posteriormente, a fibra foi exposta à amostra (que foi previamente colocada para estabilização por 30 min a 30°C sob agitação magnética) por um período de 30 minutos para adsorção dos compostos voláteis do *headspace* nos tempos selecionados. A dessorção dos compostos foi realizada diretamente nos equipamentos a 250°C por 10min para análise.

Os resultados estão representados unicamente como unidades de área (global) assim como é simbolizado pelos equipamentos utilizados para a análise dos compostos.

4.5. ANÁLISE DOS ESPECTROS CROMATOGRÁFICOS

As análises realizadas em ambos os equipamentos seguiram a mesma metodologia, tendo sua rampa de 40°C a 220°C como descrito no item 4.4. O injetor presente em ambos os

equipamentos é do tipo *split-splitless* no modo *splitless*, com dessorção por 10 minutos a 150°C.

A partir dos espectros obtidos, foi avaliada a produção de compostos voláteis através da comparação entre os diferentes tempos de retenção e também com uma comparação com uma amostra “branco” onde não é adicionado o micro-organismo no meio fermentativo para análise de possível formação de compostos espontaneamente no meio.

Durante a processo, foram avaliados os picos formados que não foram detectados na amostra em branco e em que ficaram evidenciadas a produção de compostos com a passagem do tempo. Os micro-organismos produtores foram selecionados para posterior otimização do processo produtivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados foram discutidos em 4 partes de acordo com os objetivos do trabalho. Eles foram subdivididos em: 1) Avaliação da presença do farneseno e otimização do processo de detecção de farneseno em maçãs gala e fuji, 2) Avaliação da presença do farneseno em diferentes amostras de suco de maçã *in natura* e comercial, 3) Desenvolvimento do meio de cultura e seleção de micro-organismos com potencial produção de compostos de aroma e 4) Otimização da produção de composto aromáticos por fermentação submersa (produção de álcool feniletílico).

- PARTE I -

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO FARNESENO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DETECÇÃO DE FARNESENO EM
MAÇÃS GALA E FUJI**

Como foi evidenciado durante a revisão bibliográfica, o farneseno é um sesquiterpeno pouco volátil comumente encontrado em óleos essenciais de algumas frutas como limão e laranja e também na camada cerosa de frutos como maçãs e peras. Sua presença está relacionada com a escaldadura superficial desses, caracterizado pelo escurecimento e aparecimento de manchas marrons nesses frutos (Reay, 1998).

Seguindo os dados evidenciados por esse e outros estudos, para o início do projeto foi necessária uma avaliação da presença do farneseno em maçãs Gala e Fuji. Em testes preliminares realizados no próprio laboratório, os resultados confirmaram a presença do composto tanto nos frutos quanto na casca, assim como estudos anteriores comprovavam (Murray, Huelin e Davenport, 1964; Huelin e Murray, 1966; Meigh e Filmer, 1969; Ingle e D'Souza, 1989; Watkins, Barden e Bramlage, 1993; Ju e Curry, 2000). O processo de análise de compostos voláteis, feito através da metodologia descrita anteriormente, foi baseado na análise por SPME proposta por Krings *et al* (2006) com pequenas modificações na rampa de temperatura para uma melhor separação do total de picos encontrados e, conseqüentemente, no tempo total de análise.

Mesmo com a comprovação da presença do composto nos frutos e na casca, foi proposto pelo trabalho uma análise mais meticulosa, visando avaliar os métodos de extração

de compostos voláteis. Nesse processo foram avaliados como principais características a temperatura de extração dos compostos (Temp), o tempo de estabilização dos compostos voláteis no headspace (t_{est}) e o tempo de exposição da fibra (t_{exp}) para melhor compreensão dos resultados.

O estudo dessas variáveis teve como objetivo determinar um método de extração mais confiável e preciso para a análise de compostos voláteis em frutos, principalmente frutos ricos em compostos voláteis de alto peso molecular, uma vez que esses compostos são invariavelmente mais volatilizados com o aumento da temperatura e poderíamos encontrar condições onde a análise se tornasse ainda mais precisa.

Diante dos fatos, foi elaborado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de acordo com a tabela 1, variando os valores de temperatura de extração (Temp) de 25-95°C e os tempos de estabilização (t_{est}) e tempo de exposição da fibra (t_{exp}) de 14-46 minutos. Todas as análises foram feitas para as maçãs gala a fuji com o intuito de se caracterizar a presença dos compostos voláteis, com ênfase no farneseno. Os resultados do processo de otimização foram analisados pelo software Statistica Statsoft® 10.

Esse primeiro estudo teve como objetivo destacar qual variedade seria a mais indicada para o prosseguimento com as análises e, conseqüentemente, para o desenvolvimento do meio de cultura utilizado nas fermentações futuras.

5.1. ESTUDO PRIMÁRIO DA EXTRAÇÃO DE α -FARNESENO NAS VARIEDADES FUJI E GALA.

Os resultados de α -farneseno apresentados estão em Unidades de Área (global), assim como é exprimido nos equipamentos utilizados para a análise. Os dados apresentados na Tabela 2 foram promissores, mostrando qual variedade possui maiores teores do composto e, também, uma grande variação entre as respostas apresentadas.

Tabela 2. Dados do estudo primário das condições de extração do α -farneseno

t_{test}	t_{exp}	Temp	[α -farn] maçã fuji	[α -farn] maçã gala	Área total voláteis maçã fuji	Área total voláteis maçã gala
-1	-1	-1	$7,72 \times 10^8$	$4,4 \times 10^7$	$4,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
1	-1	-1	$9,88 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$4,0 \times 10^9$	$1,46 \times 10^9$
-1	1	-1	$1,63 \times 10^9$	$1,10 \times 10^8$	$7,0 \times 10^9$	$1,66 \times 10^9$
1	1	-1	$1,18 \times 10^9$	$9,63 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$1,55 \times 10^9$
-1	-1	1	$1,94 \times 10^9$	$2,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^9$	$1,45 \times 10^9$
1	-1	1	$1,21 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,08 \times 10^{10}$
-1	1	1	$1,13 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{10}$	$1,48 \times 10^{10}$
1	1	1	$1,27 \times 10^{10}$	$7,6 \times 10^9$	$1,9 \times 10^{10}$	$1,46 \times 10^{10}$
-1,68	0	0	$4,84 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$5,51 \times 10^9$
1,68	0	0	$5,79 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$5,35 \times 10^9$
0	-1,68	0	$3,78 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$	$9,4 \times 10^9$	$3,91 \times 10^9$
0	1,68	0	$6,24 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$7,96 \times 10^9$
0	0	-1,68	$7,53 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$5,3 \times 10^9$	$1,12 \times 10^9$
0	0	1,68	$2,03 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^9$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,71 \times 10^{10}$
0	0	0	$8,63 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	$1,06 \times 10^{10}$
0	0	0	$5,67 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	$6,85 \times 10^9$
0	0	0	$6,53 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$7,26 \times 10^9$

Os dados apresentados foram tratados e foram realizadas as análises de variâncias (ANOVA) para ambos as variáveis de maçã analisadas, onde foi considerado um nível de significância de 10% ($\alpha=0,10$). Os dados foram subdivididos entre as diferentes variedades analisadas.

5.1.1. VARIEDADE GALA

Os dados apresentados foram submetidos a análise estatística pelo *software* Statsoft Statistica 10, onde primeiramente foram obtidos os coeficientes de regressão seguidos pela de análise de variância (ANOVA) e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Coeficientes de regressão linear da variedade gala.

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(7)	p
Média	$2,487943 \times 10^9$	654216811	3,80293	0,006689
(1)est (L)	$3,126606 \times 10^8$	307225753	1,01769	0,342703
est (Q)	$-3,279239 \times 10^8$	338146746	-0,96977	0,364469
(2)exp (L)	$9,993023 \times 10^8$	307225753	3,25266	0,014006
exp (Q)	$-3,718276 \times 10^8$	338146746	-1,09960	0,307877
(3)Temp (L)	$2,719972 \times 10^9$	307225753	8,85333	0,000047
Temp (Q)	$8,388616 \times 10^8$	338146746	2,48076	0,042163
1L por 2L	$-7,217524 \times 10^8$	401409791	-1,79804	0,115214
1L por 3L	$5,241600 \times 10^8$	401409791	1,30580	0,232895
2L por 3L	$1,340628 \times 10^9$	401409791	3,33980	0,012423

$R^2 = 0,9439$

Os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4 (destacados em veemelho) evidenciam uma significância dos dados obtidos em relação às variáveis tempo de exposição da fibra (t_{exp}) e temperatura (Temp) e também uma correlação entre essas duas variáveis. Sendo assim, foi obtida a superfície de resposta entre essas duas variáveis que pode ser observada na Figura 5.

Tabela 4. Tabela ANOVA completa da variedade gala.

	SS	df	MS	F	p
(1)T _{est} (L)	1,335049 x 10 ¹⁸	1	1,335049E+18	1,03569	0,342703
T _{est} (Q)	1,21227 x 10 ¹⁸	1	1,212276E+18	0,94045	0,364469
(2)T _{exp} (L)	1,363780 x 10 ¹⁹	1	1,363780E+19	10,57983	0,014006
T _{exp} (Q)	1,558614 x 10 ¹⁸	1	1,558614E+18	1,20913	0,307877
(3)Temp (L)	1,010368 x 10 ²⁰	1	1,010368E+20	78,38151	0,000047
Temp (Q)	7,932976 x 10 ¹⁸	1	7,932976E+18	6,15418	0,042163
1L por 2L	4,167412 x 10 ¹⁸	1	4,167412E+18	3,23296	0,115214
1L por 3L	2,197950 x 10 ¹⁸	1	2,197950E+18	1,70511	0,232895
2L por 3L	1,437826 x 10 ¹⁹	1	1,437826E+19	11,15425	0,012423
Erro	9,023270 x 10 ¹⁸	7	1,289039E+18		
TOTAL	1,609107E+20	16			

R² = 0,9439

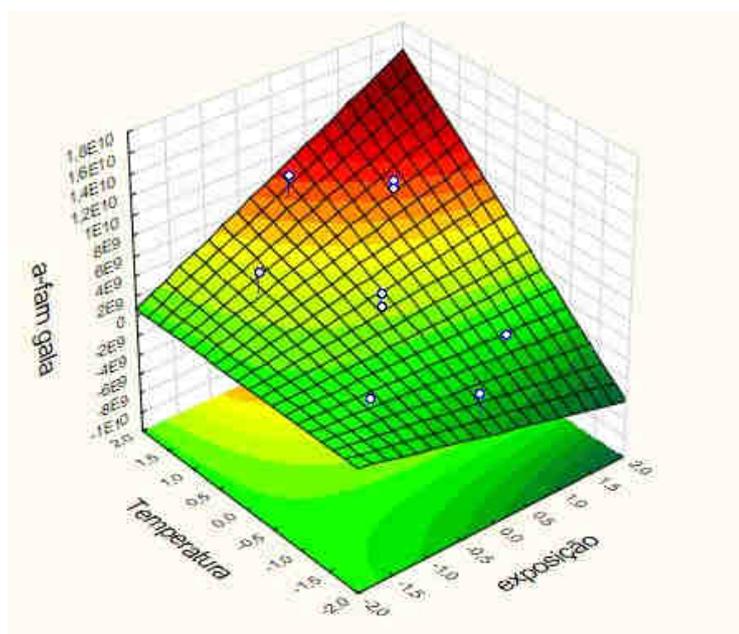


Figura 5. Superfície de resposta obtida através dos dados da concentração de alfa-farneseno em maçã gala.

A superfície de resposta obtida pelo processo evidencia uma maior concentração do composto de acordo com o aumento da temperatura, bem como um leve aumento com o aumento do tempo de exposição da fibra. Uma vez ressaltado essas informações, coube avaliar a outra variedade de maçã.

5.1.2. VARIEDADE FUJI

Assim como a primeira variedade apresentada, a variedade fuji foi sujeita a mesma avaliação de dados inicial e os resultados da tabela de coeficientes de regressão e ANOVA encontram-se nas tabelas 5 e 6 apresentadas a seguir.

Tabela 5. Coeficientes de regressão linear da variedade fuji.

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(7)	p
Média	$7,049852 \times 10^9$	$1,304985 \times 10^9$	5,40225	0,001006
(1)est (L)	$9,425204 \times 10^8$	$6,128322 \times 10^8$	1,53797	0,167942
est (Q)	$-9,379617 \times 10^8$	$6,745112 \times 10^8$	-1,39058	0,206959
(2)exp (L)	$1,105462 \times 10^9$	$6,128322 \times 10^8$	1,80386	0,114237
exp (Q)	$-1,046522 \times 10^9$	$6,745112 \times 10^8$	-1,55153	0,164714
(3)Temp (L)	$4,864029 \times 10^9$	$6,128322 \times 10^8$	7,93697	0,000096
Temp (Q)	$9,107281 \times 10^8$	$6,745112 \times 10^8$	1,35020	0,218975
1L por 2L	$-1,190739 \times 10^9$	$8,007038 \times 10^8$	-1,48712	0,180580
1L por 3L	$1,467708 \times 10^9$	$8,007038 \times 10^8$	1,83302	0,109459
2L por 3L	$1,110073 \times 10^9$	$8,007038 \times 10^8$	1,38637	0,208184

$R^2 = 0,9232$

Tabela 6. Tabela ANOVA completa dos dados da variedade fuji.

	SS	df	MS	F	p
(1)est (L)	1,213200 x 10 ¹⁹	1	1,213200 x 10 ¹⁹	2,36537	0,167942
est (Q)	9,918037 x 10 ¹⁸	1	9,918037 x 10 ¹⁸	1,93371	0,206959
(2)exp (L)	1,668932 x 10 ¹⁹	1	1,668932 x 10 ¹⁹	3,25391	0,114237
exp (Q)	1,234675 x 10 ¹⁹	1	1,234675 x 10 ¹⁹	2,40724	0,164714
(3)Temp (L)	3,23104 x 10 ²⁰	1	3,231045 x 10 ²⁰	62,99545	0,000096
Temp (Q)	9,350460 x 10 ¹⁸	1	9,350460 x 10 ¹⁸	1,82305	0,218975
1L por 2L	1,134287 x 10 ¹⁹	1	1,134287 x 10 ¹⁹	2,21151	0,180580
1L por 3L	1,723334 x 10 ¹⁹	1	1,723334 x 10 ¹⁹	3,35997	0,109459
2L por 3L	9,858095 x 10 ¹⁸	1	9,858095 x 10 ¹⁸	1,92203	0,208184
Erro	3,590309E+19	7	5,129013E+18		
TOTAL	4,677081E+20	16			

R² = 0,9232

Ao analisar os dados relativos a variedade fuji, foi possível constatar que houve uma significância dos dados somente para a variável temperatura (destacado na cor vermelha na tabela), diferentemente da variedade gala. Além disso, o valor encontrado de “p” para a variável tempo de exposição (destacado na cor laranja) ficou muito próximos de ser considerados significativo e, para termos de comparação com a outra variedade analisada, a superfície de resposta foi analisada com a presença dos parâmetros temperatura e tempo de exposição assim como anteriormente e está representada na Figura 6.

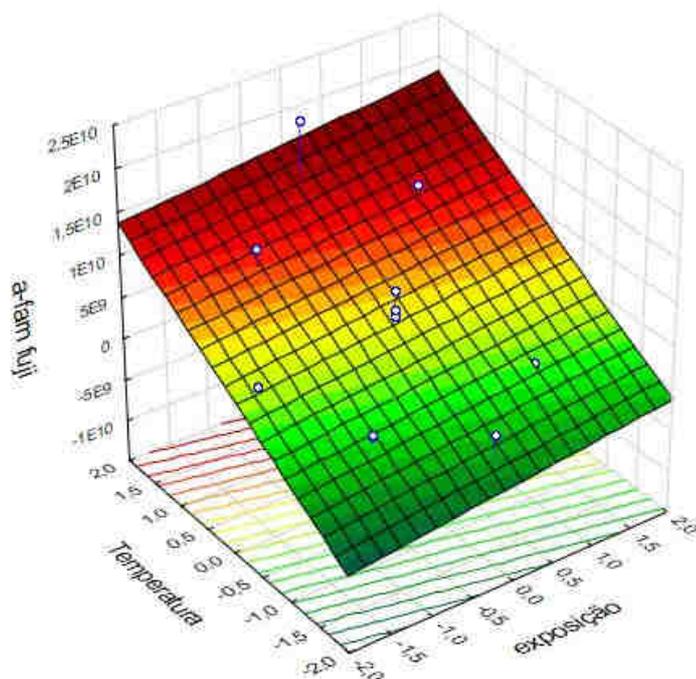


Figura 6. Superfície de resposta obtida através dos dados de alfa-farneseno em maçã fuji.

Assim como anteriormente, a superfície de resposta pressupõe um aumento gradual da concentração do composto de acordo com o aumento da temperatura.

5.1.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIEDADES GALA E FUJI

Após a obtenção dos dados, o trabalho prosseguiu com uma análise mais minuciosa dos dados, principalmente da correlação entre as diferentes variedades de maçã.

Foi possível notar que, para ambos os casos, as variáveis significativas apresentaram uma relação linear com os dados obtidos (com exceção somente da variável temperatura para a variedade de maçã gala) e esse dado é um tanto quanto relevante para a discussão. Uma vez que as projeções realizadas para a análise dos dados são lineares, torna-se impossível encontrar um ponto de inflexão e determinar um valor máximo para os dados e, sendo assim,

a superfície tende sempre a aumentar com o aumento dos valores das variáveis independentes.

Esse fato, aliado a dificuldade em se realizar as análises sob uma temperatura muito alta (próxima a 100°C) e a necessidade de obtenção de mais dados, fez com que fosse proposto um segundo estudo das condições de extração de α -farneseno, apresentando um intervalo menor entre os pontos mínimos e máximos das variáveis independentes para se obter dados mais precisos sobre o ensaio.

Devido à escassez de informações sobre processos de extração de compostos voláteis de frutos, com tais parâmetros e propósito, não foi possível a comparação dos resultados obtidos com a literatura sendo proposto, portanto, novos ensaios com pequenas alterações nos parâmetros avaliados com a finalidade de se obter mais resultados e, conseqüentemente, ter uma maior acuracidade dos resultados obtidos. Para isso, foi proposto uma diminuição entre os pontos de máxima e mínima para a variável temperatura para se avaliar melhor as diferenças obtidas entre os diferentes pontos avaliados.

5.2. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE α -FARNESENO NAS VARIEDADES GALA E FUJI

Dando prosseguimento com o trabalho, foi proposto um segundo estudo das condições de extração de α -farneseno, visando-se obter mais dados sobre o processo de extração e compreender melhor o processo de análise desse composto em maçãs.

Para o segundo estudo, foi proposto uma avaliação tendo como variáveis independentes somente o tempo de exposição (t_{exp}) e temperatura (temp), sendo a variável

tempo de estabilização (t_{est}) fixada no valor de 30 minutos para todas as análises, uma vez que essa variável não foi significativa para nenhuma das duas variedades de maçã avaliadas pelo estudo primário dentro das faixas avaliadas, sendo fixada no valor do ponto central utilizado nos estudos.

Os valores definidos para as variáveis independentes no segundo estudo foram moderadamente estreitados sendo a temperatura definida em um intervalo de 20°C a 80°C e o tempo de exposição de 15 minutos a 45 minutos, apresentados na Tabela 7. Essas modificações na temperatura se deram pela dificuldade na realização das análises a temperaturas muito altas (acima de 90°C), bem como a instabilidade dos compostos quando expostos a tal temperatura.

Tabela 7. Estudo das condições de extração dos compostos voláteis de maçã.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0 (PC)	+1	+1,41
Tempo Exposição	t_{exp}	15	20	30 min	40	45
Temperatura	temp	20	40	60° C	70	80

Os resultados obtidos no segundo estudo estão representados na Tabela 8. Os dados foram tratados e foram realizadas as análises de variâncias (ANOVA) para ambos as variáveis de maçã analisadas, onde foi considerado um nível de significância de 10% ($\alpha=0,10$). Novamente a avaliação dos resultados será apresentada de maneira separada entre as variedades.

O segundo estudo também analisou os parâmetros área total obtida, porcentagem da área total ocupada pelo α -farneseno e número de picos presentes.

Tabela 8. Resultados da avaliações das condições de extração de alfa-farneseno em maçã

texp	temp	[α -farn] maçã fuji	[α -farn] maçã gala	Área Total maçã fuji	Área Total maçã gala
-1,00000	-1,00000	$6,35 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$2,24 \times 10^9$	$2,41 \times 10^9$
1,00000	-1,00000	$8,88 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$	$2,27 \times 10^9$
-1,00000	1,00000	$1,54 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^9$	$1,96 \times 10^{10}$	$7,38 \times 10^9$
1,00000	1,00000	$1,62 \times 10^{10}$	$6,7 \times 10^9$	$1,92 \times 10^{10}$	$1,06 \times 10^{10}$
-1,41421	0,00000	$3,84 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$6,84 \times 10^9$	$5,63 \times 10^9$
1,41421	0,00000	$1,15 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,74 \times 10^9$	$3,07 \times 10^9$
0,00000	-1,41421	$5,03 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$1,51 \times 10^9$
0,00000	1,41421	$7,64 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$9,43 \times 10^9$	$9,18 \times 10^9$
0,00000	0,00000	$4,06 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$5,4 \times 10^9$	$4,71 \times 10^9$
0,00000	0,00000	$4,1 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$5,16 \times 10^9$	$4,57 \times 10^9$
0,00000	0,00000	$3,42 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$4,39 \times 10^9$	$6,11 \times 10^9$

5.2.1. VARIEDADE GALA

Os dados obtidos no segundo processo de avaliação das condições de extração de α -farneseno foram submetidos a análise estatística pelo software Statsoft Statistica 10, onde foram obtidos os coeficientes de regressão seguidos pela de análise de variância (ANOVA) e estão apresentados nas Tabelas 9 e 10 a seguir.

Tabela 9. Coeficientes de regressão linear do segundo estudo da variedade gala

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p
Média	1,727105 x 10⁹	462004429	3,738287	0,013455
(1)exp (L)	4,859874 x 10 ⁸	282918778	1,717763	0,146484
exp (Q)	1,847407 x 10 ⁸	336740700	0,548614	0,606867
(2)Temp (L)	2,245695 x 10⁹	282918778	7,937595	0,000511
Temp (Q)	7,219074 x 10⁸	336740700	2,143808	0,084907
1L por 2L	4,250678 x 10 ⁸	400107573	1,062384	0,336657

R² = 0,9232**Tabela 10.** ANOVA dos dados do segundo estudo das condições de extração para a variedade gala

	SS	df	MS	F	p
(1)exp (L)	1,88947 x 10 ¹⁸	1	1,889470 x 10 ¹⁸	2,95071	0,146484
exp (Q)	1,92729 x 10 ¹⁷	1	1,927291 x 10 ¹⁷	0,30098	0,606867
(2)Temp (L)	4,034515 x 10¹⁹	1	4,034515 x 10¹⁹	63,00541	0,000511
Temp (Q)	2,942966 x 10¹⁸	1	2,942966 x 10¹⁸	4,59591	0,084907
1L por 2L	7,227307 x 10 ¹⁷	1	7,227307 x 10 ¹⁷	1,12866	0,336657
Erro	3,201721E+18	5	6,403443E+17		
TOTAL	4,910674E+19	10			

R² = 0,9348

Os dados apresentados pelo segundo estudo das condições de extração realizados para a variedade gala apresentou como variável significativa somente a temperatura (destacado em vermelho), porém com a finalidade de comparação com as figuras anteriores a variável tempo de exposição foi também representada na superfície de resposta apresentada pela Figura 7.

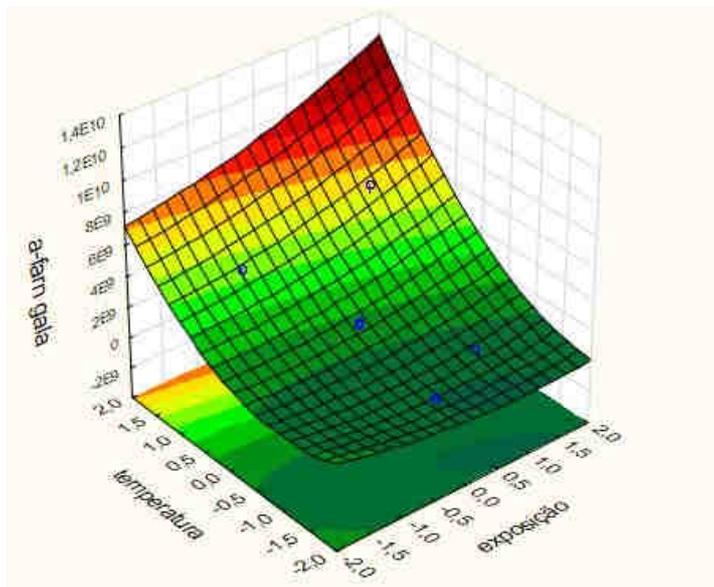


Figura 7. Superfície de resposta obtida pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã gala.

Os resultados obtidos para a maçã gala no segundo estudo apenas corroboram com o primeiro, ficando muito claro a dependência da temperatura no processo de extração do farneseno em maçãs. Uma análise mais minuciosa será apresentada na comparação entre as duas variedades.

5.2.2. VARIEDADE FUJI

Bem como a primeira variedade avaliada, a variedade fuji também foi sujeita ao mesmo tratamento de avaliação de dados e os resultados de coeficiente de regressão e ANOVA encontram-se nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Coeficientes de regressão linear do segundo estudo da variedade fuji.

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p
Média	1,727105 x 10 ⁹	462004429	3,738287	0,013455
(1)exp (L)	4,859874 x 10 ⁸	282918778	1,717763	0,146484
exp (Q)	1,847407 x 10 ⁸	336740700	0,548614	0,606867
(2)Temp (L)	2,245695 x 10 ⁹	282918778	7,937595	0,000511
Temp (Q)	7,219074 x 10 ⁸	336740700	2,143808	0,084907
1L por 2L	4,250678 x 10 ⁸	400107573	1,062384	0,336657

R² = 0,8653**Tabela 12.** ANOVA dos dados do segundo estudo das condições de extração para a variedade fuji.

	SS	df	MS	F	p
(1)exp (L)	1,889470 x 10 ¹⁸	1	1,889470 x 10 ¹⁸	2,95071	0,146484
exp (Q)	1,927291 x 10 ¹⁷	1	1,927291 x 10 ¹⁷	0,30098	0,606867
(2)Temp (L)	4,034515 x 10 ¹⁹	1	4,034515 x 10 ¹⁹	63,00541	0,000511
Temp (Q)	2,942966 x 10 ¹⁸	1	2,942966 x 10 ¹⁸	4,59591	0,084907
1L por 2L	7,227307 x 10 ¹⁷	1	7,227307 x 10 ¹⁷	1,12866	0,336657
Erro	3,201721E+18	5	6,403443E+17		
TOTAL	4,910674E+19	10			

R² = 0,8653

Neste segundo experimento realizado para o estudo das condições da extração revelou, assim como na outra variedade, que a variável significativa para o processo foi a temperatura, sendo mais uma vez representada a superfície de resposta entre as variáveis independentes analisadas pela Figura 8.

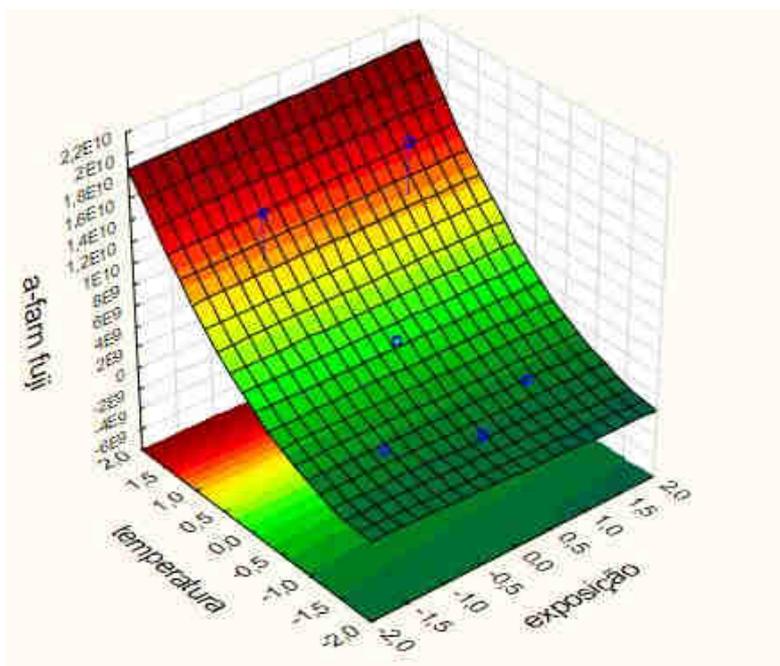


Figura 8. Superfície de resposta obtida pelo segundo estudo das condições de extração de alfa-farneseno em maçã fuji.

Os dados apresentados pelo segundo estudo corroboram em boa parte com os obtidos no primeiro, no entanto uma avaliação mais detalhada dos parâmetros obtidos pelo segundo estudo é feita pela comparação entre as duas variáveis.

5.2.3. COMPARAÇÃO DO SEGUNDO ESTUDO ENTRE AS VARIEDADES GALA E FUJI

Perante todos os dados analisados por ambos os estudos realizados, a determinação e padronização de características ótimas para o processo fica comprometida, uma vez que as superfícies de resposta demonstram padrões lineares que corroboram com o fato de que sempre que os parâmetros significativos tiverem seus valores aumentados os valores obtidos de α -farneseno será aumentado quase que proporcionalmente. Entretanto essa afirmação não pode ser tomada como verdadeira, já que os compostos serão, em algum momento, prejudicados pelo aumento dos valores dos parâmetros utilizados.

Diante desse fato, coube analisar outros parâmetros do processo, que não haviam sido realizados no primeiro estudo, para que fosse possível determinar quais os melhores valores a serem adotados para cada um dos parâmetros avaliados na continuidade do processo. Os parâmetros adotados para tal foram a área total de compostos voláteis obtida no processo, a representação percentual do α -farneseno nas amostras analisadas e o número de picos aparentes na análise cromatográfica.

As Tabelas 13 e 14 expõem os valores obtidos para os parâmetros secundários (que não haviam sido avaliados no primeiro estudo) adotados para a análise final dos dados e determinação das melhores condições do processo para as análises seguintes. Os dados foram analisados, prioritariamente, de acordo com a variação da temperatura, uma vez que no segundo estudo somente essa variável independente foi significativa para ambas variedades de maçã analisadas.

Tabela 13. Análise dos dados obtidos pelo segundo estudo das condições de extração de α -farneseno em maçã fuji.

Temperatura	Área α -farn	Nº picos	Área total	Porcentagem (%)
20°C	503.029.244	22	1.504.690.506	33,431%
40°C	486.343.036	35	2.659.112.249	18,290%
60°C	11.644.164.836	51	14.223.791.698	81,864%
70°C	16.217.009.814	70	19.649.150.562	82,534%
80°C	15.362.936.625	36	18.950.822.675	81,067%

Os dados retratados acima, como é possível observar, são referentes à variedade fuji e sobre alguns desses dados cabe uma análise antes da comparação com os dados referentes à

maçã gala. De Início é possível ressaltar dois dados importantes, que não necessitam de comparação com os dados de outra variedade para serem compreendidos, que são o número de picos e a porcentagem da área total ocupada pelo α -farneseno.

Alguns dos dados apresentados de porcentagem da área (ressaltados em vermelho) sinalizam que acima de 60°C a correspondência da área de α -farneseno em comparação com a área total se estabiliza em um valor próximo a 80% da área total obtida, não sendo essencial a utilização de temperatura acima desse valor para as análises futuras e, concomitantemente, pode-se avaliar o número de picos. Em uma análise primária é possível notar que a quantidade de picos identificados é gradualmente aumentada juntamente com a temperatura, fato esse que pode ser explicado por dois diferentes fenômenos.

A princípio pode-se concluir que esse aumento se deve ao fato de que compostos de maior massa molecular apresentam menor volatilidade; contudo, o fenômeno pode também estar associado à fragmentação de compostos com o aumento da temperatura.

Fica mais evidente quando se nota que o número de picos presentes nas amostras cai aproximadamente 50% indicando que o aumento da temperatura, ao mesmo tempo que elevou o teor de compostos de baixa volatilidade em sua composição, levou também a uma degradação dos compostos presentes no meio, concentrando alguns compostos no *headspace*.

Dando continuidade ao processo de análise, pode-se observar na Tabela 14 os dados dessa mesma análise referentes à variedade gala. Os dados representados são referentes aos mesmo parâmetros analisados para a variedade anterior.

Tabela 14. Análise dos dados obtidos pelo segundo estudo das condições de extração de α -farneseno em maçã gala.

Temperatura	Área α -farn	Nº picos	Área total	Porcentagem (%)
20°C	252.224.492	22	1.509.514.229	16,709%
40°C	1.201.178.952	30	2.406.375.015	49,917%
60°C	1.717.310.477	47	4.568.047.525	37,594%
70°C	4.846.964.452	62	7.377.934.165	65,695%
80°C	5.257.710.309	85	9.181.540.470	57,263%

Semelhantemente aos dados apresentados anteriormente, as análises de alguns dados foram feitas antes da comparação entre as duas variedades. Ainda que os dados apresentem nuances diferentes entre as variedades, as deliberações acerca dos dados analisados seguiram para conclusões análogas.

Vale frisar, sobretudo, a consolidação da porcentagem da área após a temperatura de 70°C (neste caso por volta de 60% da área total obtida, destacados em vermelho na Tabela 14), bem como constatado para a primeira variedade analisada. Da mesma forma, a variação da quantidade de picos identificada pelas análises, que expressaram um aumento gradativo com o aumento da temperatura é similar ao observado para a variedade fuji, reforçando as a análise anterior.

De acordo com o apresentado, ficou evidente que a utilização de condições extremas de temperatura tem o potencial de ser prejudicial para as análises, principalmente, por se tratar de compostos voláteis. Sendo assim, pode-se concluir que a temperatura adequada para as análises posteriores seria por volta de 60° e apresentando seu máximo por volta de 70°C.

Todavia a comparação entre as duas diferentes variedades em relação ao teor obtido de α -farneseno e de área total de compostos voláteis obtidos ainda havia de ser feita. Indispensável ressaltar que o confronto dos dados das duas variedades é de grande importância para o projeto, uma vez que essa através dessa análise se estabeleceu qual variedade de maçã seria utilizada para as etapas posteriores no projeto.

Ao examinar as diferentes concentrações obtidos para α -farneseno e área total de compostos voláteis é possível inferir que, visivelmente, os teores obtidos para a maçã da variedade fuji é superior aos obtidos para a variedade gala. Os teores apresentados pelas Tabelas anteriores mostram que, sob certas circunstâncias, a área de α -farneseno da variedade fuji atinge valores que variam entre 3 e 8 vezes superior aos apresentados pela variedade gala.

Diante dos fatos apresentados, foi necessário a análise de diferentes dados para que fosse cabível a determinação de variáveis justificáveis para as que o projeto fosse adiante com a variedade que melhor se adequa aos pré-requisitos do projeto (alto teor de compostos voláteis e, majoritariamente, o α -farneseno).

Como evidenciado anteriormente, os ajustes dos modelos analisados para ambas as variedades não foram quadráticos e, portanto, nos levaram a uma análise dos dados

complementares para chegarmos à melhor temperatura para ser utilizada com precisão de dados, sem perda de informações e maior confiabilidade. Os tempos de estabilização do *headspace* sob agitação magnética e o tempo de exposição da fibra para adsorção de compostos foram mantidos no ponto central, sendo definidos como 30 minutos.

De acordo com esse contexto, a temperatura considerada justificável para o prosseguimento do trabalho foi de 60°C, a partir da qual o seu aumento pode ter efeitos prejudiciais aos compostos e a representatividade do α -farneseno no *headspace* atingiu valores consistentes, principalmente para a variedade fuji, selecionada para as etapas posteriores do projeto.

5.3. CONCLUSÃO

Após a avaliação das variáveis e também do processo, ficou estabelecido para as análises posteriores os parâmetros tempo de estabilização (t_{est}) em 30 minutos, o tempo de exposição da fibra (t_{exp}) também em 30 minutos e a temperatura ($temp$) foi de 60°C.

- PARTE II-

AVALIAÇÃO DO TEOR DE FARNESENO EM SUCO DE MAÇÃ NATURAL E AMOSTRAS COMERCIAIS

Os estudos conduzidos anteriormente foram um importante passo de avaliação para o estudo das condições de extração do α -farneseno em variedades distintas de maçãs e, inclusive, o responsável pela determinação da variedade a ser selecionada para a continuidade dos procedimentos, visto que a variedade fuji apresentou valores consideravelmente maiores do composto quando em comparação com a variedade gala.

A determinação da presença e concentração de α -farneseno em amostras de maçã e a viabilidade da utilização desse fruto como matéria prima rica em compostos terpênicos para o desenvolvimento de um meio de cultura foi comprovado pelos estudos anteriores. Porém, diferentemente dos frutos in natura, os sucos e néctares encontrados no varejo geralmente passam por uma série de tratamentos antes de serem comercializados.

Majoritariamente os sucos e néctares passam não somente por mais passos para serem comercializados, quando comparados com os frutos in natura, mas também passam pela adição de diversos componentes e tratamentos que podem influenciar na composição natural de aroma e sabores e, na sua maioria, passam por complementação de aditivos alimentares para se obter um produto com características mais atrativas aos consumidores, principalmente relacionados ao aroma e sabor.

Devem ser levados em conta, da mesma forma, outros aspectos legais como padrões de qualidade e identidade que devem permanecer intactos ou minimamente alterados

durante o processo de fabrico destes produtos, uma vez que essas características são extremamente relevantes para os consumidores no momento da escolha do produto de sua preferência.

A Figura 9 ilustra parte dos produtos analisados quanto ao teor de α -farneseno na composição do *headspace* e, conseqüentemente, da preservação de suas características e sua identidade ao serem oferecidos aos consumidores.



Figura 9. Amostras comerciais de suco de maçã analisadas quanto ao teor de alfa-farneseno.

Para as análises que se seguiram foram analisadas cinco diferentes amostras para a comprovação da presença e identificação da sua identidade, já que o composto de interesse representa a maior parte do *headspace* da maçã e, conseqüentemente, deve estar presente em grande quantidade também de seus sucos e néctares para manutenção das características.

Os produtos utilizados nas análises foram a maçã fuji "*in natura*", o suco de maçã fuji produzido sem tratamentos no laboratório e três amostras comerciais de suco de maçã comercializados com a descrição de "suco integral de maçã" adquiridos em diferentes locais de varejo na cidade de Campinas/SP.

Dentre as amostras comerciais de suco de maçã, como apresentado na Figura 9, ainda que todas fossem comercializadas com a mesma finalidade como “integral”, era visível a diferença entre elas. Foi necessária uma avaliação mais minuciosa do rótulo e também das informações contidas nos sites das companhias para se evidenciar quais eram os procedimentos de produção e suas particularidades.

As diferenças encontradas entre as amostras foram: a amostra identificada como “Comercial 1” não indicava nenhum tratamento específico antes do envase da amostra; a amostra identificada como “Comercial 2” indicava no rótulo que o produto era filtrado antes do envase; e a amostra identificada como “Comercial 3” continha informações disponibilizadas em seu website de que o suco era filtrado e clarificado antes do envase.

Com base nas informações contidas nos rótulos e os diferentes tratamentos destacados acima era esperado uma diferença entre as amostras em relação a quantidade presente de compostos de aroma e, conseqüentemente, de α -farneseno de acordo com um maior número de tratamentos a qual cada amostra foi submetida antes do envase.

O objetivo das análises era evidenciar a presença do α -farneseno nas diferentes amostras de suco de maçã, bem como mostrar a diferença em sua concentração de acordo com os tratamentos recebidos durante o processo produtivos dos diferentes tipos de suco de maçã comercial.

5.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ

Todas as amostras foram preparadas para a análise no Laboratório de Bioaromas, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. A amostra de maçã denominada “*in natura*” foi preparada com 10g de maçã *in natura* colocada em 10mL de água destilada e triturada por 1 minuto com a utilização de um mixer de mão (Ford F-690 400W). A amostra denominada “suco natural” foi preparado com a utilização de uma centrifuga para sucos (Philips Walita Juicer modelo RI1865 700W).

O processo de análise foi padronizado para todas as amostras. Os parâmetros de extração e avaliação utilizados foram os definidos pelo capítulo anterior, sendo o tempo de estabilização do *headspace* 30 minutos, o tempo de exposição da fibra também de 30 minutos e temperatura de 60°C. Após o período de adsorção dos compostos, a amostra foi analisada em GC-MS para determinação da concentração e identificação dos compostos de acordo com o descrito no capítulo Material e Métodos.

Os resultados estão representados na Tabela 15, onde estão descritos a área de α -farneseno, a área total dos compostos identificados pelo equipamento e a concentração, em porcentagem, da área de α -farneseno em cada uma das amostras. Vale ressaltar que todos os resultados estão representados, mais uma vez, em unidades de área de acordo com o determinado pelo *software* do equipamento.

Tabela 15. Análise do teor de alfa-farneseno nas diferentes amostras analisadas

Amostra	Área α-farneseno	Área Total	% α-farneseno
Maçã <i>in natura</i>	1,409x10 ¹⁰	1,813x10 ¹⁰	77,71%
Suco natural	7,427x10 ⁹	1,040x10 ¹⁰	71,37%
Comercial 1	1,831x10 ⁹	3,709x10 ⁹	49,38%
Comercial 2	4,770x10 ⁸	2,405x10 ⁹	14,55%
Comercial 3	1,391x10 ⁸	1,568x10 ⁹	8,87%

Analisando-se os dados apresentados pela Tabela 15, fica evidente a diferença entre a área total dos compostos voláteis presentes no *headspace*, bem como a área de α -farneseno presente nas amostras. Contudo, o mais relevante é a diferença entre a representatividade do α -farneseno no perfil de voláteis identificados.

Ainda que previsível e esperado, é importante salientar que a diminuição na concentração de α -farneseno presente nas amostras é inversamente proporcional ao número de tratamento recebido antes do processo de envase. É possível observar esse mesmo fato para todos os parâmetros avaliados, ou seja, ao se confrontar os dados de α -farneseno e área total é substancial a diferença vista entre esses dois, sendo possível comprovar esse fato através da sua concentração.

A maçã *in natura* analisada teve, como esperado, os maiores teores de α -farneseno e área total seguido pelo suco natural produzido diretamente no laboratório e sem passar por nenhum tratamento antes da análise. As amostras comerciais analisadas também apresentaram um padrão previsível onde a amostra “comercial 1” teve concentrações abaixo dos dois primeiros, seguidos pelas amostras “comercial 2” e “comercial 3” que, visivelmente, tiveram seu perfil sensorial afetado pelos tratamentos recebidos antes do envase.

Pelos resultados obtidos no processo foi possível deliberar acerca de duas situações apresentadas anteriormente: A primeira delas foi a comparação entre as diferentes concentrações de α -farneseno, e a segunda foi discorrer sobre o método descrito anteriormente para análise de compostos voláteis, citado no capítulo anterior.

As análises realizadas para a maçã *in natura* resultaram em dados próximos aos obtidos na Parte I desta tese (estudos das condições de extração) e corroboram com a dedução de que os parâmetros estabelecidos para tais análises foram bem estabelecidos e apresentam repetibilidade e confiabilidade dos seus resultados. Levando-se em consideração a variabilidade da composição dos compostos voláteis de frutos *in natura* e que os experimentos foram realizados com um certo intervalo de tempo entre eles, os resultados apresentados de teor de α -farneseno foram repetitivo, o que demonstra a robustez do método de análise utilizado.

Os resultados apresentados entre a análise do fruto *in natura* e o seu suco sem processamento, produzido localmente para as análises, evidencia-se o fato de que o processo pode ser considerado robusto e repetitivo, apresentando dados confiáveis.

5.5. CONCLUSÃO

Com a análise dos dados obtidos pelo processo de avaliação da concentração de α -farneseno em diferentes amostras de maçã e suco de maçã foi possível, portanto, corroborou-se com o pré-estabelecido de que as variáveis utilizadas para o processo de extração foram

bem determinadas e também para a confirmação da presença em altas concentrações em maçãs fuji *in natura* e também em seu suco natural.

Essas características constituíam os pré-requisitos desejados para a utilização desse fruto como fonte de compostos (com ênfase em sesquiterpenos) para o desenvolvimento de um meio de cultura a avaliação da capacidade de produção de compostos aromáticos por fermentação.

- PARTE III-

DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA DE BAGAÇO DE MAÇÃ E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.

Durante as primeiras etapas desta tese, foi avaliada a presença de α -farneseno em duas diferentes variedades de maçã (fuji e gala) e determinados os melhores parâmetros para a realização dessas análises. Em seguida, foram confrontados os dados de diferentes amostras de sucos de maçã para a determinação da presença do composto e, de acordo com todos os dados, a variedade fuji foi selecionada para a continuidade do projeto de acordo com os valores de compostos identificados.

Nesta etapa da tese, foram realizados os experimentos de desenvolvimento do meio de cultura do bagaço de maçã fuji e selecionados os micro-organismos que apresentassem potencial para a produção de compostos aromáticos por fermentação.

5.6. MICRO-ORGANISMOS SELECIONADOS

Anteriormente ao desenvolvimento do meio de cultura e os processos fermentativos propriamente ditos, foram realizadas as etapas de seleção dos micro-organismos. Os micro-organismos (MOs) selecionados para o processo foram fungos filamentosos, provenientes de diferentes fontes ricas em compostos terpênicos.

A princípio, a teoria que fundamenta esse processo de seleção envolve optar por MOs isolados de fontes ricas em terpênicos, dado que a presença desses compostos pudesse ter um efeito adaptativo ao metabolismo dos mesmos e aumentar, portanto, a chance de o MO

selecionado utilizar como fonte de carbono o composto terpênicos e também de não ser inibido pela sua presença no meio de cultura desenvolvido.

Trabalhos anteriores (Berger, 1995; Berger, 1996; Maróstica Jr. e Pastore, 2006; Maróstica Jr. e Pastore, 2007; Pimentel, 2012; Molina, 2014; Paulino, 2014) demonstraram que o processo de seleção e crescimento de micro-organismos em meios contendo compostos terpênicos em sua composição melhoravam, e muito, o rendimento dos micro-organismos em processos de biotransformação de compostos dessa classe.

Para isso, o processo de seleção foi realizado de acordo com a metodologia, utilizando-se um meio de cultura com a adição de cloranfenicol para inibição do crescimento de bactérias e, conseqüentemente, facilitando o processo de seleção e isolamento dos fungos em placas de Petri.

Foram utilizados como fonte de micro-organismos amostras de maçã, solo, frutos e folhas provenientes de plantações de maçã obtidos nas cidades de Videira e Fraiburgo, localizadas no estado de Santa Catarina, durante uma visita às plantas de produção de suco de maçã da companhia Fischer e também de amostras de frutos adquiridos em supermercados da região de Barão Geraldo – Campinas – SP.

Na Tabela 16 estão representados os micro-organismos isolados que foram testados durante o processo. Foram isolados um total de 41 fungos filamentosos e todos foram testados no processo fermentativo para avaliação do potencial de produção de compostos de aroma.

Tabela 16. Micro-organismos isolados para testes.

TALO DE MAÇÃ	MAÇÃ GALA (SC)	MAÇÃ FUJI (SC)	FOLHA (SC)
TM3-F1	Gala casca P1	Fuji casca P1	FX_A
TM3-F2	Gala casca P2	Fuji casca P2	FX_B
TM3-F3	Gala casca P3	Fuji csc2 P1	
TM5-F1	Gala polpa P1	Fuji csc2 P2	SOLO (SC)
TM5-F2	Gala polpa P2	Fuji csc2 P3	AS_P1
	Gala Semente 1	Fuji polpa P1	AS_P2
TALO DA FOLHA		Fuji polpa P2	
TF3-F1	MAÇA GALA (BARÃO)	Fuji polpa P3	MAÇA FUJI (BARÃO)
TF3-F2	M3-F1	Fuji polpa P4	M5-F1
TF5-F1	M3-F2	Fuji Semente P1	M5-F1.2
TF5-F2	F3-F1	Fuji Semente P2	CSC_F1
TF5-F3	F3-F2	Fuji Semente P3	CSC2_F1
			CSC2_F2

Após isolados os micro-organismos, foi dada continuidade ao processo com o desenvolvimento do meio de cultura para o processo fermentativo e seleção de potenciais produtores.

5.7. DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTURA

O processo de desenvolvimento do meio de cultura iniciou-se com a escolha da melhor matéria-prima para dar prosseguimento com o processo. O suporte para a escolha dos frutos a serem utilizados para o processo de desenvolvimento do meio de cultura foram os valores obtidos de α -farneseno nas amostras testadas anteriormente, sendo selecionada a variedade fuji.

Para a elaboração do meio de cultura, inicialmente foi fabricado o suco de maçã em centrifuga de suco, similarmente à análise de α -farneseno de suco de maçã feito

anteriormente, e o bagaço foi coletado. Dessa primeira coleta do material foi colocado, em diferentes béqueres, 10g, 20g e 50g de bagaço juntamente com 100mL de água para se determinar qual a melhor concentração para que o meio não ficasse muito denso devido a presença da pectina e de fibras em altas concentrações na maçã e, conseqüentemente, em seu bagaço.

Os primeiros testes realizados demonstraram que a maior concentração testada apresentou viscosidade muito alta, dificultando o processo de filtração necessária para a continuidade do processo. Portanto, foi selecionado a concentração de 20g de bagaço para cada 100mL de água destilada.

Em seguida, bagaço foi triturado por um mixer de mão Ford, filtrado em papel Whatman n°1 e levado para esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos antes da inoculação dos MO selecionados. Entretanto, com o aumento da temperatura sua coloração foi visivelmente alterada, sendo constatada uma reação de escurecimento não enzimático (reação de maillard) entre os açúcares presentes, bem como uma alteração na composição de compostos voláteis através de análises em GC realizadas antes e depois do processo de esterilização térmica.

Foi necessário, portanto, redefinir os parâmetros utilizados para o processo de elaboração do meio, uma vez que o método de esterilização escolhido foi prejudicial para o meio de cultura. Seguindo essa linha de raciocínio, o início do processo foi mantido através do preparo do suco e coleta do bagaço, bem como a quantidade de bagaço para o processo.

Todavia, o processo de esterilização foi alterado para filtração onde seriam testadas diferentes configurações para a determinação do melhor processo.

A alternativa escolhida foi a filtração inicial em papel filtro Whatman nº 1 para a retirada inicial do bagaço ainda presente no meio, seguida foi proposto a filtração com filtro Sartorius de celulose/nitrato 0,45µm de diâmetro de poro como método de esterilização, ambos com o auxílio de uma bomba vácuo.

Após esse procedimento, foram feitas duas avaliações: primeiramente o meio de cultura foi colocado em shaker rotativo a 30°C e 150rpm para a avaliação do crescimento de agentes contaminantes durante as primeiras 72h e também uma análise dos compostos voláteis antes e depois do processo de filtração. A análise dos compostos voláteis assegurou que grande parte dos compostos continuavam presentes fazendo com que o processo de esterilização por filtração se torneasse viável para aplicação. Porém, após 24h o meio de cultura colocado no shaker apresentou crescimento de micro-organismos que puderam ser observados a olho nú, pela mudança da tonalidade do meio de cultura e, em seguida, comprovado por observação em microscopia óptica.

Diante dos fatos, foi proposto um novo processo com a alteração do diâmetro do poro utilizado para assegurar a esterilização do meio proposto. Com isso, o processo foi realizado novamente onde os passos foram os mesmos até o momento da filtração a vácuo com filtro de papel whatman nº1, porém com a alteração do filtro de celulose/nitrato 0,45µm de diâmetro de poro por um microfiltro de seringa Sartorius com diâmetro de poro de 0,22µm.

A avaliação subsequente foi a mesma realizada após o teste de esterilização com o filtro de 0,45 μ m, sendo testado para contaminações e quanto a composição de compostos voláteis presentes no meio.

As análises de composição de voláteis presentes demonstrou uma pequena perda na concentração total dos compostos, variando de 10% a 20%; no entanto, os valores podem ser considerados módicos em comparação com as perdas e alterações quando comparado com a esterilização por autoclave. No âmbito das análises microbiológicas, a metodologia utilizada foi a mesma, sendo os meios de cultura incubados em shaker rotativo a 150rpm-30°C e analisados por um período de 72h, com intervalos regulares de 24h (0h, 24h, 48h e 72h), onde não foi possível identificar o crescimento de nenhum micro-organismos, evidenciando a eficácia do método de esterilização ao se utilizar o processo de filtração com o filtro com diâmetro de poro de 0,22 μ m.

Com o processo de produção do meio de cultura determinado, os testes posteriores foram as avaliações do potencial de cada MO isolado para a produção de compostos aromáticos.

5.8. PROCESSO FERMENTATIVO

Todos os testes foram conduzidos em vials âmbar esterilizados em autoclave à 121°C com adição de 20mL do meio de cultura desenvolvido e 1g de biomassa fúngica filtrada em papel filtro Whatman n°1, colocados em shaker rotativo a 150 rpm e temperatura de 30°C

durante um período de 144-168h e analisados por SPME para a avaliação da produção de compostos de aroma a cada 24h em GC-FID e GC-MS.

As análises de produção de compostos de aromas foram realizadas por análise do headspace por SPME com intervalos regulares de 24h, sendo a amostra colocada sob agitador magnético por 30 min para estabilização do headspace, em seguida a fibra de SPME foi exposta no headspace da amostra por um período de 30 minutos para adsorção dos compostos e injetadas em GC-FID e GC-MS por dessorção de 10 minutos a uma temperatura de 250°C, sendo que ambos os equipamentos continham a mesma coluna e mesmas condições operacionais.

5.9. RESULTADOS OBTIDOS

Após avaliação dos 40 fungos selecionados diretamente das fontes supracitadas, apenas cinco dos micro-organismos foram capazes de realizar produção de compostos de aroma interessantes pelo meio de cultura desenvolvido para esse projeto. Os fungos que tiveram resultados positivos foram os fungos identificados como Fuji Casca 2 F1, Fuji Casca 2 P3 e FX_A.

Outro aspecto de relevância a ser ressaltado é que, em termos gerais, outros fungos apresentaram a capacidade de produção de compostos voláteis, porém não foram utilizados nas análises posteriores, uma vez que os compostos produzidos não apresentavam características aromáticas, outros produziram compostos em quantidades irrisórias e até mesmo compostos sem interesse para continuidade como, por exemplo, etanol.

É importante também destacar que durante cada processo fermentativo, uma amostra denominada “branco” foi avaliada juntamente com as amostras contendo apenas o meio de cultura desenvolvido, sem adição de MOs. Todos os resultados foram comparados com seus respectivos “brancos” para comprovação da produção do composto pelo MO selecionado e não proveniente do meio de cultura.

Com o foco mantido nos compostos aromáticos de interesse, os resultados apresentados a seguir se referem a produção dos compostos pelos fungos selecionados citados anteriormente.

5.9.1. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS PELO FUNGO “FX_A”

Após avaliação do processo fermentativo realizado com todos os micro-organismos supracitados apenas três foram considerados potenciais produtores de compostos aromáticos de interesse. Dentre esses três encontrava-se o fungo denominado “FX_A”, isolado diretamente de folhas de macieira obtidos das plantações visitadas nas cidades de Videira e Fraiburgo.

Durante todo o processo de análise dos compostos voláteis, primeiramente foram observados os resultados obtidos no GC-FID para observação de produção dos compostos, seguidos de avaliação da identificação dos compostos formados pelo GC-MS. Esse processo foi adotado uma vez que cada aparelho apresenta maior confiabilidade dos dados para determinados processos, aumentando a assertividade das suposições realizadas baseando-se em dados mais concretos.

O micro-organismo aqui analisado foi capaz de produzir dois compostos interessantes durante o processo: 1-Hexanol e β -cariofileno. A figura 10 contém as formulas estruturais de ambos compostos e a Figura 11 apresenta os picos de produção.

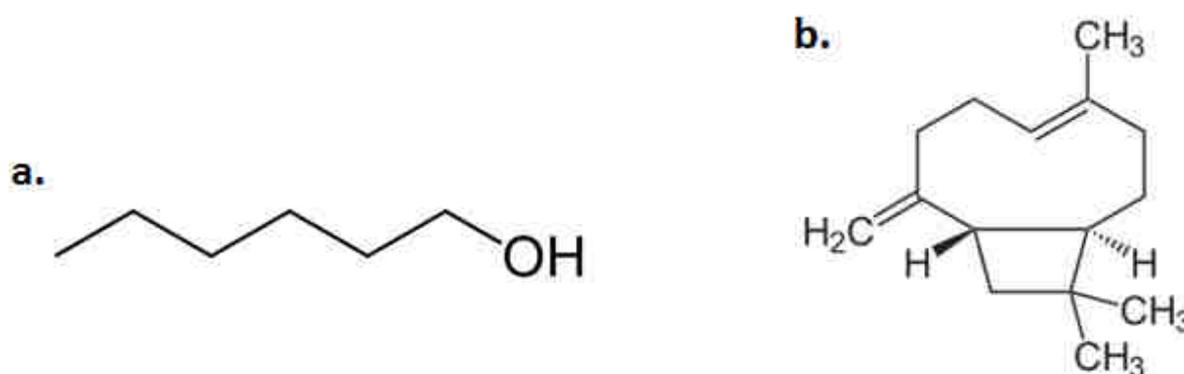


Figura 10. Fórmulas estruturais dos compostos (a) 1-hexanol e (b) beta-cariofileno.

O hexanol é um álcool muito comum utilizado como carreador pela indústria de aromas e fragrâncias por ser menos volátil, devido ao seu maior peso molecular, quando comparado a outros álcoois, como o etanol, por exemplo. Já o cariofileno, é um sesquiterpeno que apresenta um aroma amadeirado presente em óleos essenciais de cravo da índia e alecrim.

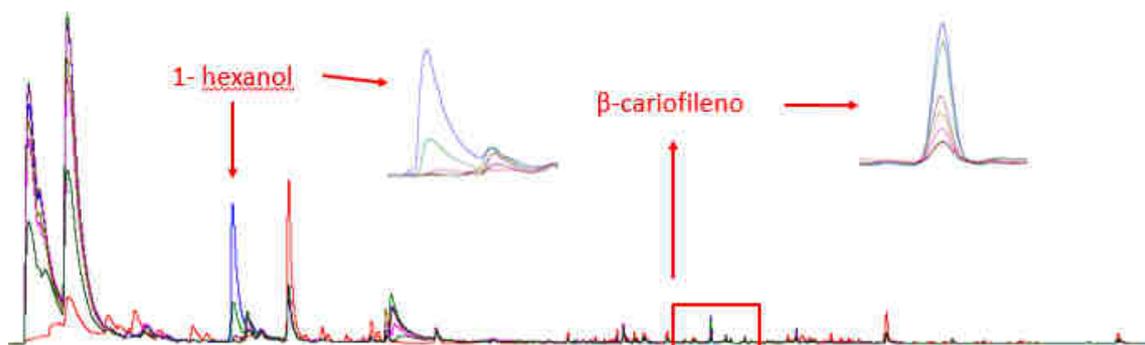


Figura 11. Cromatograma representando o processo produtivo de 1-hexanol e beta-cariofileno pelo fungo "FX_A".

De acordo com o observado na Tabela 17 e nas Figuras 12 e 13, mesmo que áreas totais de produção desses compostos sejam relativamente baixas, vale ressaltar que os compostos aromáticos apresentam a característica de, mesmo em baixíssimas concentrações em alimentos e bebidas, alterar de maneira significativa a percepção de seu aroma.

Os resultados estão representados pela área total dos compostos apresentada pelas áreas disponibilizadas de maneira automática pelos *softwares* utilizados para cada cromatógrafo. Os equipamentos utilizados para obtenção desses resultados foram um GC-FID (Flame ionization detector) e o GC-MS (Mass spectrometer).

Tabela 17. Resultados de produção dos compostos 1-hexanol e beta-cariofileno pelo fungo "FX_A".

Tempo	1-Hexanol		α e β – Cariofileno	
	FID (área / %área total)	MS (área / %área total)	FID (área / %área total)	MS (área / %área total)
0h	Nd	Nd	Nd	Nd
24h	Nd	Nd	5,2 (0,14%)	Nd
48h	Nd	Nd	8,7 (0,15%)	Nd
72h	Nd	Nd	12,2 (0,20%)	0,08x10 ⁷ (0,16%)
96h	19,6 (0,29%)	1,24x10 ⁷ (0,43%)	15,8 (0,23%)	0,13x10 ⁷ (0,24%)
120h	174,5 (2,47%)	1,35x10 ⁷ (2,47%)	29,4 (0,41%)	0,22x10 ⁷ (1,43%)
144h	622,8 (8,49%)	2,51x10 ⁷ (16,3%)	35,2 (0,47%)	0,21x10 ⁷ (1,41%)

Após uma avaliação mais criteriosa, é possível observar que o 1-hexanol foi produzido em quantidades mais notáveis, chegando a ocupar 8% do total do *headspace* da amostra, ao passo que a produção de β -cariofileno chegou a um percentual máximo de 0,5% do *headspace*.

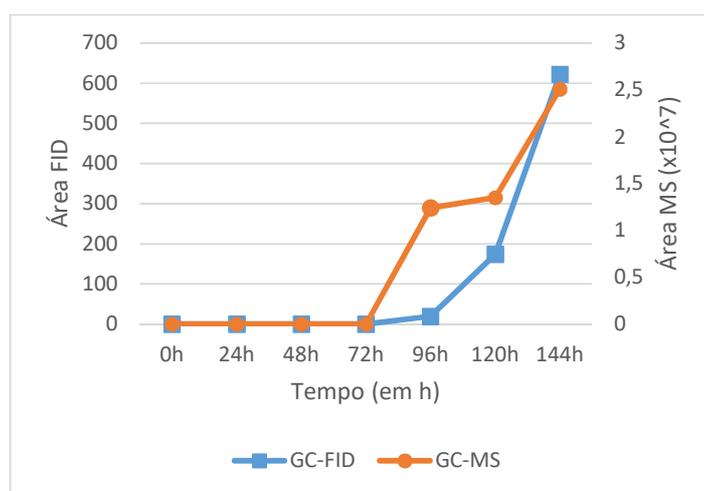


Figura 12. Produção de 1-hexanol pelo fungo "FX_A".

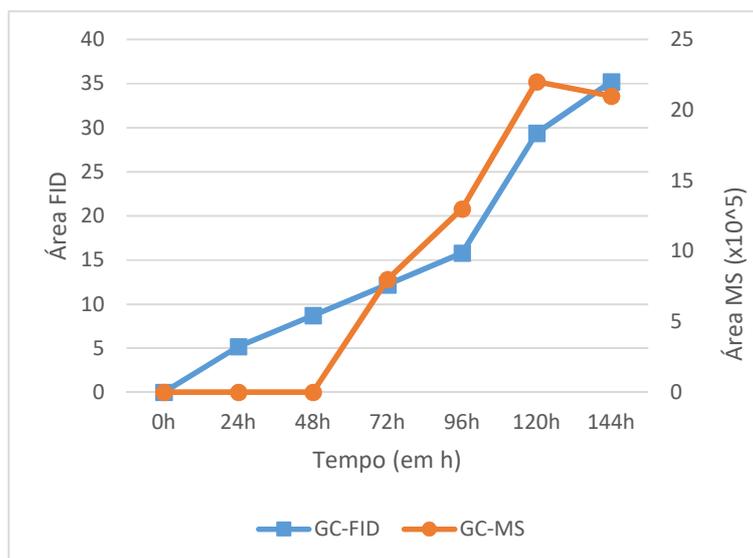


Figura 13. Produção de β -cariofileno pelo fungo "FX_A".

O fungo em questão, mesmo diante do seu comportamento, não foi selecionado para a continuidade do trabalho. Esse fato está associado a duas observações que se fazem necessárias para justificar essa escolha: primeiramente importante ressaltar a inconsistência do micro-organismo para a produção do composto 1-hexanol e, também, a baixa concentração do β -cariofileno.

Esses dois obstáculos apresentados pelo processo foram decisivos no momento de se desconsiderar o micro-organismos para análises posteriores. O micro-organismo foi capaz de produzir o composto cerca de 75% das vezes a que foi submetido ao processo produtivo, não mantendo a consistência da produção que, por si só, inviabilizaria o estabelecimento de um processo fermentativo de qualidade. Associado a isso, temos que observar que, através da curva apresentada, a produção de β -cariofileno encontra-se, aparentemente, próximo da estabilização da produção do composto e, por conta da baixa concentração do mesmo durante

o processo, torna-se mais difícil o processo de isolamento e concentração do composto através desse processo produtivo.

Portanto, o micro-organismo apresentou a característica de produção de compostos aromáticos, porém propõe-se novo estudo com o mesmo para a viabilização do estabelecimento de um processo consistente de produção.

5.10. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS PELOS FUNGOS “CSC2_F1” E “CSC2_P3”

O processo de produção e análise para esses fungos foram os mesmos utilizados por todos os processos fermentativos. Durante a análise dos resultados eles acabaram sendo colocados dentro de uma mesma categoria de resposta pelo fato de produzirem um mesmo composto: o álcool feniletílico (Figura 14).

Dentre as características apresentadas por esses dois micro-organismos é interessante ressaltar que, apesar de suas diferenças, eles apresentaram uma característica em comum muito importante, a sua fonte. Ainda que ambos apresentassem características fisiológicas diferentes, como a coloração de suas hifas (sendo um branco-amarelado e o outro preto-acinzentado), ambos foram provenientes da casca da maçã, porém não a mesma.

Esse dado relevante para a proposta do projeto, uma vez que a intenção inicial era selecionar micro-organismos de fontes ricas em farneseno pela maior potencialidade para a produção de compostos aromáticos que era uma das hipóteses relevantes do pré-projeto e, assim como discutido anteriormente, a casca da maçã (mais especificamente na cera localizada abaixo da casca) é a região de maior concentração de farneseno no fruto.

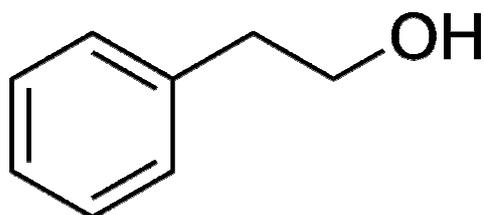


Figura 14. Fórmula estrutural do álcool feniletílico.

O álcool Feniletílico, também chamado de álcool fenetílico, 2-fenil-etanol ou phenylethyl alcohol (PEA, em inglês), é um álcool primário que ocorre amplamente na natureza. Esse álcool possui um odor levemente floral e pode ser facilmente encontrado em uma vasta gama de óleos essenciais de diversas plantas como rosa, cravo, pinheiros, flor de laranjeira, flor de bergamota, entre outros.

Os perfis de produção do composto pelos dois fungos selecionados estão representados no cromatograma da Figura 15.



Figura 15. Cromatograma para a produção do álcool feniletílico pelos fungos "CSC2_F1" e "CSC2_P3".

Os valores e o perfil de produção de PEA foram bem diferenciados para cada fungo analisado, como pode-se observar através da Tabela 18 e das Figuras 16 e 17, que os perfis de produção do composto foram diferentes para cada micro-organismo.

O fungo "CSC2_P3" apresentou uma produção mais acentuada no início do processo, sendo possível detectar a formação dos compostos dentro das primeiras 24 horas, porém a produção diminui de intensidade com o passar do tempo. Já o fungo "CSC2_F1" apresentou-se mais vagaroso no início do processo (até cerca de 96 horas), porém nas 72 horas subsequentes sua produção foi acentuada e, inclusive, alcançou valores que chegaram ao dobro da produção de álcool fenilético quando em comparação com o primeiro micro-organismo.

Tabela 18. Áreas correspondentes a produção do álcool fenilético analisados em GC-FID e GC-MS pelos fungos "CSC2_F1" e "CSC2_P3".

Tempo	Fungo "CSC2_F1"		Fungo "CSC2_P3"	
	GC-FID (área / %área total)	GC-MS	GC-FID (área / %área total)	GC-MS
0h	Nd	Nd	Nd	Nd
24h	Nd	0,45x10 ⁷ (0,71%)	48,7 (1,11%)	2,72x10 ⁶
48h	14,6 (0,30%)	0,64x10 ⁷ (0,88%)	125,1 (1,96%)	1,34x10 ⁷
72h	24,2 (0,41%)	1,12x10 ⁷ (1,47%)	191,5 (2,82%)	3,04x10 ⁷
96h	29,9 (0,44%)	1,78x10 ⁷ (1,49%)	235,0 (3,28%)	5,01x10 ⁷
120h	134,4 (4,42%)	3,42x10 ⁷ (4,42%)	283,6 (4,10%)	5,49x10 ⁷
144h	602,4 (7,84%)	9,28x10 ⁷ (12,91%)	295,6 (4,28%)	5,52x10 ⁷

Outra característica apresentada, que foi possível identificar através da análise do perfil apresentados nas Figuras 16 e 17, é a capacidade de produção do composto pelos dois fungos, uma vez que é possível notar que o fungo "CSC2_P3" aparentemente encontra-se perto do seu limite de produção, diferentemente do fungo "CSC_F1". O perfil da produção demonstrado pelas Figuras 16 e 17 demonstram que o segundo fungo, aparentemente, apresenta uma capacidade de produção do composto acima do primeiro micro-organismo.

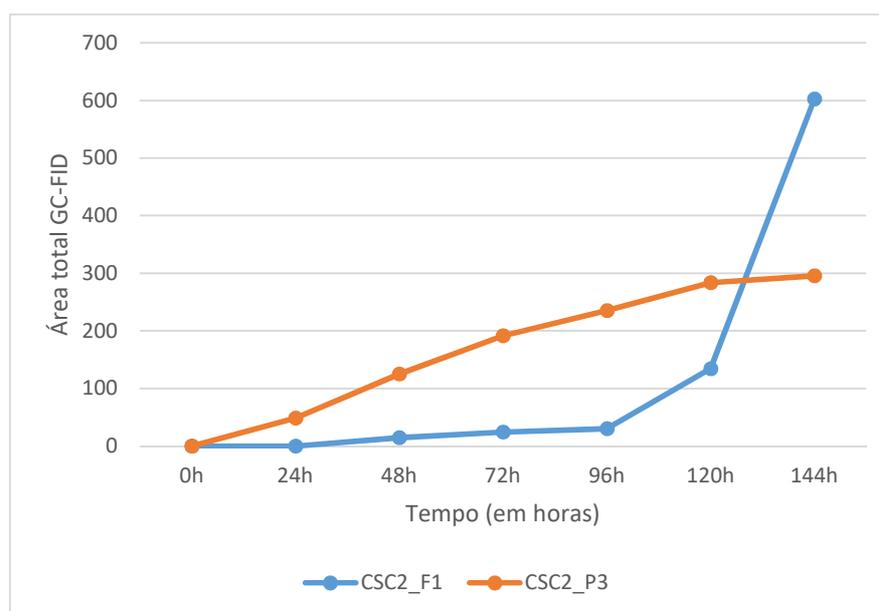


Figura 16. Produção do Álcool Fenilético pelos micro-organismos "CSC2_F1" e "CSC2_P3", resultados em unidades de área obtidos em GC-FID.

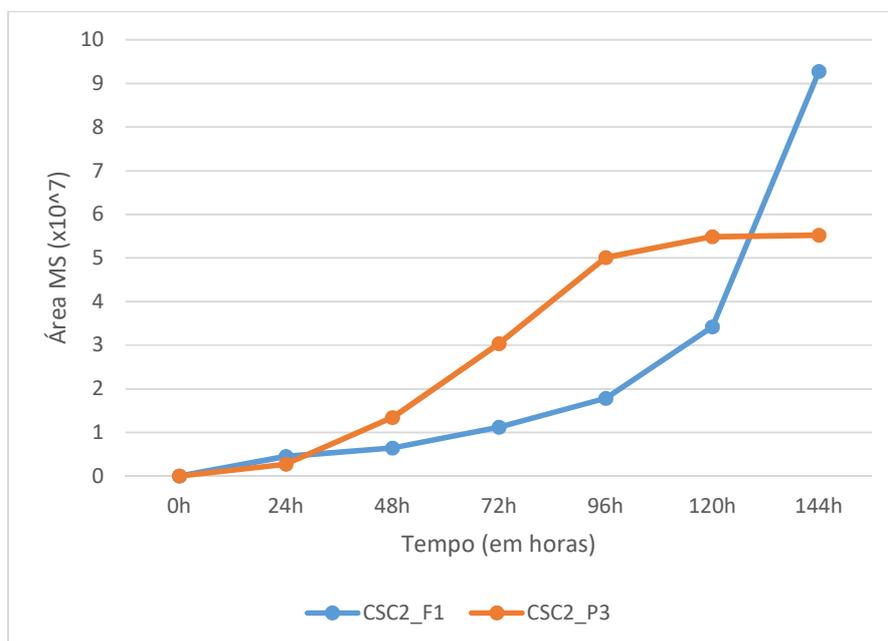


Figura 17. Produção do Álcool Fenilético pelos micro-organismos "CSC2_F1" e "CSC2_P3", resultados em unidades de área obtidos em GC-MS.

Em vista disso, o micro-organismo identificado como "CSC2_F1" foi selecionado para ser avaliado ante a outros parâmetros para uma caracterização, a fim de se avaliar a total capacidade do mesmo para a produção do composto. Contudo, para os processos subsequentes, ficou determinado que o tempo de processo deveria ser estendido até que o processo produtivo do composto pelo fungo atingisse uma condição de estabilidade.

5.11. CONCLUSÃO

Este capítulo tinha como intuito inicial avaliar todos os micro-organismos isolados utilizando-se do meio de cultura desenvolvido com a utilização do bagaço de maçã para a seleção de fungos com potencial para a produção de compostos aromáticos.

Após a avaliação, três micro-organismos foram selecionados como potenciais produtores, sendo eles o “FX_A”, “Fuji Casca 2 P3” e “Fuji Casca2 F1” e, destes, somente o último foi considerado totalmente viável para avaliação individual, caracterização e avaliação da capacidade de produção de seu composto alvo, o álcool feniletílico.

- PARTE IV-

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL FENILETÍLICO PELO FUNGO “FUJI CASCA 2 F1”

Durante o processo de seleção de micro-organismos com potencial para produção de compostos de aromas, foram selecionados três com potencial. O fungo “FX_A” teve a capacidade de produzir os compostos 1-hexanol e β -cariofileno enquanto os fungos “CSC2_P3” e “CSC2_F1” se mostraram capazes de produzir o álcool feniletílico (PEA, sigla em inglês).

Analisando os resultados preliminares de produção de compostos aromáticos, foi selecionado o fungo denominado “CSC2_F1” para o processo de caracterização da produção de PEA, uma vez que sua capacidade para a produção do composto mostrou-se superior ao fungo denominado “CSC2_P3”.

Este último, aparentemente, já se encontrava em uma fase estacionária da produção do composto enquanto o primeiro, além de chegar a valores que já eram o dobro do encontrado no primeiro, ainda se encontrava em fase exponencial de produção, tornando-se o alvo dos estudos que se seguiram, uma vez que acreditava-se que seu potencial de produção era ainda maior do que o apresentado até o momento.

Diante dos dados apresentados, foi definido a utilização do fungo "CSC2_F1" para o prosseguimento das análises e foram realizados os seguintes experimentos: análise da composição centesimal do meio de cultura desenvolvido, avaliação das características físico-químicas do meio de cultura, análise do crescimento de biomassa, análise do consumo do açúcar presente no meio e análise da produção de PEA.

5.12. RESULTADOS OBTIDOS

Salientando neste momento que o tempo do processo fermentativo foi estendido para 216 horas para uma avaliação mais precisa da produção do composto, uma vez que nas análises realizadas anteriormente com um período de 144 horas o processo não aparentava ter atingido seu ponto máximo.

A prioridade das análises seria a mesma do apresentado anteriormente, uma vez que era interessante a análise da composição centesimal do meio de cultivo para se determinar se seria necessário a suplementação do mesmo, para em seguida, fazer as suplementações necessárias, uma análise do crescimento da biomassa fúngica acompanhada da avaliação do perfil de consumo dos açúcares presentes no meio (provenientes do próprio bagaço de maçã) e, por fim, uma nova fermentação para a avaliação da produção de PEA pelo fungo selecionado.

As pressuposições que envolvem essas análises são simples e se baseiam no fato de os fungos produzem os compostos aromáticos como metabólitos secundários, geralmente com a função de defesa. Diante disso, era importante avaliar as necessidades nutricionais do micro-organismo selecionado juntamente com a disponibilidade de açúcar e a “ativação” do metabolismo secundário do fungo para se otimizar o processo de produção do composto aromático.

As análises de composição centesimal foram realizadas pelo Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos (CCQA), localizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) localizado na cidade de Campinas – SP.

Analisando-se os resultados de composição centesimal para o bagaço de maçã e também para o meio de cultura desenvolvido (Tabela 19) é possível notar uma concentração notável ainda de carboidratos provenientes da alta concentração de glicose, frutose, sacarose e também da pectina que se encontra no bagaço de maçã, bem como uma baixa presença dos outros componentes, porém a não disponibilidade de alguns componentes torna-se até certo ponto interessante para a ativação do metabolismo secundário.

Tabela 19. Composição centesimal do bagaço de maçã e do meio de cultura desenvolvido utilizando o mesmo bagaço.

Determinação	Bagaço de maçã	Meio de cultura
Umidade (g/100mL ou g/100g)	77,75	97,67
Cinzas (g/100mL ou g/100g)	0,50	0,21
Lipídeos Totais (g/100mL ou g/100g)	0,34	ND
Proteínas (Nx5,75) (g/100mL ou g/100g)	0,63	0,06
Carboidratos Totais (g/100mL ou g/100g)	20,78	2,06
Calorias (kcal/100mL ou g/100g)	89	8

Após uma breve avaliação da composição centesimal do meio, não foi detectada a necessidade da suplementação do meio com macronutrientes. Contudo, houve pequenos ajustes nas quantidades dos micro minerais (KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e solução traço) utilizados. As modificações realizadas foram aumentos da quantidade de minerais adicionada meramente para avaliação da melhora ou não do crescimento e produção do composto, ressaltando que essas modificações já estavam programadas para as análises futuras.

O aumento de 10, 20% e 50% do valor de micro minerais, citados anteriormente, foram testados para o processo, porém as análises não apresentaram nenhuma melhora visível no processo como um todo, sendo o processo mantido nos valores mais baixos de micro minerais adicionados até mesmo para diminuição dos custos operacionais.

Em seguida, foram realizadas análises para a determinação dos açúcares presentes no meio, bem como o perfil de consumo dos mesmo pelo micro-organismo avaliado em função do tempo de processo (Tabela 20). Concomitantemente, foi realizada a avaliação do crescimento da biomassa fúngica presente no processo pela metodologia de peso seco para um melhor entendimento do processo como um todo.

Tabela 20. Avaliação da concentração dos açúcares presentes durante a fermentação do meio com o fungo "CSC2_F1".

Tempo (horas)	Glicose (mg/mL)	Frutose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)
0	289,51	789,449	0
24	34,581	227,625	20,761
48	29,689	87,399	16,002
72	22,097	64,528	11,341
96	17,422	66,937	10,403
120	13,5	6,0448	1,312
144	5,401	0,988	1,54

A Tabela 20, apresentou os resultados de composição dos açúcares do meio de cultura, deixando evidenciado a presença da frutose, glicose e sacarose como principais açúcares, como era esperado desde o início pela presença desses mesmos em frutas *in natura*. Já as Figuras 18 e 19 mostram, de maneira independente, o perfil de consumo desses açúcares ao longo do tempo pelo fungo e também o crescimento da biomassa fúngica apresentada pelo micro-organismo pelo tempo.

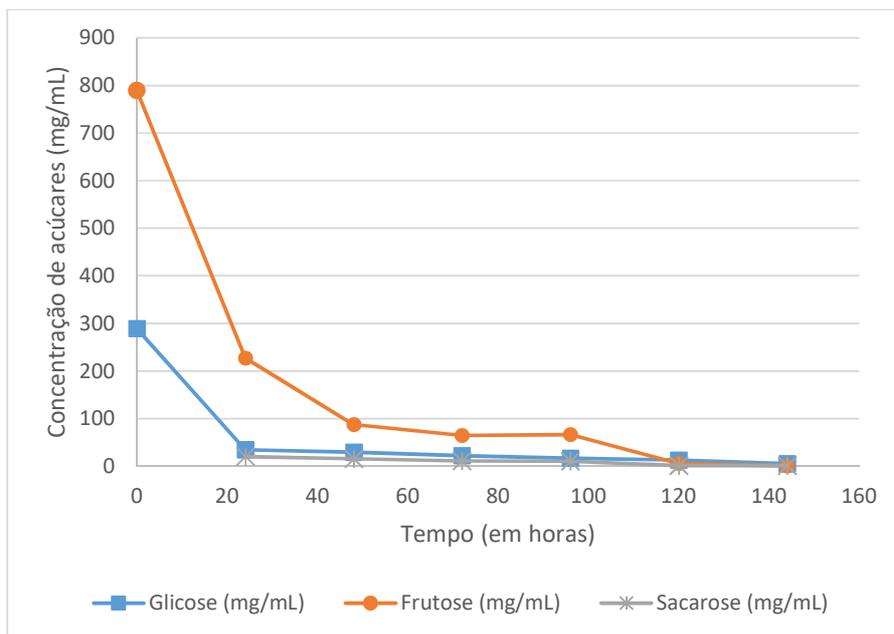


Figura 18. Consumo dos açúcares pelo fungo "CSC2_F1" durante o processo produtivo.

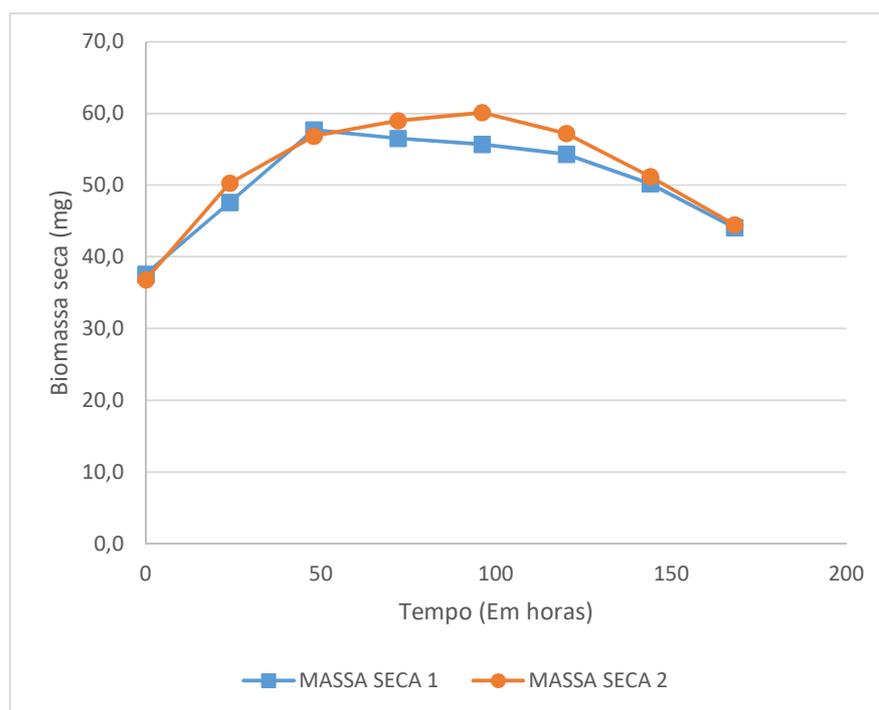


Figura 19. Crescimento da biomassa seca do fungo "CSC2_F1" durante o processo produtivo.

Confrontando-se os dados de consumo dos açúcares e o crescimento da biomassa apresentados, é possível notar uma tendência já esperada de consumo rápido dos açúcares, principalmente da frutose e glicose prontamente disponíveis, como observado. Nota-se que, durante a fase de consumo, há o crescimento da biomassa fúngica presente e, em seguida, com o quase esgotamento dos açúcares presentes, a biomassa tende a se estabilizar e inicia-se o processo de diminuição da biomassa disponível após o esgotamento dos açúcares disponíveis no meio de cultura.

Coube avaliar se houve a produção do composto de aroma desejado e correlacionar os dados obtidos até o momento e a produção do composto. Uma nova fermentação foi realizada repetindo-se as condições observadas anteriormente. A Tabela 21 apresenta os dados da produção de álcool feniletílico pelo processo através da área total representada pelo composto no GC-FID e os dados estão representados na Figura 20.

Tabela 21. Produção de Álcool Feniletílico pelo fungo "CSC2_F1".

Tempo	Área total (FID)
0h	0
24h	0
48h	0
72h	0
96h	0
120h	154,85
144h	308,4
168h	1359,0
192h	1614,1
216h	1730,5

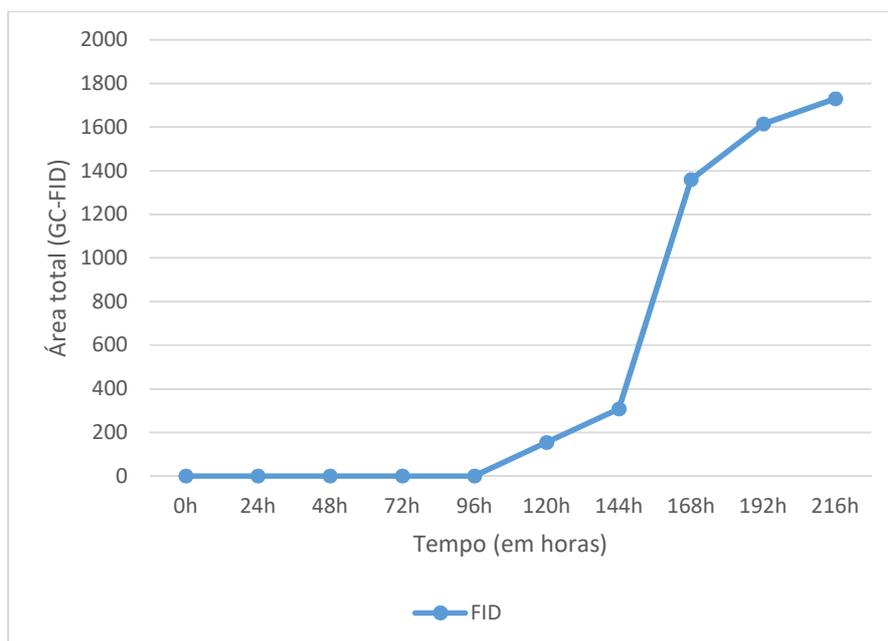


Figura 20. Produção de álcool feniletílico pelo fungo "CSC2_F1".

Os dados apresentados demonstram o perfil de produção do álcool feniletílico pelo fungo "CSC2_F1" nas condições citadas anteriormente. O processo anterior havia sido interrompido no tempo de 144h (padrão para as análises iniciais), sendo necessária uma análise mais criteriosa e por um período maior, com isso, foi possível obter dados de produção do composto por um período de 216h (Figura 21) e sendo possível constatar que, nestas condições, o perfil de produção sugere que o processo produtivo deve estar próximo de seu limite.

Interessante ressaltar a correlação entre o perfil produtivo do composto com o perfil de consumo dos açúcares presentes no meio. É importante frisar que, apesar de o composto ser produzido diretamente pelo ciclo de consumo de glicose, como citado na revisão bibliográfica, a sua produção foi intensificada a partir do momento final do consumo dos

açúcares, indicando uma possível correlação com o metabolismo secundário do fungo em questão, podendo ou não estar relacionado com a presença do farneseno no meio.

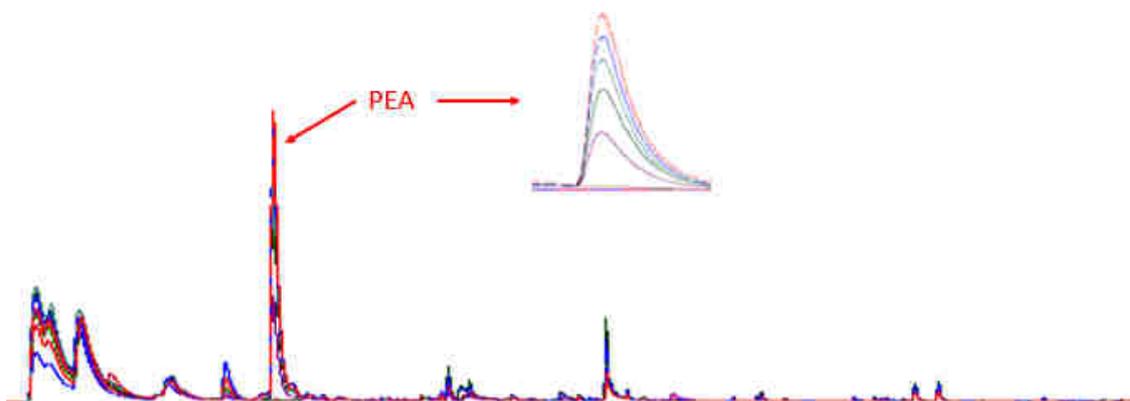


Figura 21. Cromatograma da produção do álcool feniletílico pelo fungo "CSC2_F1" até 216h.

Salienta-se que os valores de produção obtidos são muito maiores que os obtidos anteriormente, porém os dados anteriores retratavam um processo com apenas 144h enquanto os novos dados foram obtidos em um processo com 216h. Era visível, durante a apresentação dos dados da primeira fermentação, de que o processo de produção do álcool feniletílico ainda não havia atingido todo o seu potencial, ao mesmo tempo que no segundo processo é possível observar que a produção do composto foi aumentada de maneira notável e que, aparentemente, encontra-se próximo de atingir a fase estacionária de produção.

No entanto, é importante frisar que o processo de produção do álcool feniletílico pelo micro-organismos selecionado é viável, repetitivo e em altas concentrações, validando a hipótese inicial de capacidade produtiva de compostos de aroma através do meio de cultivo produzido com a utilização de bagaço de maçã.

Por fim, mas não menos importante, foi proposta uma caracterização rápida do processo produtivo pelo fungo selecionado em quatro meios com limitações de substrato com a presença de diferentes fontes de carbono presentes para se avaliar a real capacidade de produção do composto em diferentes condições.

Para tal caracterização foi proposta uma análise com os seguintes meios: meio mineral puro (MM), meio mineral com adição de glicose 2% (MMG), meio mineral com farneseno 0,1% (MMF) e o meio mineral com glicose e farneseno (MMGF). Os valores propostos de glicose e farneseno foram baseados na composição do meio de cultura desenvolvido, simulando de maneira muito simples o processo produtivo através de fontes de carbono limitadas e avaliando-se o potencial de produção do composto nessas situações.

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos por esse processo com um tempo de apenas 96h para se avaliar qual o perfil de produção do composto de acordo com a disponibilidade de diferentes fontes de carbono.

Tabela 22. Produção do álcool feniletílico em diferentes meios com limitação de fontes de carbono.

TEMPO	MM	MMG (Glicose)	MMF (farneseno)	MMGF (Glic + Farn)
0h	0	0	0	0
24h	0	0	0	0
48h	0	3,3	17,45	23,3
72h	0	14,45	29,4	44,1
96h	0	27,85	44,05	66

Segundo os dados apresentados, fica evidenciado que o fungo apresenta o aparato enzimático necessário para a produção do composto mesmo em limitação de substrato, uma

vez que conseguiu produzir o composto mesmo somente com a presença de glicose e alguns minerais presentes no meio (MMG), contudo, cabe a avaliação dos três meios em paralelo.

Interessante ressaltar a capacidade do fungo de produzir o composto mesmo em limitações claras de substrato, como evidenciado anteriormente, porém é relevante ressaltar que a produção do composto foi cerca de 65% maior no meio de cultura contendo apenas o farneseno como substrato (MMF) e aproximadamente 150% maior quando na presença de glicose e farneseno no meio (MMGF).

Ao comparar-se os dados apresentados nas Tabelas 21 e 22, é possível notar uma diferença clara entre o tempo de produção do composto nas diferentes condições a qual o micro-organismo foi inserido. Esse fato é explicado pela complexidade dos diferentes meios onde, em meios com teores de minerais e açúcares reduzido (como os apresentados na Tabela 22) o processo de produção de compostos secundários é acelerado, fazendo com que a produção do composto seja identificada em um intervalo de tempo menor.

Esses dados indicam que o fungo apresenta a capacidade de produção do composto diretamente pelo consumo da glicose (*síntese de novo*), bem como a sua produção através da metabolização do farneseno, muito provavelmente através do seu metabolismo secundário sendo, portanto, extremamente viável um processo produtivo em que haja a presença de açúcares facilmente fermentescíveis (glicose ou frutose) e também o farneseno como substrato secundário como é proposto pelo meio de cultura desenvolvido durante o projeto.

5.13. CONCLUSÃO

Avaliando-se todos os dados apresentados e as análises realizadas fica evidente o potencial do micro-organismo selecionado para o processo de produção do álcool fenilético através do processo de fermentação em estado líquido em meio de cultura desenvolvido com o uso de bagaço de maçã fuji. O processo dar-se-á por um período médio de 216 horas, podendo o mesmo ser estendido até 240h se necessário.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nas partes I, evidenciaram a presença, concentração e a otimização processo de extração de compostos voláteis das maçãs Gala e Fuji com foco principal no composto tido como alvo no bagaço de maçã para o restante do trabalho, o α -farneseno.

Os dados obtidos na parte I foram determinantes para o processo de análise dos sucos de maçã avaliados na parte II do trabalho, demonstrando a diferença na concentração desse composto em diferentes amostras de suco de maçã *in natura* e amostras comerciais. As diferenças no processo de produção dos sucos de maçã avaliados foram notoriamente prejudiciais à composição de compostos voláteis presentes nas amostras, podendo até mesmo comprometer as características dos sucos comerciais.

À partir dos dados obtidos nos estudos das partes I e II do trabalho, a variedade Fuji foi selecionada como a mais interessante para o prosseguimento do projeto, sendo utilizada para o desenvolvimento do meio de cultivo avaliado nas partes III e IV do trabalho.

De acordo com todos os dados apresentados fica registrado o processo de seleção de micro-organismo com potencial para a produção de compostos aromáticos através de um meio de cultivo desenvolvido utilizando-se o bagaço de maçã Fuji. Os micro-organismos utilizados foram adicionados à coleção culturas microbianas do laboratório de Bioaromas acondicionados conforme estipulado pela metodologia padrão.

Diante dos resultados apresentados, demonstrou-se que as culturas selecionadas tiveram a capacidade de produção de compostos de aroma, em especial a cultura com nomenclatura “CSC2_F1” pelo seu potencial para produção de álcool feniletílico, utilizado na parte IV do trabalho para otimização dos resultados de produção do composto.

O processo de produção do composto pelo fungo mostrou-se viável e possível, sendo necessário para os próximos trabalhos um processo de otimização do processo de produção, bem como o escalonamento do processo e avaliação da manutenção das características quando em maior escala.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com todos os dados obtidos neste trabalho, ficam registradas algumas sugestões para a realização de trabalhos futuros dando continuidade ao processo já iniciado.

- Identificação dos Gêneros dos micro-organismos selecionados;
- Estudo das características dos micro-organismos selecionados e adequação do meio para otimização do processo produtivo;

- Otimização do processo de produção com escalonamento do processo para biorreatores;
- Estudo de processos de extração e concentração do álcool feniletílico produzido;

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W.; ARFMANN, H.; GIERSCH, W. Microbial Hydroxylation of Precursors of Sinensal. *Zeitschrift Für Naturforschung, Deustch*, v. 1, n. 1, p.851-858, 26 out. 1992.

ANET, E.F.L.J. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IX. Effect of maturity and ventilation. *J. Sci. Food Agric.* 23, 763–769, 1972.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, v. 1, n. 1, Jan. 2015. Anual.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). RDC N°2: Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. 1 ed. Brasília: 2007. 47 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 25 nov. 2016.

ARMSTRONG D.W., BROWN L.A., PORTER S., RUTTEN R. Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. In: Schreier P, Winterhalter P (eds) *Progress in flavour precursor studies*. Allured, Carol Stream, Ill, pp 425-438, 1993.

ASSAF S., HADAR Y., DOSORETZ C.G. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenata of *Pleurotus pulmonarius*. *J Agric Food Chem* 43: 2173-2178, 1995.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.

BEDOUKIAN, P.Z. Phenyl ethyl alcohol. In: *Perfumery and flavoring synthetics*. Allured, Wheaton, pp 370–383, 1986.

BELUCI, N.C.L., MORAES, F.F. Caracterização do complexo de inclusão entre o álcool fenilético e a gama ciclodextrina. ENBEQ (encontro brasileiro sobre o ensino de engenharia química), 26 de Setembro de 2016.

BERGER, R.G. *Aroma Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 240 p.

BERGER R.G. *Biotechnology of aroma compounds*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1996.

BICAS, J.L.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; GODOY, H.T.; PASTORE, G.M. Optimization of R-(+)-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1061-1070, 2008.

BICAS, J.L., DIONISIO, A.P., PASTORE, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. *Chemical Reviews*, 109:4518–4531, 2009.

BICAS, J.L. Estudos de obtenção de compostos de aroma pela biotransformação de compostos terpênicos. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

BRASIL. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº104, de 14 de maio de 1999.

BREITMEIER, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Ed John Wiley & Sons, p. 223, 2006.

CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; KLIMANKOVA, E.; CERNA, M.; PUDIL, F.; HAJŠLOVA, J. Traceability of olive oil based on volatiles pattern and multivariate analysis. *Food Chemistry*, v. 121, p.282-289, 2010.

CHIAPPINI, C.C. Aromas naturais produzidos por micro-organismos. *Food Ingredients Brasil*, 4:22-24, 2008.

CLARK, G.S. Phenethyl alcohol. *Perfum Flavor* 15:37–44, 1990.

DEMYTTENAERE, J.C.R. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 25:125-178, 2001.

DUBAL, S.A; TILKARI, W.P; MOMIN, S.A; BORKAR, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced biotechnology*, 20-31, 2008.

ETSCHMANN, M., BLUEMKE, W., SELL, D., SCHRADER, J.. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 59, n. 1, p.1-8, 1 jun. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>.

ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.25, p.531-536, 2003.

ETSCHMANN, M. M. W.; SCHRADER, D. S. J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.29, p.187-193, 2004.

FABRE C.E., BLANC P.J., GOMA G. Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sci Aliment* 16: 61-68, 1996.

FABRE, C.E.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Screening of yeasts producing 2- phenylethylalcohol. *Biotechnology Techniques*, v.11, n.7, p.523-525, 1997.

FABRE C.E., BLANC P.J., GOMA G. 2-Phenylethyl alcohol: an aroma profile. *Perfum Flavor* 23:43–45, 1998.

FALCONNIER B, LAPIERRE C, LESAGE-MEESSEN L, YONNET G, BRUNERIE P, COLONNA-CECCALDI B, CORRIEU G, ASTHER M. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. *J Biotechnol* 37: 123-132, 1994.

FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2015. *OECD-FAO Agricultural Outlook*, v. 1, n. 1, p.1-54, 1 jul. 2015. OECD Publishing. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en.

FERON, G., BONNARME, P., DURAND, A. Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science and Technology*, 7:285-293, 1996.

FRANCO, M.R.B. *Aroma e Sabor dos Alimentos: Temas Atuais*. São Paulo: Livraria Varela. 2003. 246 p.

GARAVAGLIA, J. Bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* em mosto de uva. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GASSENMEIER K., SCHIEBERLE P. Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type) – influence of preferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Z Lebensm-Unters Forsch* 201:241–248, 1995.

HAGEDORN S., KAPHAMMER B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu Rev Microbiol* 48: 773-800, 1994.

HEGARTY P.K., PARSONS R., BAMFORTH C.W., MOLZAHN S.W. Phenylethanol – a factor determining lager character. *Proc Congr Eur Brew Conv* p. 515–522, 1995.

HUA, D., XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p.654-660, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.001>.

HUANG C.J.R., LEE S.L., CHOU C.C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. *J Biosci Bioeng* 90:142–147, 2000.

HUELIN, F.E., MURRAY, K.E. Farnesene in the natural coating of apples. *Nature (Lond.)* 210, 1260–1261, 1966.

IAL Consultants. An overview of the global flavours and fragrances Market, 2007. Disponível em: www.ialconsultants.com acessado em fevereiro de 2017.

IAL Consultants. An overview of the global flavours and fragrances Market, 2016. Disponível em: www.ialconsultants.com acessado em fevereiro de 2017.

IBGE: LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, 01 mar. 2015.

INGLE, M., D'SOUZA, M.C. Physiology and control of superficial scald of apples: a review.

HortScience 24, 28–31, 1989.

JANSSENS, L; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M. E VANDAMME, E. J. Production of flavours by

microorganisms. *Process Biochemistry*, v.27, p.195-215, 1992.

JANZANETTI, N.S; FRANCO, M.R.B; LANÇAS, F.M. Identificação de compostos voláteis de

maçãs (*Malus domestica*) cultivar fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Maio de 2000.

JANZANETTI, N.S; FRANCO, M.R.B; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de

voláteis de suco clarificado de maçã fuji. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Setembro de 2003.

JIANFENG, M.; MIN, H.; ZHENMEI, L. Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-

phenylethanol using an in situ product adsorption technique. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 886-890, 2009.

JOLLIVET N., BÉZINGER M. C., VAYSSIER Y., BELIN J.M. Production of volatile compounds in

liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:790–794, 1992.

JU, Z.; CURRY, E.A. Evidence that a-farnesene biosynthesis during fruit ripening is mediated by

ethylene regulated gene expression in apples. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.19, n.1, p.9-16, 2000.

KANDYLIS, P.; VEKIARI, A. S.; KANELAKI, M.; KAMOUN, N.G.; MSALLEM, M.; KOURKOUTAS,

Y. Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea*

europaea var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *Food Science and Technology*, v. 44, p.1333-1341, 2011.

KAWABE T., MORITA H. Volatile components in culture fluid of *Polyporus tuberaster*. *J Agric Food Chem* 41: 637-640, 1993.

KIESER M.E., POLLARD A., STEVENS P.M., TUCKNOTT O.G. Determination of 2-phenylethanol in cider. *Nature*, 204 : 887, 1964.

KIRM, I.; MEDINA, F.; RODRIGUEZ, X.; CESTEROS, Y.; SALAGRE, P. E SUEIRAS, J. E. Preparation of 2-phenylethanol by catalytic selective hydrogenation of styrene oxide using palladium catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.239, p.215-221, 2005.

KRINGS U., ABRAHAM B., BERGER R.G. Plant impact volatiles from higher fungi - a biotechnological perspective. *Perf Flavor* 20: 79-86, 1995.

KRINGS, U., BERGER, R.G. Biotechnological production of flavors and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49:1-8, 1998.

KRINGS, U.; HARDEBUSCH, B.; ALBERT, D.; BERGER, R.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Odor-active Alcohols From the Fungal Transformation of α - Farnesene. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p. 9079-9084, 2006.

LANGENHEIM, J.H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, p.1223-1280, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LEE C. W., RICHARD J. Catabolism of L-phenylalanine by some microorganisms of cheese origin.

J Dairy Res 51:461– 469, 1984.

LEE, P.C; SCHIMIDT-DANNERT,C.. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. v.80,p. 1-11,

2002.

LEFFINGWELL AND ASSOCIATES. In 2011 - 2015 Flavor & fragrance industry leaders, 2015.

www.leffingwell.com/top_10.htm acessado em Fevereiro de 2017.

LEPE. J.A.S. e LEAL, B.I. Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación. 2.ed. Madrid:

Ediciones Mundi-Prensa, p. 547, 1992.

LIEBIG J, WOÈHLER F. Ueber die Bildung des Bittermandeloëls Annalen. Pharm Justus Liebig

Emanuel Merck, 1837.

MANLEY C.H. The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients

produced by biotechnology. In: Gabelman A (ed) Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. Wiley, New York, pp 19-39, 1994.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M.. Biotransformation of Citronellol in Rose-Oxide Using

Cassava Wastewater as a Medium. Ciência e tecnologia de alimentos, n. 3, p. 690- 696, 2006.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M.. Production of R-(+)- α -terpineol by the

biotransformation of limonene from Orange essential oil, using cassava waste water as medium. Food Science. v.101, p.345-350, 2007.

MEIGH, D.F., FILMER, A.A.E. Natural skin coating of the apple and its influence on scald in storage. III. Farnesene. *J. Sci. Food Agric.* 18, 307–313, 1969.

MIERSCH O., GÜNTHER T., FRITSCH W., SEMBDNER G. Jasmonates from different fungal species. *Nat Prod Lett* 2: 293-299, 1993.

MOLINA, G.; PINHEIRO, D.M.; PIMENTEL, M.R.; SANTOS, R.; PASTORE, G.M. Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits. *Food Sci. Biotechnol.* v.22, p.999-1006, 2013.

MOLINA, G. Produção biotecnológica de compostos de aroma por biotransformação de terpenos. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MOREIRA, R. A. F.; DE MARIA C. A. B. Investigation of the Aroma Compounds from Headspace and Aqueous Solution from the Cambará (*Gochnatia velutina*) Honey. *Flavour And Fragrance Journal*, v.20, p.13-17, 2005.

MURRAY, K.E., HUELIN, F.E., DAVENPORT, J.B. Occurrence of a-farnesene in the natural coating of apples. *Nature (Lond.)* 204, 80, 1964.

OLIVEIRA, Marcos. Diesel de cana. Disponível em:
<<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3689&bd=1&pg=1&lg>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

OMELIANSKI, V.L. Aroma producing microorganisms. *Bacteriology* 8: 393, 1923.

PAULINO, B.N. Otimização de processos biotecnológicos para a produção de compostos de aroma à partir de substratos monoterpênicos. Dissertação(Mestrado em Ciência de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I. Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. v.74, p.69-80, 2000.

PIASENZOTTO L., GRACCO L., CONTE L. Solid Phase Microextraction (SPME) Applied to Honey Quality Control, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, p.1037-1044, 2003.

PIMENTEL, M.R. Produção de compostos de aroma a partir da biotransformação de monoterpenos por *Pseudomonas*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PYYSALO, H., SUIHKO, M. Odour characterisation and threshold values of some volatile compounds in fresh mushrooms. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 9, 371-373, 1976.

REAY, P.F.; ROWAN, D. D.; HUNT M. B. E FIELDER, S. Evaluating the effect of α -farnesene on the symptoms of superficial scald in 'granny smith' apples. *Ishts Acta Horticulturae*, v. 96, n. 464, p.517-524, 01 jun. 1998.

REIMER F, TIEMANN, C.S.R. Ueber die Einwirkung von Tetrachlorkohlensto auf Phenol in alkalischer Loèsung. *Ber Dtsch Chem Ges Berlin* 9: 1285, 1876.

RODOPULO A.K., LYUDNIKOVA T.A., BEZZUBOV A.A. Effect of yeast cultivation conditions on the biosynthesis and accumulation of aromatic substances. *Appl Biochem Microbiol* 21: p. 332– 336, 1985.

RUZICKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, v. 50, p. 395-405, 1953.

SANTOS, B. A. C. Compostos Voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens Varietal Cabernet Sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil. 176 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

SAVINA J.P., KOHLER D., BRUNERIE P. Method for extracting 2-phenylethanol. Patent application US005965780A, 1999.

SEBRAE. Sim - Sistema de Inteligência de Mercado. Fruticultura: Boletim de inteligência. Outubro de 2015. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>.

SEITZ E.W. Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavors and fragrances. In: Gabelman A (ed) *Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients*. Wiley, New York, pp 95-134, 1994.

SERP, D.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I.W. Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.82, n.1, p.103-110, 2003.

SERRA, S., C. FUGANTI, E. BRENNNA. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances.

Trends Biotechnology, 23, 193–198. 2005.

SILWAR, R.; KAMPERSCHRÖER, H.; TRESSL, R. Gaschromato-graphisch-massen

spektrometrische untersuchungen des röstkaf-feearomas. Chemie, Mikrobiologie,

Technologie der Lebensmittel, v.10, p.176-187, 1987.

SMITH, R. L. et al. GRAS: Flavoring substances. Food Technology, p.46-105, 06 set. 2009.

Disponível em: <<http://www.ift.org/~media/Food>

Technology/pdf/2009/06/0609feat_GRAS24text.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2016.

SOMOGYI, L.P. The flavour and fragrance industry: serving a global market. Chemical Industry,

4:170-173, 1996.

STROBEL, G.A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic

microorganisms. Journal of Natural Products, v. 67, p. 257-268, 2004.

TIEMAN, D. M., LOUCAS, H.M., KIM, J.Y., CLARK, D.G., KLEE, H.J.. Tomato

phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma

volatile 2-phenylethanol. Phytochemistry, v. 68, n. 21, p.2660-2669, nov. 2007. Elsevier

BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.005>.

TIEMANN F, HAARMANN W. Ueber das Coniferin und seine Umwandlung in das aromatische

Princip der Vanille. Ber Dtsch Chem Ges 7: 608, 1874.

TECELÃO, C.S.R., VAN KEULEN, F., FONSECA, M.M.R. Development of a reaction system for

the selective conversion of (-)-trans-carveol to (-)-carvone with whole cells of

Rhodococcus erythropolis DCL14, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 11, 719-724, 2001.

TEISSEIRE, P. J. Chemistry of Fragrant Substances. Translated by Peter A. Cadby. New York: VCH Publishers, 1994.

VANDAMME, E.J.; SOETAERT, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Oxford*, v.77, p.1323-1332, 2002.

XU, P.; HUA, D.; MA, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in biotechnology*, v. 25, n. 12, p. 571-6, 2007.

WATKINS, C.B., BARDEN, C.L., BRAMLAGE, W.J. Relationships among α -farnesene, conjugated trienes and ethylene production with superficial scald development of apples. *Acta Hort.* 343, 155–160, 1993.

WELSH F.W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: Gabelman A (ed) *Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients*. Wiley, New York, pp 1-16, 1994.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast, Chichester*, v.19, p.1351-1363, 2002.

WHITAKER, B.D. DPA treatment alters α -farnesene metabolism in peel of 'Empire' apples stored in air or 1.5% O₂ atmosphere. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 91–97, 2000.

WHITING, M.D. Volatile evolution, α -farnesene catabolism and superficial scald development in 'delicious' apples. A Thesis Presented to The Faculty of Graduate Studies

of The University of Guelph In partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science, 1998.