



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA POR  
*Kluyveromyces marxianus* UTILIZANDO RESÍDUO DE  
GRAVIOLA (*Annona muricata L.*)**

Ana Lúcia de Jesus Leal

SÃO CRISTÓVÃO-SE  
Fevereiro/2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA POR  
*Kluyveromyces marxianus* UTILIZANDO RESÍDUO DE  
GRAVIOLA (*Annona muricata L.*)**

Ana Lúcia de Jesus Leal

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narain

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino

Agência Financiadora: CAPES

SÃO CRISTÓVÃO-SE  
Fevereiro/2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

L435p Leal, Ana Lúcia de Jesus  
Produção de compostos de aroma por *Kluyveromyces marxianus* utilizando resíduo de graviola (*Annona muricata* L.) / Ana Lúcia de Jesus Leal ; orientador Narendra Narain. – São Cristóvão, 2012.  
66f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)  
– Universidade Federal de Sergipe, 2012.

1. Aroma. 2. Graviola. 3. Resíduos orgânicos. 4. microorganismos. I. Narain, Narendra, orient. II. Título.

CDU 66.095.252.4:634.41



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRADO

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA POR  
*Kluyveromyces marxianus* UTILIZANDO RESÍDUO DE  
GRAVIOLA (*Annona muricata* L.)**

**Autor:** Ana Lúcia de Jesus Leal

**Orientador:** Prof. Dr. Narendra Narain

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Narendra Narain  
Orientador/NUCTA - UFS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva  
Examinador Interno/NUCTA - UFS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleide Mara Faria Soares  
Examinador Externo/UNIT

*"A coisa mais bela que o homem pode  
experimental é o mistério.  
É essa emoção fundamental que está na raiz  
de toda ciência e toda arte."*

*Albert Einstein*

## **VITAE DO CANDIDATO**

Ana Lúcia de Jesus Leal, filha de Manoel Messias Leal e Maria Lucia de Jesus Leal, nasceu no dia 06 de abril de 1984, em Itabaiana-Sergipe.

**Formação acadêmica/Titulação:** Em 2005 iniciou o curso de Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Sergipe (UFS), concluindo-o em 2009. Foi bolsista de Iniciação Científica, no período de 2007 a 2009. Em Março de 2010, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE.

**Nome em citações bibliográficas:** LEAL, A. L. J.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo, me dando força para prosseguir em busca de meus sonhos.

A minha mãe Lúcia, pelo amor, carinho e incentivo em todas as horas e ao meu pai, Manuel Messias (*in memorian*), que sempre foi minha estrela guia em todos os momentos da minha vida.

Aos meus Príncipes, Valberclay e Wagner, simplesmente por serem meus IRMÃOS.

À todos meus primos, em especial a Simone, Suzana e Samara pelo incentivo e pelos momentos de alegria e descontração.

À todos os meus familiares pelo amor, carinho e por acreditar em mim sempre.

Ao meu orientador, Narendra Narain, pela dedicação, paciência, confiança e apoio na realização deste trabalho.

À professora Luciana, por sua co-orientação e valiosas sugestões, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A toda Equipe do Laboratório de Análises Cromatográficas e de Flavor, em especial a Anderson, Taciana, Karen, Raquel, Michel e Regina que sempre me ajudaram nos desenvolvimentos das minhas atividades. Nunca vou esquecer vocês.

À querida amiga Mércia, por ter contribuído com este trabalho, compartilhando interesses, atividades, preocupações e alegrias.

Aos amigos conquistados no decorrer do curso do mestrado, pela amizade, companheirismo e pelas experiências divididas em vários momentos durante a realização deste curso.

À minha grande amiga Kelly, pelas palavras de incentivo e ombro amigo sempre oferecido nas horas que eu mais precisava.

À todos os meus amigos, em especial Marcelinho, Daniela, Tayany, Grayce, Greicy Emily, pela paciência, apoio e momentos inesquecíveis.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, fica meu sincero reconhecimento.

## RESUMO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de frutas frescas. A produção deste alimento gera uma grande quantidade de resíduo que representa um sério problema na disposição final e perda econômica associada ao não aproveitamento desse material. A perda econômica dessa biomassa pode ser reduzida pelo uso das mesmas em fermentações para produção de compostos de aroma. Diante disso o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial do resíduo proveniente do processamento da graviola para obtenção de compostos de aroma, principalmente 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato em fermentação submersa por *Kluyveromyces marxianus*. Foram realizados testes preliminares para selecionar o resíduo com maior potencial para produção destes compostos, para isso utilizou-se tanto da técnica da análise sensorial como da cromatografia. Dentre os resíduos estudados (acerola, mangaba e graviola) o de graviola proporcionou um maior potencial para a produção de compostos de aroma de alto valor agregado. Foram escolhidos dois compostos de aroma frutal, 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato, para estudar os melhores parâmetros no intuito de obter uma maior produção. Primeiramente, avaliou-se a produção dos compostos citados por meio da realização de um delineamento experimental, estudando seis parâmetros: concentração de açúcar, de extrato de levedura, de resíduo, de inóculo, pH e agitação. Diante do resultado optou-se por continuar estudando a concentração de extrato de levedura e glicose como também a agitação. Sendo assim, utilizou-se do planejamento fatorial completo com três variáveis dependentes: concentração de açúcar que variou de 10 a 50g/L, concentração de extrato de levedura que variou de 0 a 10g/L e agitação que variou de 75 a 150rpm. Segundo a análise de superfície resposta, o processos de produção dos compostos foi otimizado, nas condições propostas, onde a maior produção de 2-fenetil acetato pode ser obtida em concentrações de extrato de levedura entre 2,5 e 7,0 g/L de extrato de levedura, glicose entre 21 e 40 g/L e agitação entre 95 e 135 rpm e maior produção do composto 2-feniletanol pode ser obtida em concentrações de extrato de levedura entre 4,0 e 6,0 g/L de extrato de levedura, glicose entre 22 e 42 g/L e agitação entre 100 e 120 rpm.

**Palavras Chaves:** Aroma, graviola, resíduo, microrganismo

## ABSTRACT

Brazil is a leading global producer of fresh fruits. The production of this food generates a large amount of waste represents a serious problem in the disposal and economic loss associated with non-use of such material. The economic loss of biomass can be reduced by the use thereof in fermentation for the production of aroma compounds. Given that the objective of this study was to evaluate the potential of the waste from the processing to obtain soursop aroma compounds, especially 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate in submerged fermentation by *Kluyveromyces marxianus*. Preliminary tests were performed to select the residue with the greatest potential for production of these compounds, it was used for both the technique of chromatography and sensory analysis. Among the residues studied (acerola, mangaba and soursop) the soursop has provided a greater potential for the production of aroma compounds of high added value. That done, he was chosen two fruit aroma compounds, 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate, to study the best parameters in order to get more output. First, we evaluated the production of such compounds by means of conducting an experiment, studying six parameters: concentration of sugar, yeast extract, residue of inoculum, pH and agitation. Given the outcome was decided to continue studying the concentration of yeast extract and glucose as well as agitation. Therefore, we used the full factorial design with three dependent variables: sugar concentration ranged from 10 to 50 g/L, yeast extract concentration ranging from 0 to 10 g/L and agitation which ranged from 75 to 150rpm. According to the analysis of the response surface, the production processes of the compounds has been optimized, the conditions proposed, where the increased production of 2-phenethyl acetate may be obtained at concentrations of yeast extract, 2.5 to 7.0 g/L yeast extract, glucose from 21 to 40 g/L an stirred between 95 and 135 rpm and increased production of 2-phenylethanol compound can be obtained at concentrations of yeast extract, between 4.0 and 6.0 g/L of extract of yeast, glucose 22 to 42 g/L and agitation from 100 to 120 rpm.

**Keywords:** flavor, soursop, residue, microorganism

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SUMÁRIO .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3.1 Objetivo Geral.....	3
3.2 Objetivo Específico.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 Aroma .....	4
3.2 Compostos de aroma.....	6
3.3 2-Feniletanol .....	8
3.4 2-Fenetil acetato.....	11
3.5 Produção de aromas através de processos fermentativos .....	12
3.6 Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de aromas .....	14
3.7 A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	17
3.8 Análise dos compostos de aroma.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
4.1 Materiais .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2 Microrganismo.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2 Resíduos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2. Metodologia Experimental .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1 Experimentos fermentativos .....	25
4.2.2 Seleção do residuo pontecial produtor de aroma .....	28
4.2.2.1 Análise sensorial dos fermentados.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.3 Delineamento Experimental para determinações das condições .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.5.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR) .....	23
4.3 Métodos Analíticos .....	29
4.3.1 Caracterização físico-química dos residuos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3.1.1 pH.....	26
4.3.1.2 Sólidos solúveis totais.....	26
4.3.1.3 Acidez total titulável .....	26
4.3.1.4 Açúcares redutores.....	26
4.3.1.5 Umidade.....	27
4.3.1.6 Proteína .....	27
4.3.1.7 Cinzas.....	28
4.3.1.8 Lípidios .....	28
4.3.1.9 Fibra.....	28
4.3.1.10 Pectina.....	28
4.3.2 Isolamento dos compostos de aroma .....	29
4.3.3 Análises cromatograficas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3.4 Identificação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização físico-química dos resíduos de processamento de polpas de frutas .....	32

5.2 Seleção dos resíduos potenciais produtores de aromas .....	33
5.2.1 Análise sensorial .....	33
5.2.2 Análises cromatográficas do fermentado de graviola.....	35
5.3 Influência de parâmetros na produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e do 2 fenetil acetato - Planejamento fracionado.....	38
5.4. Produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e do 2-fenetil acetato - Planejamento fatorial completo .....	39
5.4.1 Cinética da produção do composto de aroma 2-feniletanol .....	39
5.4.2 Influência dos parâmetros na produção do composto de aroma 2-feniletanol .....	42
5.4.3 Cinética de produção do composto de aroma 2-Fenetil acetato .....	48
5.4.4 Influência dos parâmetros na produção do composto de aroma 2-fenetil acetato .....	50
5.5 - Cinética de consumo de substrato e acompanhamento do pH .....	56
6. CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIA .....	58
ANEXO .....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1- Classe e estrutura de alguns compostos aromáticos e seus respectivos aromas.....	7
TABELA 2- Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol.....	10
TABELA 3- Propriedades físicas e químicas do 2-fenetil acetato .....	12
TABELA 4- Produção de aroma por processos fermentativos.....	13
TABELA 5- Classificação taxonômica da levedura <i>K. marxianus</i> .....	17
TABELA 6- Variáveis reais e codificadas do delineamento experimental.....	23
TABELA.7- Experimentos utilizados no deleniamento experimental para otimização dos compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato .....	23
TABELA 8- Valores reais e independentes utilizados para otimização da produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato .....	24
TABELA 9- Planejamento fatorial completo para a produção de compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato .....	25
TABELA 10- Composição centesimal dos resíduos de acerola, mangaba e graviola.....	32
TABELA 11- Compostos de aroma identificados nos fermentados de resíduo de graviola após 72 horas de fermentação.....	37
TABELA 12- Valores reais e codificados da matriz do delineamento experimental para a produção de 2-feniletanol e variavel resposta em área (count) do pico cromatografico .....	38
TABELA 13- Valores reais e codificados da matriz do delineamento experimental para a produção de 2-fenil acetato e variavel resposta em área (count) do pico cromatografico.....	39
TABELA 14- Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-Feniletanol e variável resposta em área (count) do pico cromatográfico .....	41
TABELA 15- Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-feniletanol.....	43
TABELA 16- Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-Fenetilacetato e variável resposta em área (count) do pico cromatográfico .....	50
TABELA 17- Análise de variância para a produção do 2-fenetil acetato .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- Via de Ehrlich para a produção de 2-FE.....	11
FIGURA 2- Etapas da extração de compostos de aroma com a técnica SPME .....	29
FIGURA 3- Análise sensorial ao longo da fermentação das farinhas dos resíduos de graviola, acerola e mangaba.....	34
FIGURA 4- Intensidade de diversos aromas nos fermentados utilizando o resíduo da farinha da graviola .....	34
FIGURA 5- Cromatograma do fermentado do resíduo de graviola após 72 horas de fermentação.....	36
FIGURA 6- Cinética da FS para produção do composto de aroma 2-feniletanol segundo o planejamento experimental completo (Tabela 12).....	40
FIGURA 7- Cinética de produção do composto de aroma 2-FE (cromatograma da melhor produção), os picos cor preta, laranja, rosa e marrom correspondem a sua presença nos fermentados obtidos nos tempos 24, 48, 72 e 96 respectivamente.....	42
FIGURA 8- Gráfico de Pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-feniletanol .....	43
FIGURA 9- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura .....	44
FIGURA 10- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.....	45
FIGURA 11- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito da concentração de extrato de levedura e agitação .....	45
FIGURA 12- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações na concentração de extrato de levedura e agitação .....	46
FIGURA 13- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito na concentração de glicose e agitação.....	46
FIGURA 14- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações na concentração de glicose e agitação .....	47
FIGURA 15- Cinética da FS para produção do composto de aroma 2-fenetil acetato segundo o planejamento experimental completo (Tabela 14) .....	48
FIGURA 16- Cinética de produção do composto de aroma 2-fenetil acetato (cromatograma da melhor produção) os picos cor preta, laranja, rosa e marrom correspondem a sua presença nos fermentados obtidos nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente .....	49
FIGURA 17- Gráfico de Pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-fenetil acetato.....	51
FIGURA 18- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura.....	53
FIGURA 19- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.....	53
FIGURA 20- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato demonstrando o efeito da concentração de extrato de levedura e agitação .....	54
FIGURA 21- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato de acordo com as variações na concentração de extrato de levedura e agitação.....	54
FIGURA 22- Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato demonstrando o efeito na concentração de glicose e agitação .....	55

FIGURA 23- Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato de acordo com as variações na concentração de glicose e agitação .....	55
FIGURA 24- Acompanhamento do ART, °Brix e pH durante os 5 dias de fermentação .....	57

## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASSISTAT	Assistência Estatística
° Brix	Graus Brix
°C	graus Celsius
CG	Cromatógrafo Gasoso
Da	Dáltons
DTA	Departamento de Tecnologia de Alimentos
EM	Espectrômetro de massa
IBRAF	Instituto Brasileiro de Frutas
2-FE	2-Feniletanol
2-FEA	2-Fenetil acetato
GC/MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
GRAS	<i>Gerally Regarded As Safe</i>
FS	Fermentação submersa
IAL	Instituto Adolf Lutz
IRL	Índice de retenção linear
L	Coeficiente linear
LAF	Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas
LMA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
NIST	<i>National Institute of Standarts and Technology</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Poli(etilenoglicol)
Q	Coeficiente quadrático
PROCTA	Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
SAS	Statistical Analysis System
SPME	<i>Solid-Phase Micro-extraction</i>
t	Tempo (h)
UFS	Universidade Federal de Sergipe
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
g	Grama
mg	Miligrama
Kg	Quilo
L	Litros
g.L <sup>-1</sup>	grama por litro
h	horas
%	percentual
min	Minuto
µmol/L/mL	µmol/L(headspace)/mL(fermentado)

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de frutas tropicais no mercado internacional coloca o Brasil como um dos mais promissores países a dominar este mercado. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), em 2009 o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas com uma produção que superou os 41 milhões de toneladas, o que representou 5% da produção mundial.

Nesse cenário, a Região Nordeste vem se destacando cada vez mais. Nos últimos anos, observou-se, de uma maneira geral, um processo de aperfeiçoamento, caracterizado pela exploração de áreas mais extensas, pela utilização da irrigação e pelo incremento de novas tecnologias, visando elevadas e qualitativas produções de frutos. Em resposta a esse avanço, o número de agroindústrias instaladas por toda a região tem aumentado significativamente, gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais (LOUSADA JÚNIOR *et al.*, 2006). Os resíduos agroindustriais podem conter substâncias de grande potencial, podendo ser utilizados como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de compostos de elevado valor comercial como etanol, enzimas, ácidos e compostos de aroma (LAUFENBERG, *et al.*, 2003; DHILLON *et al.*, 2004).

A produção biotecnológica de compostos de aroma vem sendo estimulada pela crescente demanda do mercado consumidor por produtos rotulados como “naturais” e “saudáveis”. A maior parte dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações. Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001; BICAS *et al.*, 2010), e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias (UENOJO e PASTORE, 2006).

A utilização de microrganismos para a produção de aromas já é conhecido ao longo dos anos. Estima-se que cerca de 100 compostos de aroma são produzidos industrialmente por fermentação através de microrganismos (MENDEIROS *et al.*,

2006). Dentre estes compostos, os que possuem aromas florais têm maior interesse industrial. Como exemplo disso, podemos citar o 2-feniletanol (2-FE) e o 2-fenil acetato (2-FEA) que são compostos de aroma de alto valor com um odor semelhante a rosas e são usados amplamente para modificar certas composições de aroma na matéria prima, tais como, fórmulas frutadas, sorvetes, bombons, pudins, goma de mascar onde contribui sensorialmente (HUANG *et al.*, 2000; STARK *et al.*, 2003). De maneira geral a produção desses compostos variam em função de fatores químicos, físicos e biológicos. As condições do processo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, agitação, temperatura de incubação, aeração, gênero e espécie do microrganismo e quantidade de inóculo, são fatores determinantes para os tipos e quantidades dos compostos produzidos.

Atualmente, um dos microrganismos que vêm sendo utilizado em várias aplicações biotecnológicas é a *Kluyveromyces marxianus*. Estudos demonstram a eficiência dessa levedura na produção de etanol, de proteína celular, de enzimas, em aplicações ambientais, compostos de aroma (HANG *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; SCHULTZ *et al.*, 2005; RAJOKA, 2007; ODA e NAKAMURA, 2009; GAO e DAUGULIS, 2009). Entretanto, em relação à produção de aromas através desta levedura utilizando resíduo agroindustrial como substrato, foram encontrados poucos relatos na literatura (FABRE *et al.*, 1995; MEDEIROS *et al.*, 2000; PEREIRA, 2006).

A partir desses aspectos, e sabendo que os substratos agroindustriais oferecem várias vantagens como fácil manuseio, baixo custo, alta produtividade além de minimizar os problemas ambientais, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de resíduos proveniente do processamento de polpas de frutas para a obtenção de compostos de aroma, através de fermentação submersa utilizando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como o objetivo avaliar o potencial de resíduos proveniente do processamento de polpas de frutas para a obtenção de compostos de aroma, através de fermentação submersa utilizando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar as características físicas, químicas e físico-químicas da farinha obtida a partir dos resíduos agroindustriais regionais (acerola, graviola e mangaba);
- Realizar fermentação submersa utilizando o resíduo de fruta (acerola, graviola ou mangaba) e selecionar através de análise sensorial aquele que apresentou maior potencial para produção de aromas;
- Avaliar a influência de parâmetros (concentração de glicose, extrato de levedura e agitação) no processo fermentativo, através da metodologia de superfície de resposta, para a obtenção de compostos de aroma utilizando o resíduo de fruta selecionado.
- Identificar e quantificar os compostos voláteis do aroma produzido pelo processo fermentativo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aroma

A palavra aroma veio do grego e originalmente significava condimento. Mais tarde esse significado mudou para todas as percepções de odor que apresentavam sensação de cheiro agradável (MATHEIS, 1997).

O aroma, segundo a análise sensorial é um dos parâmetros mais importantes para determinar a qualidade do produto e aceitação. A característica mais comum dos compostos aromáticos é a sua volatilidade (peso molecular geralmente inferior a 400 Da). Estas moléculas podem ser hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, lactonas, ou que estão presentes em baixas concentrações na composição dos produtos alimentares (BICAS *et al.*, 2010).

A percepção do aroma depende do impacto individual de cada um desses compostos, mas geralmente é o resultado do balanço global entre eles. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de uma determinada matriz, mas em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma, e são chamados de compostos caráter-impacto. Os demais compostos necessários para se obter o sabor pleno são chamados de compostos contribuintes (FRANCO, 2004).

Desde a antiguidade, os processos fermentativos têm sido empregados para a produção de produtos alimentares. No entanto, a produção em potencial de aromas produzidos por microrganismos passou a ser buscada em tempos mais recentes. Em decorrência das vantagens esperadas, tem havido um crescente interesse por este campo de pesquisa, resultando no desenvolvimento de processos biotecnológicos como alternativa para substituir a síntese química (LUERCE, 2002).

Compostos de aroma são obtidos industrialmente por dois processos principais: síntese química e extração de fontes naturais. As sínteses químicas geralmente criam altos impactos ambientais por emitirem certa carga de resíduos não-biodegradáveis. Aromas extraídos diretamente de plantas estão sujeitos a instabilidades advindas da sazonalidade, ataque de pragas e efeitos geográficos. Os processos biotecnológicos, por outro lado, em geral não emitem alta carga de resíduos e estão menos sujeitos a

variações sazonais, oferecendo algumas vantagens sobre alguns dos processos existentes para a produção de compostos de aroma (FRANCO, 2004).

Os aromas obtidos através de processos biotecnológicos podem ser produzidos por duas vias: *síntese do novo* e biotransformação. A *síntese do novo* implica na produção de compostos de aroma a partir de microrganismos utilizando meios de cultura simples sem nenhuma adição de substratos especiais. Neste processo a ação metabólica do microrganismo sob o meio de cultura produz uma mistura de vários compostos que são importantes para a formação do aroma do produto; já o segundo refere-se à síntese de um ou vários compostos de aroma pela adição de seus precursores ao meio de cultura, tendo por objetivo a obtenção de um produto principal (BERGER, 2009; BICAS *et al.*, 2010 ).

A idéia de que produtos naturais são em geral saudáveis e de que produtos artificiais são muitas vezes maléficos extremamente difundida hoje, é uma forte motivação para alternativas fermentativas de produção de aromas. Cerca de 84% dos aromas disponíveis no mercado são artificiais, e com o aumento da exigência do consumidor por produtos mais saudáveis e naturais, faz com que a produção de aromas por via biotecnológica torne-se uma alternativa bastante promissora e viável para a indústria. O produto natural tem um elevado valor no mercado, cerca de 10 a 100 vezes maior que os seus similares sintéticos. Por exemplo, a vanilina sintética custa cerca de 15 U\$/Kg, enquanto a mesma substância obtida por fontes naturais custa entre 1200 a 4000 U\$/Kg (SERRA *et al.*, 2005). Além disso, processos biotecnológicos em geral são menos agressivos ao meio ambiente que seus similares sintéticos (CARVALHO, 1999; ROSILLO *et al.*, 1999).

As legislações norte-americana e europeia definem os compostos de aromas naturais como os obtidos por processos físicos (extração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados da natureza, e o composto obtido deve ser idêntico ao já existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como “natural” (SERRA *et al.*, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como aromas naturais as substâncias obtidas exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Entende-se por matérias-primas aromatizantes naturais, os produtos de origem animal

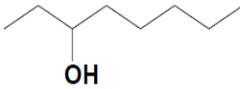
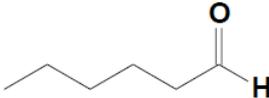
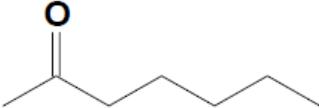
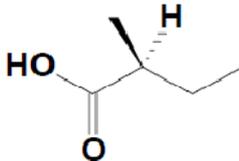
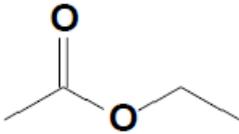
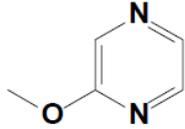
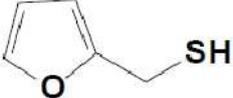
ou vegetal aceitáveis para o consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, em estado natural ou após tratamento adequado como torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático ou outros. Compreendem os óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas e substâncias aromatizantes naturais isoladas (ANVISA, 2007).

A vantagem de se produzir aroma por via biotecnológica é que ele é considerado natural, e com o mercado consumidor cada vez mais exigente e preocupado com a saúde o uso de aditivos naturais nos alimentos é uma forma de agregar valor ao produto (MEDEIROS *et al.*, 2000). Além disso, processos fermentativos afetam menos o meio ambiente. Esta característica é de extrema importância nos dias atuais, devido às maiores preocupações, a nível mundial, com a preservação do meio ambiente.

### **3.2 Compostos de aroma**

De maneira geral, os compostos de aroma produzidos por microrganismos são metabólitos secundários, isto é, não são essenciais para o seu metabolismo (JIANG, 1995), além de geralmente serem gerados até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado a fase estacionária do ciclo de crescimento (TORTORA *et al.*, 2005). Esses compostos apresentam diferentes funções químicas e grupos reativos, como por exemplo: alcoóis, aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres, lactonas, pirazinas, terpenos, compostos sulfurados e outros. A Tabela 1 apresenta algumas classes desses compostos e seus respectivos aromas.

**Tabela 1-** Classe e estrutura de alguns compostos aromáticos e seus respectivos aromas.

Classe	Composto	Estrutura	Aroma Característico
Álcoois	3-octanol		Cogumelo
Aldeídos	hexanal		Fruta não amadurecida
Cetonas	2-heptanona		Queijo <i>blue cheese</i>
Ácidos carboxílicos	(S)-(+)-ácido-2-metilbutanóico		Fruta, doce
Ésteres	Acetato de etila		Éter, conhaque
Lactonas	$\gamma$ -decalactona		Creme de nozes, pêssogo
Pirazinas	2-acetilpirazina		Pipoca
Compostos sulfurados	2-furfurilmetanotiol		Café

Fonte: KUBOTA (2007).

Dentre os compostos aromáticos, os terpenos podem ser entendidos como metabólitos secundários de plantas, que junto com os seus derivados, os terpenóides, formam a mais diversa classe de substâncias na natureza, aplicados em indústrias como compostos de aroma e de fragrâncias. São os principais constituintes dos óleos essenciais e são amplamente utilizados na indústria de sabor. Eles podem ser

incorporados na formulação de alimentos, cosméticos, higiene e produtos domésticos, atuando não apenas como aromatizantes, mas também como agentes antibacterianos (BAKKALI *et al.*, 2007). Grande parte dos terpenos obtidos em culturas microbianas são produzidos por fungos, sendo o *Aspergillus niger* uma das espécies mais estudadas na biotransformação de monoterpenos.

Segundo Torrea *et al.* (2003), os ésteres possuem uma crucial importância nas sensações agradáveis de aroma, sendo considerados compostos extremamente importantes na qualidade sensorial de inúmeros produtos. Os ésteres de acetato, tais como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e 2-feniletil acetato são reconhecidos como compostos importantes no sabor do vinho e outros derivados de uva utilizados em bebidas alcoólicas (LONGO e SANROMÁN, 2006). O 2-fenil acetato pode ser encontrado também na maçã, abacaxi, uva, chá com aroma doce, rosas e mel, assim como a maioria dos ésteres é aplicada como agente flavorizante e odorificante em perfumarias.

Os álcoois primários e secundários são compostos de aroma de grande importância em alimentos. Um dos álcoois mais relevantes relacionados com aroma é o 2-feniletanol, que possui um cheiro semelhante a rosas. Diferentes cepas de leveduras têm sido estudadas para a produção desse álcool. Segundo Janzantti (2004) o conteúdo de álcoois superiores formados durante a fermentação varia de acordo com as condições da fermentação, pela composição do meio (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), pela temperatura, pelo grau de aeração durante a fermentação e especialmente a linhagem da levedura.

### **3.3 2-Feniletanol**

O 2-feniletanol (2-FE) é um álcool superior aromático. Na Tabela 2 estão representadas as principais características físicas e químicas do 2-FE. Devido ao aroma de rosa, ele é usado como ingrediente de perfumaria em uma ampla variedade de produtos cosméticos e alimentos, tais como refrigerantes, biscoitos, chicletes, pudim, entre outros (SENDOVSKI *et al.*, 2010).

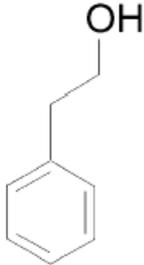
Segundo Maarse *et al.* (2000) estima-se que cerca de 700 Kg de FE é consumido anualmente como um componente de alimentos. Além disso, é considerado como o segundo álcool mais usado em perfumaria e em cosméticos (ESTCHMANN *et al.*,

2004). E é considerado como um aditivo alimentar GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Dessa maneira, este composto possui um considerável interesse industrial, principalmente para certas composições de aroma na matéria-prima, tais como fórmulas com frutas, doces, sorvetes, pudins e goma de mascar (HUANG *et al.*, 2000).

Segundo Hua e Xu (2011) a produção mundial de 2-feniletanol em 2010 foi estimada em aproximadamente 10.000 toneladas, a maioria obtido por síntese química, cuja desvantagem é o custo elevado para a purificação desse composto e a geração de resíduos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Através de processos químicos, o 2-FE pode ser obtido pela reação de Friedel-Craft, usando óxido de etileno com benzeno na presença de quantidades molares de cloreto de alumínio ou pela redução por óxido de estireno utilizando níquel como catalizador e pequenas quantidades de hidróxido de sódio, a baixas temperaturas ou ainda como um subproduto da produção de óxido de propileno (ETSCHMANN *et al.*, 2002).

O aroma de rosas natural pode ser obtido também por fontes naturais. O 2-FE também pode ser obtido por fontes naturais, principalmente de óleos essenciais extraídos de certas flores (por exemplo, rosa). Entretanto, a concentração de 2-FE em flores é muito baixa, e o processo de extração é complicado e dispendioso. A colheita das flores é também influenciada pelas condições climáticas (ETSCHMANN *et al.*, 2002; SCHRADER *et al.*, 2004).

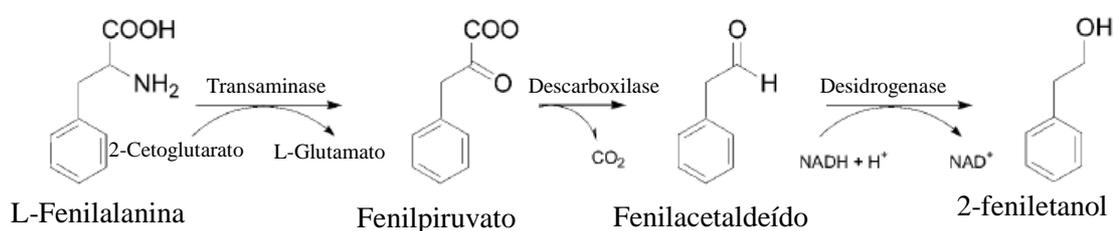
**Tabela 2-** Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol

Propriedades	Descrição
<b>Sinônimos</b>	álcool feniletílico, álcool 2-feniletílico, álcool β-feniletílico, benzil carbinol, β-hidroxi-etil-benzeno.
<b>Fórmula Centesimal</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O
<b>Fórmula espacial</b>	
<b>Coloração</b>	Líquido incolor
<b>Peso molecular</b>	122g/mol
<b>Ponto de ebulição (101,3 Kpa)</b>	219,8°C
<b>Ponto de fusão</b>	-27°C
<b>Densidade à 20°C</b>	1,0202 g/cm <sup>3</sup>
<b>Índice de refração à 20°C</b>	1,5325
<b>Solubilidade</b>	19g/L em água a 20°C, solúveis em álcoois, ésteres, aldeídos, benzil benzoato, óleo mineral, solventes clorados

Fonte: ETSCHMAN *et al.* (2002)

No caso de compostos de aroma naturais presentes em baixas concentrações nas suas fontes naturais, uma boa alternativa para sua extração são os processos biotecnológicos (SCHRADER *et al.*, 2004). Uma abordagem promissora é através da fermentação por leveduras utilizando glicose como fonte de carbono (bioprodução) ou pela adição de L-fenilalanina, seu precursor natural (bioconversão) (WITTMANN *et al.*, 2002). Através da bioconversão a produção do 2-FE acontece pela via de Ehrlich (Figura 1) onde o fenilpiruvato é descarboxilado a fenilacetaldeído, e finalmente, reduzido para 2-feniletanol (ETSCHMANN *et al.*, 2004). Já por bioprodução, muitas

leveduras sintetizam o 2-feniletanol a partir da via do shiquimato ou via do cinamato. Por essa via a eritrose-4-fosfato (ciclo das pentoses) e fosfoenolpiruvato (via glicolítica), são condensados formando o shiquimato, o qual sofre um série de reações catalizadas por enzimas formando o corismato, o mesmo é convertido a prefenato. Este sofre uma desidratação dando origem ao fenilpiruvato. A partir do fenilpiruvato, pode haver uma transmissão com o glutamato, que atua como doador do grupo amino, formando-se L-fenilalanina, ou então o fenilpiruvato segue a via de Ehrlich e é descarboxilado e reduzido até 2-FE (SERP *et al.*, 2003; ETSCHMANN *et al.*, 2002).



**Figura 1-** Via de Ehrlich para a produção de 2-FE

Fonte: ETSCHMANN *et al.* (2002)

Dentre as leveduras, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces lactis*, têm demonstrado resultados promissores na produção de 2-FE (OLIVEIRA, 2010; ETSCHMANN *et al.*, 2003; FABRE *et al.*, 1998; STARK *et al.*, 2002; GARAVAGLIA *et al.*, 2007; HUA *et al.*, 2010; GAO e DAUGULIS, 2009)

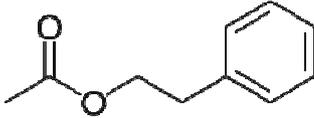
### 3.4 2-Fenetil acetato

O 2-fenetil acetato (2-FEA) é um éster aromático, podendo ser encontrado naturalmente na maçã, abacaxi, uva, chá com aroma doce, rosas e mel. Assim como a maioria dos ésteres é aplicado como agente flavorizante e odorificante em perfumarias, sendo também considerado como um aditivo alimentar GRAS (*Generally Regarded As Safe*).

Na Tabela 3 estão representadas as principais características físicas e químicas do 2-FEA. Apesar das grandes qualidades desse composto de aroma, são poucos os relatos na literatura à respeito de suas aplicações e propriedades, principalmente no

tocante a produção exclusiva desse composto por via biotecnológica. Os microrganismos *Hansenula anomala* (ALBERTAZZI *et al.*, 1994), *Kluyveromyces marxianus* (ADLER *et al.*, 2011), culturas mista de *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora vineae* ou *Saccharomyces cerevisiae* (VIANA *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2011) têm demonstrado eficiência para a produção deste composto.

**Tabela 3-** Propriedades físicas e químicas do 2-fenetil acetato

Propriedades	Descrição
<b>Sinônimos</b>	fenetilacetato, acetato de fenetila, acetato de 2-fenetila, 2-fenil-etilacetato, acetato de β-fenil-etil, benzilcarbinilacetato.
<b>Fórmula Centesimal</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
<b>Fórmula espacial</b>	
<b>Coloração</b>	Líquido incolor
<b>Peso molecular</b>	164,2g/mol
<b>Ponto de ebulição (101,3 Kpa)</b>	238,5°C
<b>Ponto de fusão</b>	-31°C
<b>Densidade à 20°C</b>	1,032g/cm <sup>3</sup>
<b>Índice de refração à 20°C</b>	1,498
<b>Solubilidade</b>	Insolúvel em água, solúvel em etanol, éter e outros solventes orgânicos

Fonte: [http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl\\_acetate/12/ou/a4/](http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl_acetate/12/ou/a4/)

### 3.5 Produção de aromas através de processos fermentativos

A produção de compostos de aroma por processos biotecnológicos pode ser realizada por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES). Na FS emprega um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis; Já a FES,

fundamenta-se na utilização de substratos sólidos com baixas porcentagens de água em sua composição.

A literatura tem relatado ao longo dos anos alguns trabalhos relacionados a produção de aromas por processos fermentativos conforme apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4-** Produção de aromas por processos fermentativos

Compostos de aroma	Fermentação	Meio	Microrganismo	Referência
Álcool isoamílico, 2-feniletanol, ácido isobutírico, 2-feniletil acetato 2-feniletil isobutirato e 3-hidroxi-2-butanona, Isobutanol	Submersa	Sintético	<i>Kluyveromyces lactis</i>	JIANG, 1995
Álcool isoamílico, 2-feniletanol, ácido isobutírico	Submersa	Sintético	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	FABRE <i>et al.</i> , 1995
Pentil- $\alpha$ -pirona	Estado sólido e submersa	Sintético	<i>Trichoderma harzianum</i>	SARHY-BAGNON <i>et al.</i> , 2000
2-feniletanol e 2-fenetil acetato.	Submersa	Sintético	<i>Pichia fermentans</i>	HUANG <i>et al.</i> , 2000
Acetaldeído, etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de propila, isobutirato de etila 2-hoxanone, 2- hexanol.	Estado sólido	Polpa cítrica suplementada farelo de soja e melação de cana de açúcar	<i>Ceratocystis fimbriata.</i>	ROSSI <i>et al.</i> , 2009
2-fenetil acetato	Submersa	Vinho	<i>Hanseniaspora osmophila</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VIANA <i>et al.</i> , 2009
Etanol, acetato de isoamila, álcool isoamílico, octanoato de etila, 2-fenetil acetato, 2-feniletanol	Submersa	Caldo de mamão	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saturatedus</i> <i>Williopsis</i>	LEE, <i>et al.</i> , 2010

### 3.6 Utilização de Resíduos Agroindustriais para a Produção de Aromas

Recentemente, o aproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido muito incentivado, já que podem contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica desses resíduos tornando-o um subproduto e deste modo agregando valor ao processo de agroindustrialização.

Uma das alternativas de valorização de resíduos seria a utilização como substrato para crescimento microbiano, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano.

Neste contexto os resíduos provenientes do processamento de polpas de frutas merece destaque tendo em vista que a região Nordeste se destaca por produzir uma grande variedade de frutos tropicais, nativos e exóticos, com boas perspectivas para exploração econômica, em decorrência de suas condições favoráveis, os quais possuem sementes e cascas que são, muitas vezes, descartadas gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais. Segundo Costa *et al.* (2007) as indústrias sofrem um desperdício ao redor de 30 a 40% da produção nesta área.

No estado de Sergipe, dentre as frutas produzidas, há um grande destaque para a acerola, a mangaba e a graviola, sendo estas bastante utilizadas para a produção de polpas e sucos industrializados. Aquino *et al.* (2010) reportaram para o resíduo do processamento da polpa de acerola 8,60% para umidade, 3,03% para cinzas, 0,52% para lipídeos, 8,88% para proteína bruta e 24,33% para açúcar redutores. Araújo *et al.* (2010) encontraram para a farinha proveniente do resíduo do processamento de polpa de mangaba 4,3% de umidade, 2,13% de cinzas, 23,5% de lipídeos e 15% de proteínas. Sousa *et al.* (2011) obtiveram para o resíduo de graviola 83,16% de umidade, 0,48% de cinzas, 1,09% de proteínas, 2,28% de lipídeos e 12,99% de carboidratos totais.

Na literatura consultada ainda não existem relatos sobre o aproveitamento dos resíduos dessas frutas para produção de compostos de aroma através de processos fermentativos. Os estudos, em geral, são relacionados a obtenção de aromas a partir de polpas, sucos ou da fruta *in natura*, como por exemplo, Pino e Marbot (2001) os quais estudaram os compostos voláteis da acerola e encontraram ácido hexadecanóico, furfural, 3-metil-3-butenol e limoneno. Nogueira e Sampaio (2006) estudaram os

componentes voláteis da mangaba do estado de Sergipe e detectaram 1-octen-3-ol, óxido de (Z)-linalol, óxido de (E)-linalol, linalol, 2-feniletanol, geraniol, hexadecanal e octadecanol nos frutos verdes, propanoate etílico, n-propil acetato, 3-metil-3-buten-1-ol, acetato de 2-metil propil, furfural, (Z)-3-hexenol, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-il acetato, acetato de n-hexila, óxido de (Z)-linalol óxido de (E)-linalol linalol, 2-feniletanol e  $\alpha$ -terpineol nos frutos em estágio médio de maturação e 3-hidroxi-2-butanona, 3-metil-1-butanol, furfural, acetato de 3-metil-1-butanol e acetato de 3-metil-3-buten-1-il nos frutos maduros. Cheong *et al.* (2010) estudaram o aroma dos compostos liberados a partir da graviola. Um total de 35 compostos voláteis foram detectados, compreendendo 19 ésteres, 6 álcoois, 3 terpenos, 2 ácidos, 2 compostos aromáticos, 2 cetonas e 1 aldeído. Pino *et al.* (2002) detectaram na graviola acetato de 3-metil-2-butenila (16,7%), octanoato de metila (15,6%), 3-metil-3-buten-1-ol (9,6%) e hexanoato de metila (7,5%).

Por outro lado, outros tipos de resíduos agroindustriais têm sido utilizados para a produção de aromas. Christen *et al.* (1997) relataram que o fungo *Ceratocystis fimbriata* foi capaz de produzir aroma frutal a partir da fermentação de bagaço de cana suplementado com meio sintético contendo glicose e, quando o meio foi suplementado com leucina ou valina, um forte aroma de banana foi evidenciada. Resultados semelhantes foram obtidos quando outros resíduos agroindustriais (farelo de trigo e bagaço de mandioca) foram utilizados.

Bramorski *et al.* (1998) estudaram a versatilidade de *Ceratocystis fimbriata* de produzir aromas naturais a partir da fermentação de meios contendo diferentes proporções de bagaço de mandioca, bagaço de maçã, amaranto e soja. Todos os meios contendo bagaço de mandioca, bagaço de maçã e soja em sua composição proporcionaram um forte aroma frutal, enquanto, o meio de amaranto produziu um agradável aroma de abacaxi. A produção de aroma foi dependente do crescimento microbiano, visto que a máxima intensidade do aroma foi detectada poucas horas antes ou depois da atividade respiratória máxima. Foram detectados dezesseis compostos voláteis pela cromatografia gasosa, sendo identificados do total de 15 compostos: 1 ácido, 6 álcoois, 1 aldeído, 2 cetonas e 5 ésteres.

Soares *et al.* (2000) reportaram a produção de aroma frutal por *Ceratocystis fimbriata* utilizando casca de café e glicose (nas concentrações 20, 35 e 46%). Meios

contendo 20 e 30% de glicose desenvolveram um forte aroma de abacaxi, resultando na produção de 6,58 e 5,34  $\mu\text{mol/L}$  por grama do total de voláteis, respectivamente. No meio com 46% de glicose foi detectado um fraco odor de banana com baixa produção de voláteis. A adição de leucina ao meio proporcionou aumento na produção de acetato de etila e acetato de isoamila sendo detectado um forte cheiro de banana.

Medeiros *et al.* (2000) estudaram a fermentação de cinco resíduos agroindustriais (bagaço de maçã, bagaço de mandioca, bagaço de cana de açúcar, farelo de sementes de girassol e de palmas) visando a produção de compostos de aroma pela levedura *Kluyveromyces marxianus* por fermentação em estado sólido. O bagaço de mandioca e o farelo de palma foram os que produziram aromas mais fortes, sendo os principais compostos obtidos acetato de etila, etanol e acetaldeído. Os ésteres produzidos foram responsáveis pelo aroma frutal em ambos os casos.

Plata *et al.* (2003) estudaram a produção de acetato de etila e acetato de isoamila por sete leveduras e as compararam em termos de sua capacidade de produzir dois ésteres em meio sintético. *Kloeckera apiculata* apresentou maior capacidade para a formação de acetato. As leveduras *Hansenula subpelliculosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* produziram níveis intermediários e *Pichia membranaefaciens* e *Candida guilliermondii* produziram níveis baixos dos dois ésteres medidos neste estudo.

Damasceno *et al.* (2003) avaliaram a produção de compostos voláteis por *Geotrichum fragrans* usando manipueira como substrato. Os compostos voláteis produzidos após 72 horas de fermentação foram identificados como: 1-butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 2-metil-1-butanol, 1-3 butanodiol, fenil etanol, acetato de etila, propionato, 2-metil-etil propionato e 2-metil-propanóico. A suplementação do substrato com açúcar e nitrogênio não apresentou efeito sobre os perfis qualitativos dos compostos voláteis produzidos.

Pereira (2006) estudou a produção de metabólitos voláteis frutais por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação submersa em meio à base de melaço de soja. Foram identificados entre os compostos voláteis os álcoois: 2-octanol e etanol, acetaldeído e os ésteres: acetato de etila, propionato de isobutila, propionato de etila, acetato de isobutila, acetato de isoamila, acetato de butila, butirato de etila e isobutirato de etila. A produção do acetato de isoamila atingiu 2068  $\mu\text{mol/L/mL}$ .

Ramos *et al.* (2008) produziram o composto aromático 6-pentil- $\alpha$ -pirona através da fermentação em estado sólido de pó de casca de coco verde utilizando o microrganismo *Trichoderma harzianum*.

### 3.7 A levedura *Kluyveromyces marxianus*

Dentre os microrganismos, as leveduras são as mais utilizadas na produção de aromas devido à ampla quantidade de informações acumulada pela pesquisa de cepas para produção de vinhos e pela identificação de aromas gerados por essas cepas nos produtos fermentados. Particularmente a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem se destacado na produção de diversos compostos de aromas, tais como acetato de isoamila, 2-feniletanol (FABRE *et al.*, 1995; WITTMANN *et al.*, 2002) O gênero *Kluyveromyces* possui um grande interesse industrial, devido ao seu metabolismo, suas características de crescimento, e por ser reconhecida pelo GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Na Tabela 5 está apresentada a sua classificação taxonômica.

**Tabela 5** - Classificação taxonômica da levedura *K. marxianus*

Reino	Fungi
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem	<i>Saccharomycetales</i>
Família	<i>Saccharomycetaceae</i>
Gênero	<i>Kluyveromyces</i>
Espécie	<i>K. marxianus</i>

Fonte: [http://zipcodezoo.com/Fungi/K/Kluyveromyces\\_marxianus\\_var.\\_lactis/](http://zipcodezoo.com/Fungi/K/Kluyveromyces_marxianus_var._lactis/)

A *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo unicelular, nucleado, que não possui motilidade, pode se reproduzir sexualmente (conjugação) ou assexualmente (fissão) apresenta uma forma ovóide e, tem a capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, cresce em uma ampla faixa de temperatura (30 a 45°C), tem pH ótimo de 5,0 e não é patogênica (ROUWENHORST, 1987, BELÉM *et al.*, 1998).

Esta levedura tem sido isolada de ambientes diversos, o que resulta em alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intra-específico. Como

conseqüência disto, diferentes aplicações biotecnológicas têm sido relatadas com esse microrganismo, como: a produção de etanol, proteína celular, enzimas, em aplicações ambientais, produção de compostos de aroma (ODA e NAKAMURA, 2009; SCHULTZ *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2003; HANG *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2000).

### **3.8 Análise dos compostos de aroma**

O conhecimento dos compostos importantes que contribuem para o sabor característico do produto permite o desenvolvimento de novas formulações de aroma, bem como para monitorar a qualidade do produto. Basicamente quatro etapas estão envolvidas na análise de aromas: isolamento dos compostos voláteis; separação dos compostos voláteis por cromatografia; identificação por análise sensorial e identificação e quantificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (SHIREY, 1994).

Atualmente, diferentes técnicas vêm sendo empregadas para o isolamento dos compostos voláteis de aroma, tais como: técnicas de *headspace*, extração líquido-líquido, microextração em fase sólida (SPME), entre outras.

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração e concentração dos compostos voláteis de amostras sem utilização de solventes, minimizando a geração de resíduos e a exposição ocupacional, constituindo uma técnica simples, rápida e de fácil aplicação (KOMATSU e VAZ, 2004). Desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990) é empregada uma fibra de sílica fundida de comprimento entre 1 a 2 cm, recoberta com uma fase líquida similar à fase estacionária de uma coluna capilar. A fibra recoberta é imersa diretamente nas amostras aquosas, posteriormente inserida no injetor do cromatógrafo gasoso onde os compostos são liberados por dessorção térmica. Apesar das inúmeras vantagens, é uma técnica muito dependente das condições do experimento e da amostra, o que é refletido na sensibilidade e reprodutibilidade do método analítico (YANG e PEPPARD, 1994).

Na literatura, raras são as informações e estudos que utiliza a técnica de SPME para isolamento de compostos de aromas produzidos por fermentação. Valduga (2005) avaliou as melhores condições de extração de gama-decalactona por SPME através de uma fibra PDMS. As condições que resultaram a máxima adsorção do analito na fibra

extratora foram: temperatura de 60°C, tempo de extração de 30 minutos, sem agitação, volume da amostra de 3,5 mL e solução salina de KCl saturada (1:10, v/v).

Ramos *et al.* (2008) estudaram as melhores condições da técnica de SPME para a quantificação por cromatografia gasosa de 6-pentil- $\alpha$ -pirona produzida pelo fungo *Trichoderma harzianum* a partir do pó da casca de coco verde. As melhores respostas foram obtidas com a temperatura de 79 °C e tempo de extração de 29 min.

A mistura complexa de compostos voláteis, alcançada através da etapa de isolamento, requer para a sua separação a aplicação de metodologias ou técnicas bastante seletivas, sensíveis e eficientes. Assim sendo, a separação dos compostos de aroma tem sido feita, recentemente, através de cromatografia gasosa de alta eficiência, com o uso de coluna capilar. A união do cromatógrafo gasoso (CG) com o espectrômetro de massa (EM) representa uma ferramenta eficaz na separação e na identificação de compostos provenientes dessas misturas complexas, sendo que estas técnicas são muito convenientes e úteis em análise de aromas (VIEIRA, 2006).

Para a identificação desses compostos, os espectros obtidos através do espectrômetro de massa, são comparados com os espectros de compostos puros de bibliotecas disponíveis comercialmente, como é o caso da *National Institute of Standards and Technology* (NIST) ou ainda pela injeção de padrão puro, sendo a identificação mais confiável, pois os espectros são gerados em um mesmo instrumento (ACREE e TERANISHI, 1993).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesta seção são apresentados os principais materiais e metodologia utilizada neste trabalho para a produção de compostos de aroma, bem como os métodos analíticos empregados no processo fermentativo e na identificação dos compostos.

Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas (LAF) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PROCTA) e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Sergipe, na cidade de São Cristóvão-SE.

### **4.1 Materiais**

Os materiais empregados são especificados a seguir:

#### **4.1.1 Microrganismo**

O microrganismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* (IOC 4404), adquirido da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Trimestralmente a cepa de *Kluyveromyces marxianus* era repicada em meio Sabourand e incubada em estufa bacteriológica à temperatura de 30°C por 24 horas. Após o crescimento, era adicionado glicerol estéril ao meio, procedendo-se o seu fracionamento em microtubos estéreis para armazenamento em ultra freezer a -80 °C.

#### **4.1.2 Resíduos**

Os resíduos agroindustriais de acerola, mangaba, e graviola foram fornecidos pela indústria de polpa do estado de Sergipe POMAR, localizada na cidade de Aracaju-SE.

Na primeira parte do estudo, os resíduos das frutas (acerola, graviola e mangaba) foram secados em secador de bandeja com circulação de ar à temperatura de 40°C por 24 horas. A seguir, os resíduos foram triturados em liquidificador industrial, peneirados,

esterilizados a 121°C por 15 min e armazenados em recipientes de vidro herméticos, à temperatura ambiente.

Para a segunda etapa foi utilizado o resíduo *in natura de* graviola, o qual foi triturado em liquidificador industrial e esterilizado à 121°C por 15 min.

## **4.2 Metodologia Experimental**

Os procedimentos experimentais para a produção de aromas serão apresentados nesta seção.

### **4.2.1. Experimentos Fermentativos**

Inicialmente preparou-se o inóculo, transferindo-se três alçadas de células da cultura estoque para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido sabouraud previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Os frascos foram incubados em *shaker* com agitação de 150 rpm em temperatura controlada à 30 °C pelo período de 48 horas.

O número de células de leveduras presentes no inóculo foi determinado através câmara de Neubauer, ajustando-se os valores até obter  $10^8$  células/mL.

Para os experimentos fermentativos utilizou-se frascos âmbar de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo em pH 5,0 com a seguinte composição: 5g da farinha do resíduo (acerola, graviola ou mangaba), 0,5g de glicose e 0,025g de extrato de levedura e 10% do volume de inóculo contendo concentração de  $10^8$  células de levedura/mL. Os frascos foram colocados sob agitação em “shaker” a 75 rpm e à temperatura de 30°C durante 5 dias. A cada 24 h de fermentação retirou-se um frasco para a realização da análise sensorial e determinação dos compostos de aroma.

### **4.2.2 Seleção do resíduo potencial produtor de aromas**

A primeira etapa do trabalho foi avaliar a produção de aromas por fermentação submersa empregando os resíduos de acerola, graviola e mangaba. A seleção do resíduo com potencialidade para a produção de aromas foi realizada através da análise sensorial dos fermentados obtidos.

#### **4.2.2.1. Análise sensorial dos fermentados**

Os fermentados dos resíduos foram analisados sensorialmente quanto a produção de aromas a cada 24 h durante 5 dias de fermentação. Foi utilizado um painel de 12 provadores selecionados e treinados. Solicitou-se aos provadores a descrição dos aromas e das intensidades percebidas em uma ficha sensorial (anexo 1) apropriada contendo uma escala de intensidade de aroma. Antes de cada avaliação, era feita uma comparação com um frasco controle não inoculado.

#### **4.2.3 Delineamento Experimental para determinação das condições**

A partir dos experimentos realizados no item 4.2.2.1 o resíduo que proporcionou a maior produção de compostos de aroma foi selecionado para a realização dos estudos de otimização do processo para a obtenção dos compostos 2- feniletanol e 2-fenetil acetato.

Inicialmente realizou-se um delineamento experimental para avaliar a influência dos parâmetros glicose, extrato de levedura, pH, agitação, quantidade de resíduo e quantidade de leveduras/mL no processo de produção dos compostos.

Foram realizados experimentos fermentativos em frascos âmbar de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e 10% de volume de inóculo, à temperatura de 30°C durante 5 dias de acordo com a matriz descrita na Tabela 6 e 7. As concentrações de glicose e extrato de levedura no meio, pH, agitação, quantidade de resíduo e quantidade de leveduras/mL no inóculo foram variadas de acordo com a Tabela 6. Na Tabela 7 é representado o delineamento experimental com todas as variáveis codificadas. A cada 24 h retirou-se um frasco de fermentado para a determinação dos compostos de aroma através de análise cromatográfica e espectrometria de massa conforme será descrito no item 4.3.3. A variável resposta do planejamento foi a intensidade em área, dos compostos 2-feniletanol e 2-fenetil acetato.

**Tabelas 6-** Variáveis reais e codificadas do delineamento experimental.

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	1
Glicose (g/L)	$(x_1)$	0	10	20
Extrato de Levedura (g/L)	$(x_2)$	0	0,5	1
pH	$(x_3)$	3,5	5,0	6,5
Agitação (rpm)	$(x_4)$	0	75	150
Resíduo (g/L)	$(x_5)$	50	100	150
Inóculo	$(x_6)$	$10^6$	$10^8$	$10^{10}$

**Tabelas 7 -** Experimentos utilizados no delineamento experimental para otimização dos compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato.

Ensaio	Glicose ( $x_1$ )	Ext. Lev. ( $x_2$ )	pH ( $x_3$ )	Agitação ( $x_4$ )	Resíduo ( $x_5$ )	Inóculo ( $x_6$ )
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0

#### 4.2.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Para avaliar a influência dos parâmetros: concentração de glicose ( $x_1$ ), concentração de extrato de levedura ( $x_2$ ) e agitação ( $x_3$ ) no processo, foram realizados experimentos fermentativos de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^3$  com 6

pontos axiais e 3 pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2005), tendo como variável resposta a intensidade dos picos correspondentes a produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e 2-fenetil acetato. Os valores reais e codificados das variáveis independentes encontram-se na Tabela 8 e na Tabela 9 estão representadas todas as variáveis codificadas do planejamento.

As fermentações foram realizadas em frascos âmbar de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, 10% de volume de inóculo contendo  $10^8$  leveduras/mL, 100g/L de resíduo, pH em torno de 5,0 e temperatura de 30°C. A cinética de produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e 2-fenetil acetato foi acompanhada em cada ensaio através da retirada de um frasco de fermentado a cada 24 h de fermentação. Os compostos de aroma foram isolados e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa conforme será descrito no item 4.3.3.

Na condição onde obteve-se maior produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e 2-fenetil acetato foi determinada a cinética de consumo de glicose através da determinação de açúcares redutores (conforme o item 4.3.1.4).

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial foram analisados pelo programa STATISTIC 8.0.

**Tabela 8** – Valores reais e independentes utilizados para otimização da produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	+1,68
Glicose (g/L)	( $x_1$ )	10	18	30	42	50
Extrato de Levedura (g/L)	( $x_2$ )	0	2	5	8	10
Agitação (rpm)	( $x_3$ )	75	90	112	135	150

**Tabela 9-** Planejamento fatorial completo para a produção de compostos de aroma 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato.

Ensaio	Glicose ( $x_1$ )	Extrato de levedura ( $x_2$ )	Agitação ( $x_3$ )
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-,168
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

### 4.3 Métodos Analíticos

Os métodos de análises serão descritos de forma sucinta neste item.

#### 4.3.1 Caracterização físico-química dos resíduos

As análises físico-químicas descritas nos tópicos seguintes foram realizadas para a farinha dos resíduos de graviola, acerola e mangaba como também para o resíduo *in natura* de graviola. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.3.1.1 pH**

O pH foi medido em potenciômetro da marca Tecnopon, modelo MPA-210, calibrando-se o potenciômetro com as soluções tampão (pH 4,0 e 7,0) a 20°C, segundo o método 017-IV do Instituto Adolf Lutz (2008). A análise consistiu em homogeneizar 5g da amostra com o auxílio de 50 mL de água até a completa dissolução, e realizar a leitura do pH, após a estabilização do valor.

#### **4.3.1.2 Sólidos Solúveis Totais**

Os sólidos solúveis totais (SST) foram determinados por meio do refratômetro de bancada da marca Abbé, com correção de temperatura por meio de tabela do método 010-IV do Instituto Adolf Lutz (2008). Transferiu-se de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro e realizou-se a leitura. Os SST foram expressos em °Brix.

#### **4.3.1.3 Acidez total titulável**

A acidez total foi determinada por titulometria, titulando 10 g da amostra diluída em 100 ml de água, acrescida de 3 gotas do indicador fenolftaleína a 1% com solução padronizada de NaOH 0,1 N. Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico, segundo o método 017-IV do Instituto Adolf Lutz (2008).

#### **4.3.1.4 Açúcares Redutores**

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico, usualmente conhecido como método do DNS descrito por Miller (1959), com algumas adaptações. Este método baseia-se no fato de, na presença de açúcares redutores, o ácido 3,5-dinitrossalicílico ser reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, com formação de um complexo acastanhado que pode ser doseado colorimetricamente a 540 nm.

Para esta determinação, cinco mililitros de amostras, do fermentado separado por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, foram transferidos para tubos de ensaios e adicionados 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 N. A solução foi mantida em banho fervente por 20 minutos, resfriado e, posteriormente neutralizada com NaOH 10%. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e filtradas para um balão, completando o volume com água destilada até 50 mL.

Após completar o balão, uma alíquota de 500µL foi transferido para um tubos de ensaio contendo 500µL de reagente de DNS. Os tubos contendo as amostras foram mantidos em água fervente por cinco minutos e resfriados. Após a adição de 5 mL de água destilada a absorbância foi obtida a 540 nm em espectrofotômetro. O branco foi realizado da mesma forma, apenas substituindo a amostra por água destilada.

Para converter os valores obtidos para uma concentração de açúcares expressa em gramas por litro (g/L), uma curva de glicose foi utilizada com padrão.

#### **4.3.1.5 Umidade**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico de volatilização, por secagem direta em estufa a 105°C, de acordo com o método 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se 2g da amostra em cápsula de porcelana previamente tarada e aqueceu-se durante 3 horas com posterior resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente e pesagem. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante. A umidade foi expressa em porcentagem (%).

#### **4.3.1.6 Proteínas**

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl, segundo método 036/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008), o qual realiza a determinação do teor de nitrogênio presente na amostra. A amostra foi aquecida com ácido sulfúrico juntamente com Se e Cu, estes utilizados como catalizadores para a digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. Adicionou-se NaOH concentrado a 40%, sendo aquecido para a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido

bórico, formando borato de amônia que foi dosado com HCl padronizado. O fator de conversão foi de 6,25 e o resultado expresso em porcentagem (%).

#### **4.3.1.7 Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado pela incineração da amostra em método gravimétrico, em que o material foi submetido a aquecimento a 550°C até a formação de um resíduo branco ou cinza claro, segundo o método 018/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) e o resultado foi expresso em porcentagem (%).

#### **4.3.1.8 Lipídios**

A fração lipídica das amostras foi extraída com solvente orgânico (hexano) em aparelho Soxhlet, o qual extraiu os lipídios livres (triglicerídeos e ácidos graxos livres) em um processo gravimétrico, baseado na perda de peso da amostra submetida à extração com o solvente, segundo o método 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). O resultado final foi expresso em porcentagem (%).

#### **4.3.1.9 Fibras**

O teor de fibra bruta foi determinado segundo o método descrito por Ranganna (1979), baseado na digestão ácida seguida por uma digestão alcalina do material seco desengordurado, e o resultado expresso em porcentagem (%).

#### **4.3.1.10 Pectina**

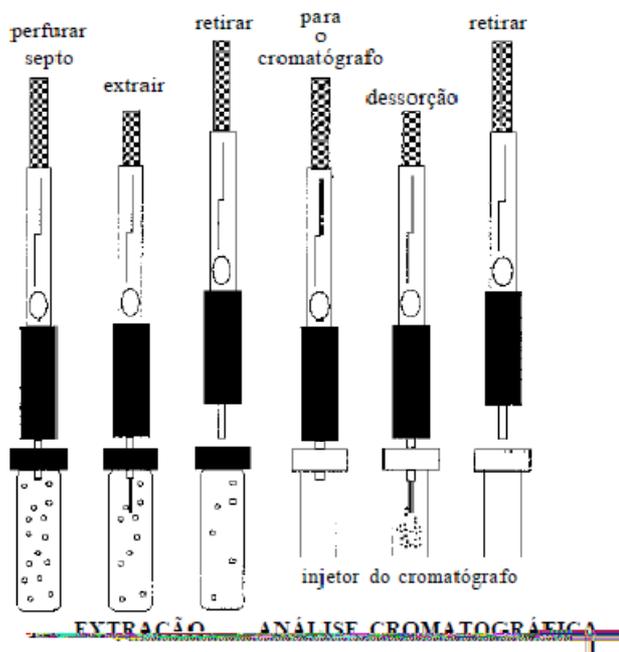
O teor de pectina foi determinado de acordo com o método proposto por Ranganna (1977) no qual a pectina extraída do material vegetal foi saponificada com substâncias alcalinas e precipitada como pectato de cálcio de uma solução ácida pela adição de cloreto de cálcio. O pectato de cálcio precipitado foi lavado até que esteja isento de cloreto, seco e pesado. Os resultados foram expressos em % de pectato de cálcio.

### 4.3.2 Isolamento dos compostos de aroma

Os compostos de aromas presentes nos fermentados foram extraídos utilizando a técnica analítica de SPME (BICCHI *et. al.*, 2002), como mostrado na Figura 2.

Para os experimentos de seleção do resíduo descritos no item 4.2.2 e do delineamento experimental foi empregada a fibra de revestimento misto CARBOXEN-PDMS (Supelco) (75µm de espessura de filme e 10 mm de comprimento) e para os experimentos do planejamento fatorial completo foi utilizada a fibra PEG (marca Supelco).

Os fermentados foram colocados em banho-maria sob agitação magnética por 15 min (tempo de equilíbrio). Em seguida, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da solução para adsorção dos analitos por 30 min. Após o término do tempo de exposição da fibra, a mesma foi removida e, em seguida, introduzida no injetor do cromatográfico para dessorção térmica dos analitos por 10 min (CHEONG *et al.*, 2010). A temperatura utilizada foi de 40°C e o pH utilizado foi o pH de cada amostra.



**Figura 2-** Etapas da extração de compostos de aroma com a técnica SPME.  
Fonte: Valente e Augusto (2000)

### 4.3.3 Análises cromatográficas

Os compostos de aromas foram analisados em cromatográfico gasoso marca VARIAN (modelo Saturn 4000) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de armadilha de íons (MS). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,0 mL/min. O injetor utilizado foi do tipo *split/splitless*, empregado no modo *splitless* com uma temperatura de 220°C. Os compostos foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária polar de polietileno glicol (CP-Wax52CB) de 30m de comprimento, 0,25mm diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme.

Para os fermentados obtidos dos experimentos de seleção do resíduo e do delineamento experimental, utilizou-se a temperatura inicial da coluna de 30°C por 3 min., aumentando-se 2°C por min até atingir 120°C e em seguida 2°C por min até atingir 250°C, totalizando 114 min de corrida cromatográfica. Para os fermentados obtidos do planejamento fatorial completo utilizou-se temperatura inicial da coluna de 35°C por 2 min., e aumentando-se 10°C por min. até atingir 100°C e em seguida 3°C por min. até atingir 250°C, totalizando 59,50 min.

### 4.3.4 Identificação

A identificação dos compostos de aroma foi realizada pela comparação dos espectros de massas dos compostos das amostras com o banco de dados “NIST” (*National Institute of Standards & Technology*) contendo aproximadamente um total de 150.000 espectros de referência e pela comparação do índice de retenção linear (IRL) dos compostos com os de artigos da literatura e *databases* LRI & Odour (2011), calculados com base nos tempos de retenção de uma série de n-alcenos (diversas misturas de C8 – C30, C8 – C40 e C8 – C17) sob condições analíticas idênticas.

O índice de retenção linear (ILR) foi calculado baseado no tempo de retenção dos padrões de alcanos autênticos versus o número de átomos de carbonos dos respectivos padrões de alcanos, multiplicado por 100 (Equação 1).

$$ILR = \left[ \frac{t_R - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: R = Tempo de retenção para o composto X;

n = Número de carbonos do n-alceno eluindo antes;

n+1 = Número de carbonos do n-alceno que elui depois.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química dos resíduos de processamento de polpas de frutas

A produção de compostos de aroma pode ser influenciada pela presença de nutrientes nos substratos. Sendo assim, para caracterização das matérias-primas utilizadas nos experimentos, determinou-se a composição centesimal dos resíduos de acerola, mangaba e graviola previamente secos à 40°C e do resíduo de graviola *in natura* (Tabela 10). Os resíduos foram triturados para se obter partículas menores com o intuito de facilitar a transferência de nutrientes para os microrganismos, uma vez que, o tamanho das partículas no meio, interfere no processo fermentativo, afetando a transferência de calor e massa (SILVA *et al.*, 2002).

**Tabela 10** - Composição centesimal dos resíduos de acerola, mangaba e graviola

Parâmetros	Resíduo			
	Acerola	Mangaba	Graviola	Graviola <i>in natura</i> *
Umidade (%)	8,97±0,37	6,03±0,17	6,77±0,19	76,43±0,89
Cinzas (%)	0,97±0,00	0,98±0,02	0,98±0,00	0,68±0,02
pH	3,23±0,01	4,03± 0,01	4,13±0,02	3,71±0,01
Acidez (%)	15,00±0,06	11,05±1,23	9,10±1,13	7,09±0,35
°Brix	2,17±0,14	1,08±0,14	1,25±0,00	3,80±0,00
Lipídios (%)	13,57±0,42	23,87±0,30	14,64±0,32	1,40±0,079
Fibras (%)	25,39±1,23	31,73±1,06	31,38±1,35	16,98±0,21
Proteínas (%)	6,86±0,10	9,95±0,02	10,78±1,09	6,40±0,10
Açúcar redutor (% glicose)	16,13±0,36	4,81±0,02	7,03±0,13	4,16±0,02
Pectina (%)	5,66 ±0,01	1,23 ±0,02	8,15±0,01	1,41±0,06

\*Resíduo de graviola *in natura* – não submetido ao processo de secagem

Em relação ao resíduo de acerola, os valores de umidade (8,97%) e lipídeos (13,57%) foram maiores do que aos obtidos por Abud e Narain (2009) (umidade de 7,02% e lipídeos de 5,23%); o teor de cinzas (0,97%) foi maior do que o obtido por Sousa *et al.* (2011) (0,55%) e os teores de proteínas (6,86%) e açúcares redutores

(16,13%) foram menores do que os reportados por Aquino *et al.* (2010) (teor de proteínas de 8,88% e açúcares redutores de 24,33%).

Para a farinha do resíduo de mangaba, foram encontrados valores de 6,03%; 0,98%; 23,87%; 9,95% e 11,05% para umidade, cinzas, lipídios, proteína e acidez, respectivamente. Araújo *et al.* (2010) obtiveram valores de umidade 4,30%, cinzas 2,13%, lipídeos 23,50%, proteínas 15,0% e acidez total de 28,40%. Provavelmente, essas diferenças sejam devido às diferenças no tratamento do resíduo para as análises, tendo em vista que Araújo *et al.* (2010) secaram o resíduo ao sol, e em seguida secaram em secador à temperatura de 60 °C durante 8 h e esterilizaram a 121°C durante 15 min.

O resíduo graviola *in natura* apresentou teor de umidade (76,43%) menor do que o obtido por Sousa *et al.* (2011) (83,16%). O teor de proteínas do resíduo de graviola (10,78%) foi similar ao obtido por Ribeiro *et al.* (2008) (10,70%). Os valores de pH para o resíduo de graviola (4,43) e de graviola *in natura* (3,71) foram próximos ao obtido (3,47) por Sacramento *et al.* (2003). O teor de lipídios (14,64%) encontrado na farinha do resíduo foi maior do que o obtido no resíduo *in natura* (1,40%), este por sua vez foi próximo ao obtido por Sousa *et al.* (2011) (2,28%).

Devido ao fato dos resíduos terem apresentado baixo teor de açúcares redutores e de proteínas, o meio de cultivo foi suplementado com glicose e extrato de levedura para favorecer o crescimento microbiano, sendo variadas as concentrações destes nutrientes no processo. O pH dos resíduos sendo abaixo de 4,0 foi corrigido para 5,0, sendo considerado o ótimo pH da levedura.

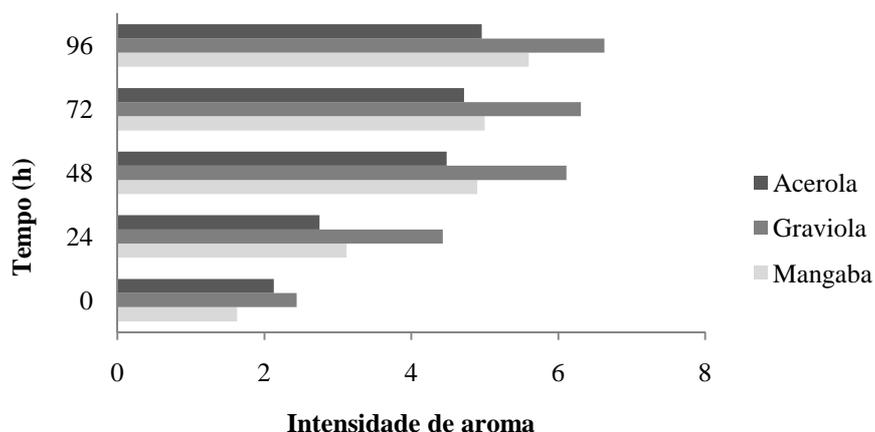
## **5.2 Seleção dos resíduos potenciais produtores de aromas**

### **5.2.1 Análise sensorial**

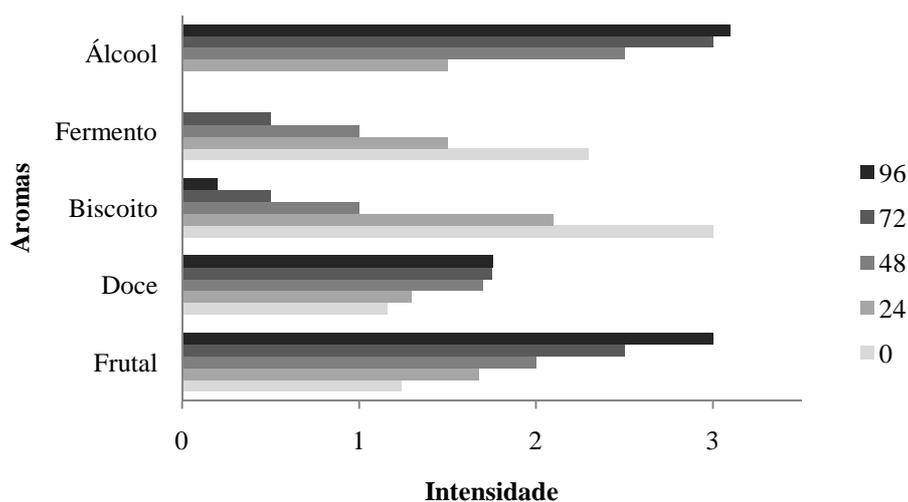
Os fermentados dos resíduos de graviola, acerola e mangaba foram analisados sensorialmente quanto à produção de aromas a cada 24 h de fermentação durante 5 dias. Foi observado que a intensidade de aromas aumentou até 48 h, mantendo-se estável até 96 h de fermentação para todos os resíduos (Figura 3). O fermentado com resíduo de graviola foi o que apresentou maior intensidade de aromas em todos os tempos

analisados, sendo, portanto este resíduo selecionado para a realização dos experimentos subsequentes.

Para o resíduo de graviola os provadores descreveram a intensidade dos aromas como frutal de abacaxi, acerola, ameixa, laranja, doce, biscoito, fermento e álcool (Figura 4). Observou-se que a intensidade dos aromas frutal e álcool foram crescentes ao longo do tempo de fermentação, enquanto que os aromas de biscoito e fermento tiveram um aumento até 24 h e em seguida diminuíram com o tempo.



**Figura 3** – Análise sensorial ao longo da fermentação das farinhas dos resíduos de graviola, acerola e mangaba



**Figura 4** – Intensidade de diversos aromas dos fermentados utilizando o resíduo da farinha de graviola.

Não há registros na literatura de estudos de produção de aromas utilizando resíduos de graviola, mangaba e acerola. Uenojo (2006) verificou a produção de aroma frutal por quatro microrganismos pectinolíticos através da fermentação em meio contendo casca de café seco e bagaço de uva. Através da análise que os compostos voláteis apresentaram descrições como frutal, doce, floral, fermento, ácido, solvente, semelhantes às descrições observadas neste estudo.

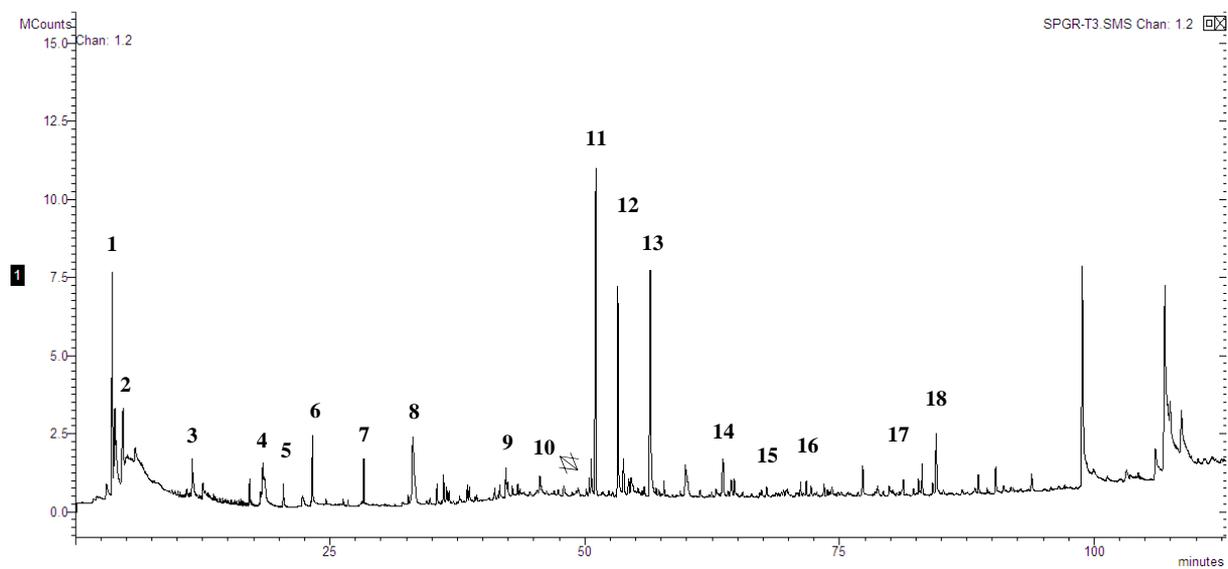
Medeiros *et al.* (2000) realizaram a seleção de resíduos para a produção de compostos de aroma por *Kluyveromyces marxianus* por análise sensorial utilizando três provadores não treinados. O farelo de palma e o bagaço de mandioca foram os que produziram aromas com características mais intensa de frutal, a semente de girassol produziu aroma suave enquanto que o resíduo de maçã e bagaço de cana-se-açúcar não produziram nenhum aroma. Pinotti *et al.* (2006) verificaram por análise sensorial a produção de aroma frutal por *Geotrichum candidum* em meio sintético.

### **5.2.2 Análise cromatográfica do fermentado de graviola**

Tendo em vista que o fermentado com resíduo de graviola foi o que apresentou maior intensidade de aromas através de análise sensorial, este foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, onde foram identificados 18 compostos de aroma (Tabela 11). Dentre os compostos produzidos, o 2-feniletanol e o 2-fenetil acetato, os quais correspondem aos aromas de rosas e maçã, respectivamente, são os de maior valor comercial, de grande importância na indústria de alimentos e considerados GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Por este motivo, estes compostos foram os selecionados como compostos de interesse para os estudos de otimização de processo. A maior produção destes compostos (maior área de pico cromatográfico) foi obtida em 72 h de fermentação como demonstrado na Figura 5. Não há registros na literatura da produção destes compostos de aroma por *Kluyveromyces marxianus* utilizando resíduo de graviola como substrato. Damasceno *et al.* (2003) identificaram o composto 2-feniletanol produzido por *Geotrichum fragrans* usando manipueira como substrato.

Medeiros *et al.* (2000) obtiveram a produção de compostos de aroma tais como acetaldeído, etanol, acetato de etila, propionato de etila, 3-metil-1-butanol através da

fermentação de farelo de palma gigante e bagaço de mandioca por *Kluyveromyces marxianus*.



**Figura 5-** Cromatograma do fermentado de resíduo de graviola após 72 horas de fermentação.

**Tabela 11-** Compostos de aroma identificados nos fermentados de resíduo de graviola após 72 horas de fermentação.

Nr.	Composto	Índice de Retenção	Descrição do Aroma <sup>a, b</sup>	Preço estimado US\$*
1	Propionato de etila	949	Frutal, maçã, pêra	629,00/kg
2	2-Metoxietanol	962	Álcool	451,00/L
3	2-Pentanol	1092	Verde	488,00/L
4	3-Metil-1-butanol	1206	Álcool, banana, adocicado	349,00/L
5	(Z)-3-Hexenoato de metila	1246	Floral, frutal	-
6	(E)-2- Hexenoato de metila	1300	Frutal, mel, banana verde	-
7	(E)-2-Hexenol	1390	Verde, folha, noz	837,00/kg
8	Acido acético	1423	Ácido acético, vinagre	60,00/L
9	2-(2-etoxietoxi) etanol	1593		146,00/L
10	Metoxi-fenil-oxima	1747		-
<b>11</b>	<b>2-Fenil acetato</b>	<b>1760</b>	<b>Rosas, mel, maçã, adocicado</b>	<b>1041,00/kg</b>
12	Acido hexanóico	1806	Ácido gordo, óleo vegetal, suor	235,00/kg
<b>13</b>	<b>2-Feniletanol</b>	<b>1856</b>	<b>Rosas, adocicado, perfumado</b>	<b>5700,00/kg</b>
14	Acido octanóico	2013	Queijo, suor	186,00/kg
15	(E)-2-Benzoato de hexila	2085		-
16	2-Tetradecanona	2180		-
17	Octadecanoato de metila	2422		186,00/kg
18	Decanoato de benzila	2266		-

Fonte: \*<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>; <sup>a</sup> MEILGAARD, 1975; <sup>b</sup> ACREE e ARN, 2004

### 5.3 Influência de parâmetros na produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e do 2-fenetil acetato – Delineamento Experimental

Nessa etapa, avaliou-se o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura, pH, agitação, concentração de resíduo e concentração de leveduras na produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e 2-fenetil acetato através do delineamento experimental descrito nas Tabelas 12 e 13.

**Tabela 12-** Valores reais e codificados da matriz do delineamento experimental para a produção de 2-feniletanol e variável resposta em área (count) do pico cromatográfico.

Ensaio	Variáveis Independentes						Resposta
	Glicose (g/L)	Ext. lev. (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Resíduo (g/L)	Inóculo	Área (Count)
1	0 (-1)	0 (-1)	3,5 (-1)	150 (+1)	150 (+1)	10 <sup>10</sup> (+1)	473074
2	20 (+1)	0 (-1)	3,5 (-1)	0 (-1)	50 (-1)	10 <sup>10</sup> (+1)	353918
3	0 (-1)	1 (+1)	3,5 (-1)	0 (-1)	150 (+1)	10 <sup>6</sup> (-1)	444049
4	20 (+1)	1 (+1)	3,5 (-1)	150 (+1)	50 (-1)	10 <sup>6</sup> (-1)	318134
5	0 (-1)	0 (-1)	6,5 (+1)	150 (+1)	50 (-1)	10 <sup>6</sup> (-1)	271005
6	20 (+1)	0 (-1)	6,5 (+1)	0 (-1)	150 (+1)	10 <sup>6</sup> (-1)	379925
7	0 (-1)	1 (+1)	6,5 (+1)	0 (-1)	50 (-1)	10 <sup>10</sup> (+1)	411540
8	20 (+1)	1 (+1)	6,5 (+1)	150 (+1)	150 (+1)	10 <sup>10</sup> (+1)	354146
9	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	6577000
10	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	6776000
11	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	5802000

**Tabela 13-** Valores reais e codificados da matriz do delineamento experimental para a produção de 2-fenetil acetato e variável resposta em área (count) do pico cromatográfico.

Ensaio	Variáveis Independentes						Resposta
	Glicose (g/L)	Ext. lev. (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Resíduo (g/L)	Inóculo	Área (Count)
1	0 (-1)	0 (-1)	3,5 (-1)	150 (+1)	150 (+1)	10 <sup>10</sup> (+1)	109049
2	20 (+1)	0 (-1)	3,5 (-1)	0 (-1)	50 (-1)	10 <sup>10</sup> (+1)	75430
3	0 (-1)	1 (+1)	3,5 (-1)	0 (-1)	150 (+1)	10 <sup>6</sup> (-1)	129573
4	20 (+1)	1 (+1)	3,5 (-1)	150 (+1)	50 (-1)	10 <sup>6</sup> (-1)	223680
5	0 (-1)	0 (-1)	6,5 (+1)	150 (+1)	50 (-1)	10 <sup>6</sup> (-1)	140183
6	20 (+1)	0 (-1)	6,5 (+1)	0 (-1)	150 (+1)	10 <sup>6</sup> (-1)	170199
7	0 (-1)	1 (+1)	6,5 (+1)	0 (-1)	50 (-1)	10 <sup>10</sup> (+1)	93903
8	20 (+1)	1 (+1)	6,5 (+1)	150 (+1)	150 (+1)	10 <sup>10</sup> (+1)	136398
9	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	3427000
10	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	3417000
11	10 (0)	0,5 (0)	5,0 (0)	75 (0)	75 (0)	10 <sup>8</sup> (0)	2861000

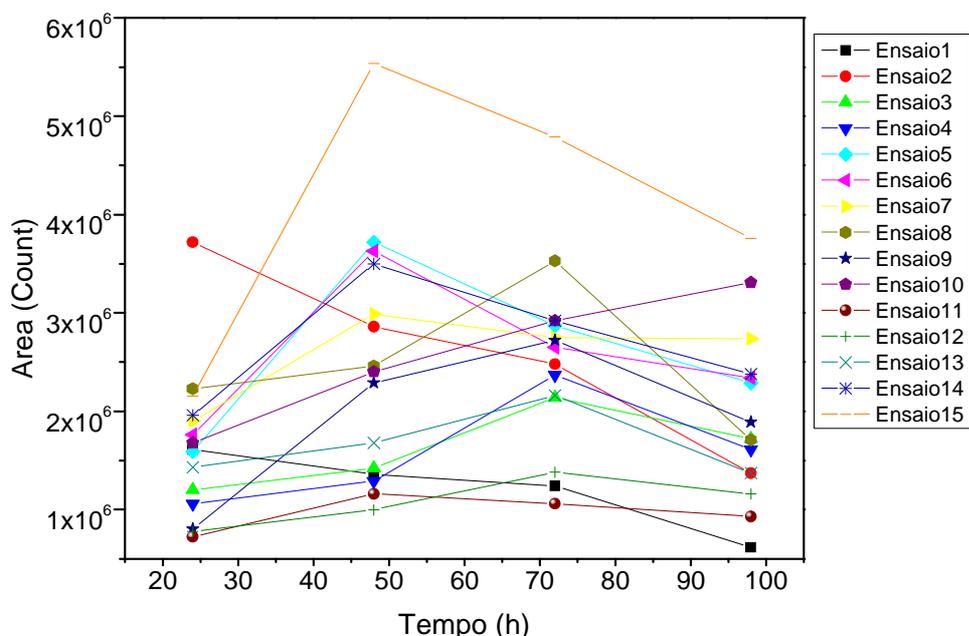
Nas faixas de valores estudadas os parâmetros não demonstraram influência na produção de ambos compostos. Diante disto, optou-se em fixar os parâmetros pH, concentração de leveduras e de resíduo no meio e avaliar a influência dos parâmetros glicose, extrato de levedura e agitação na produção dos compostos 2-feniletanol e 2-fenetilacetato utilizando o delineamento composto central rotacional.

#### **5.4. Produção dos compostos de aroma 2-feniletanol e do 2-fenetil acetato**

##### **5.4.1 Cinética de produção do composto de aroma 2-feniletanol**

A produção do composto de aroma 2-feniletanol foi realizada em diferentes condições de fermentação de acordo com o planejamento fatorial completo e a cinética de produção do composto (quantificação representada pela área de pico cromatográfico)

foi acompanhada retirando alíquotas a cada 24 h de fermentação submersa (FE) conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6-** Cinética da FS para produção do composto de aroma 2-feniletanol segundo o planejamento experimental completo (Tabela 14).

A máxima produção do composto 2-feniletanol foi obtido em 24 h para os ensaios 1, 2, após 48 h para os ensaios 5, 6, 7, 11, 14 e 15 com 72 h para os ensaios 3, 4, 8, 9, 12 e 13 e apenas no ensaio 10 com 96 h de fermentação.

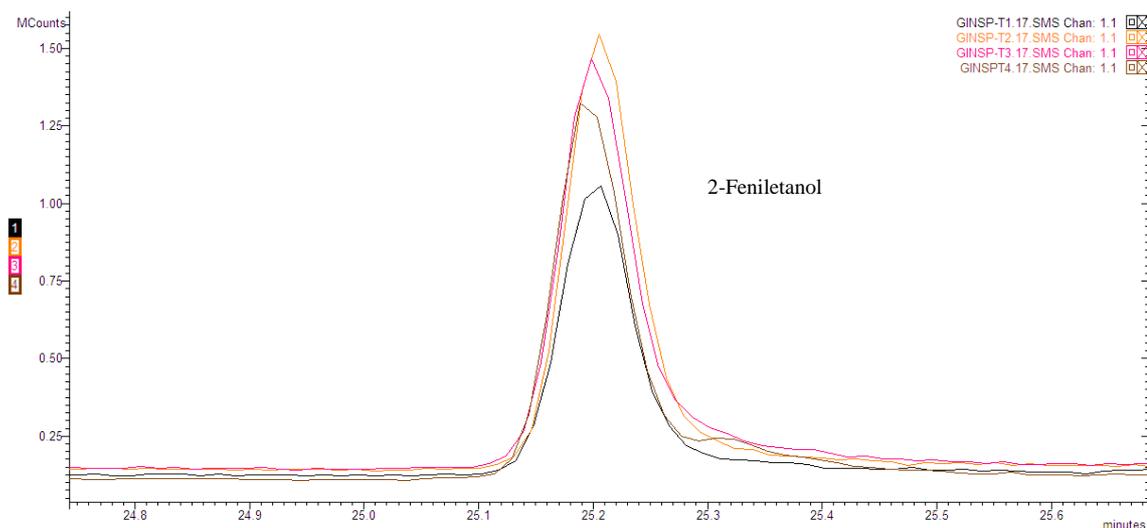
Os picos máximos de produção do composto de aroma 2-feniletanol variaram entre  $1,16 \text{ E}+06$  e  $5,54 \text{ E}+06$  count (em área) em todos os ensaios realizados (Tabela 12), sendo a maior área obtida quando utilizado meio de cultivo contendo 30 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e agitação de 112 rpm (condição do ponto central, ensaios 15 a 17). O cromatograma demonstrando o pico do composto 2-feniletanol está apresentado na Figura 7. O pico do composto foi identificado com 25,205 min de corrida. Os picos sobrepostos (do preto ao laranja) correspondem a produção do composto a cada 24 h de fermentação, a maior produção do composto ocorreu após 48 h de fermentação e o mesmo diminui nas horas seguintes.

A menor produção deste composto foi obtida quando utilizou 30 g/L de glicose, 0 g/L de extrato de levedura e agitação de 112 rpm.

**Tabela 14-** Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-Feniletanol e variável resposta em área (count) do pico cromatográfico

Ensaio	Variáveis Independentes			Resposta
	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Agitação (rpm)	Área (Count)
1	18(-1)	2 (-1)	90 (-1)	1,61E+06
2	42(1)	2 (-1)	90 (-1)	3,72E+06
3	18 (-1)	8 (+1)	90 (-1)	2,14E+06
4	42 (+1)	8 (+1)	90 (-1)	2,37E+06
5	18 (-1)	2 (-1)	135 (+1)	3,72E+06
6	42 (+1)	2 (-1)	135 (+1)	3,63E+06
7	18 (-1)	8 (+1)	135 (+1)	2,99E+06
8	42 (+1)	8 (+1)	135 (+1)	3,53E+06
9	10 (-1,68)	5 (0)	112 (0)	2,72E+06
10	50 (+1,68)	5 (0)	112 (0)	3,31E+06
11	30 (0)	0 (-1,68)	112 (0)	1,16E+06
12	30 (0)	10 (+1,68)	112 (0)	1,38E+06
13	30 (o)	5 (0)	75 (-,168)	2,16E+06
14	30 (0)	5 (0)	150 (+1,68)	3,50E+06
15*				
16*	30 (0)	5 (0)	112 (0)	5,54E+06
17*				

\*Triplicata



**Figura 7-** Cinética de produção do composto de aroma 2-FE (Cromatogramas da melhor produção), os picos cor preta, laranja, rosa e marrom correspondem a sua presença nos fermentados obtidos nos tempos 24, 48 72 e 96 respectivamente.

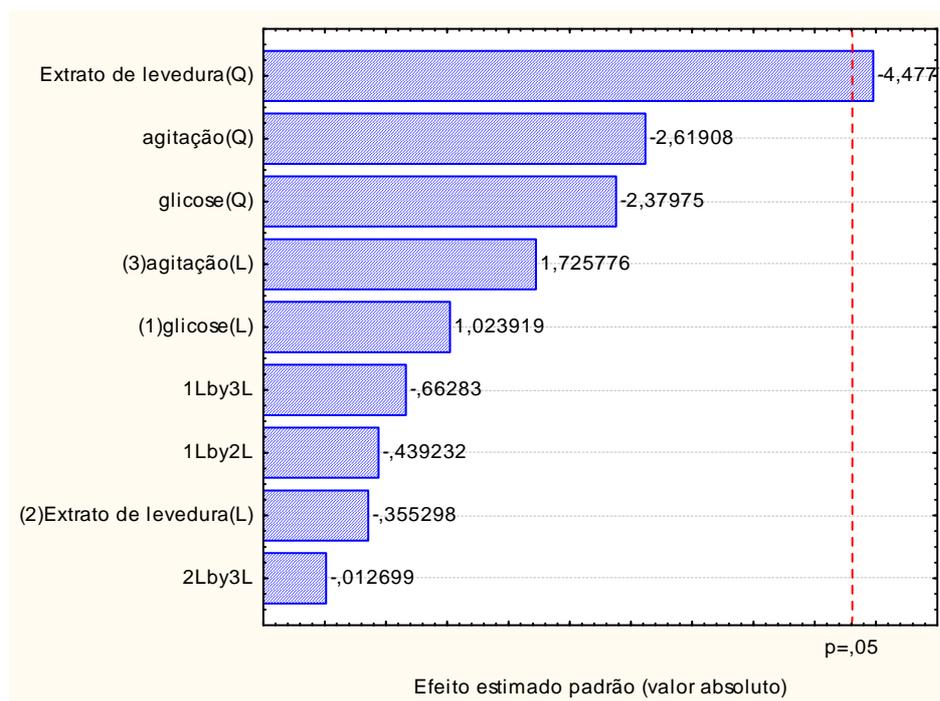
#### 5.4.2- Influência dos parâmetros na produção do composto de aroma 2-feniletanol

O gráfico de Pareto (Figura 8) ilustra os efeitos das variáveis, bem como suas interações. Os parâmetros que ultrapassam a direita da linha tracejada são considerados significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que o único parâmetro significativo foi o extrato de levedura quadrático, sendo o efeito negativo, ou seja, quanto menor a concentração de extrato de levedura maior a produção do composto de aroma 2-FE.

Na equação 2 está apresentado o modelo codificado de segunda ordem, que descreve em área do pico de produção do composto de aroma 2-FE em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 15. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,8361 e o F calculado (3,97) foi maior que o F tabelado (3,68), portanto o modelo proposto na equação 2 é válido, podendo ser obtida a superfície de resposta.

$$\text{Área do pico de 2-Fe} = 5478726 - 1342311 [\text{EL}]^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde : [EL] é a concentração de extrato de levedura



**Figura 8-** Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-feniletanol.

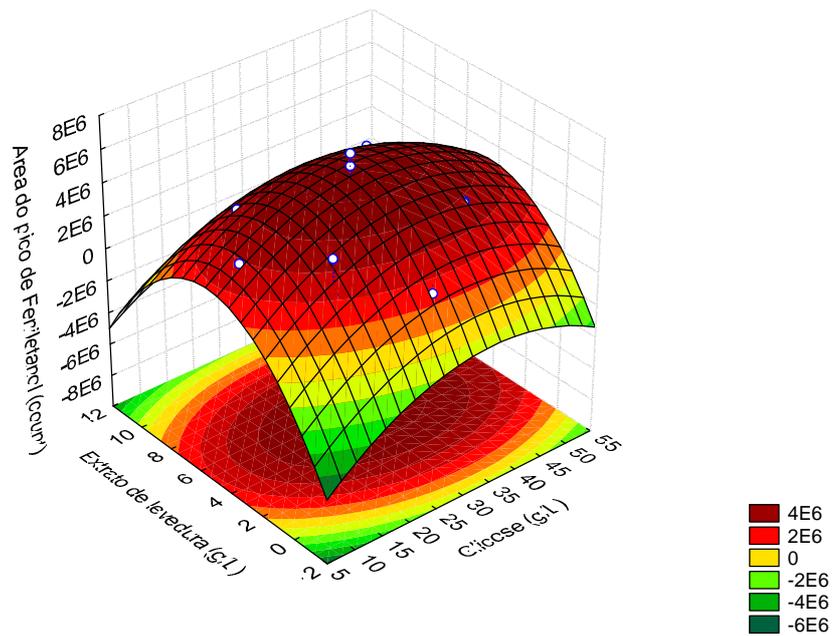
**Tabela 15-** Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-feniletanol

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	2,72E+13	9	3,02E+12	3,97
Resíduo	5,31E+12	7	7,60E+11	-
Falta de ajuste	3,34E+12	5	-	-
Erro puro	1,97E+12	2	-	-
Total	3,25E+13	16	-	-

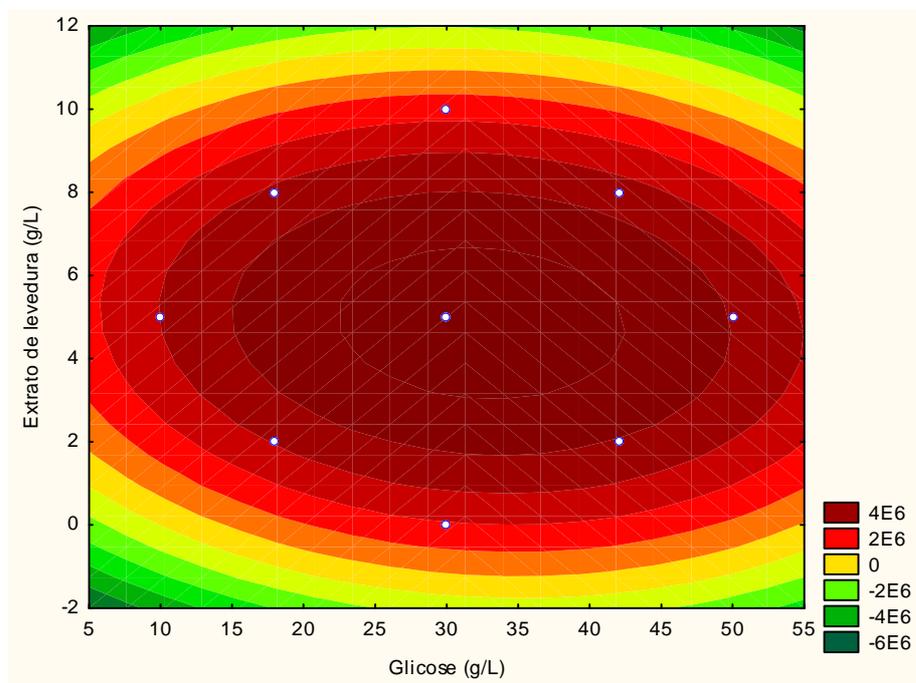
Coefficiente de correlação  $R^2 = 0,8361$

$F_{9;7; 5\%} = 3,68$

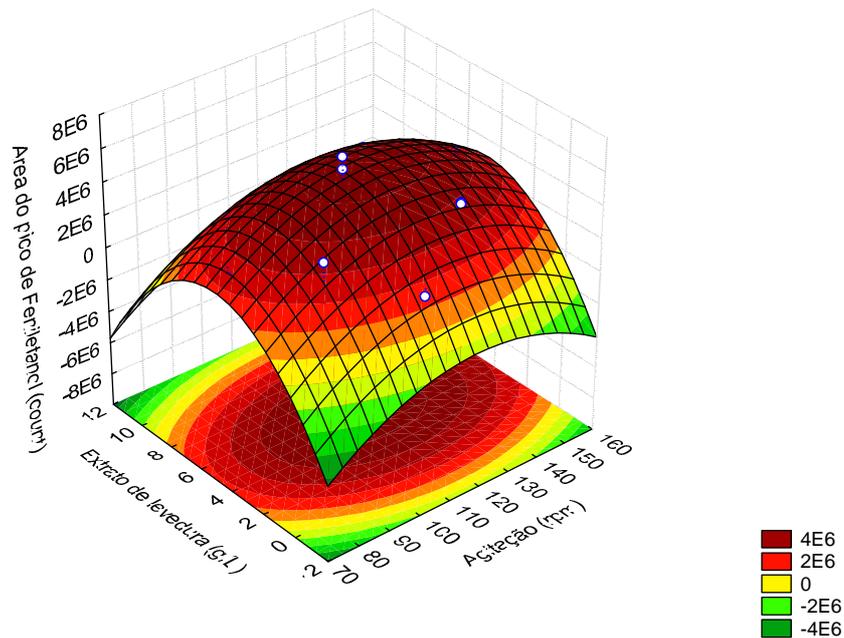
De acordo com as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figuras 9 a 14), verificou-se que a região otimizada para a produção do composto 2-feniletanol foi nas concentrações de extrato de levedura entre 4,0 e 6,0 g/L de extrato de levedura, glicose entre 22 e 42 g/L e agitação entre 100 e 120 rpm.



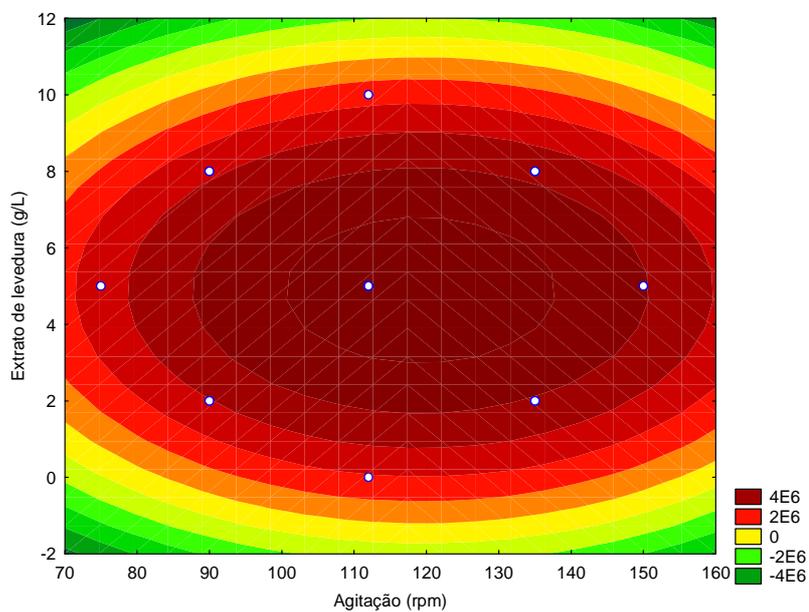
**Figura 9-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura



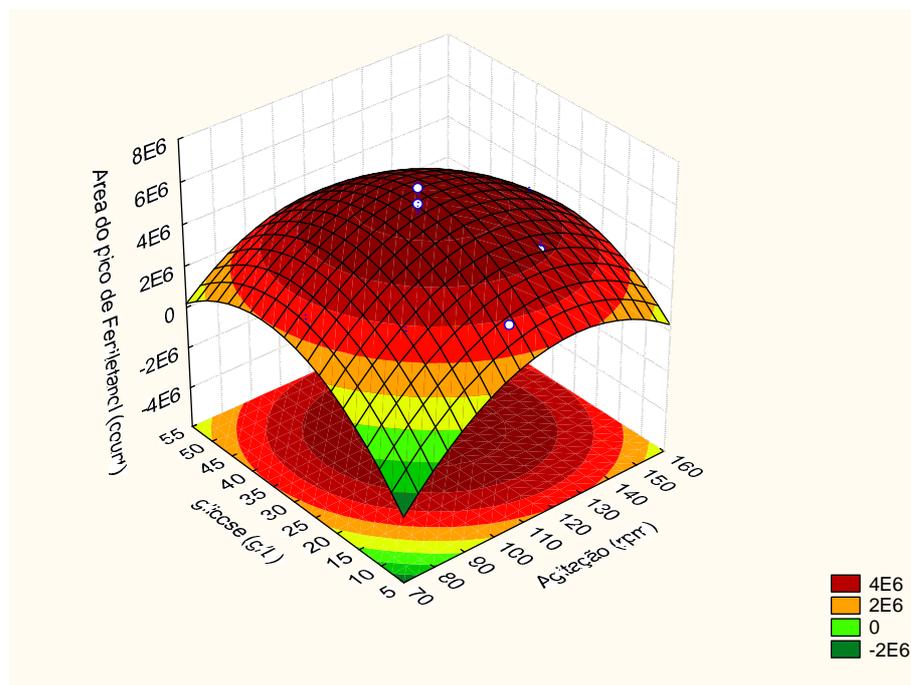
**Figura 10-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.



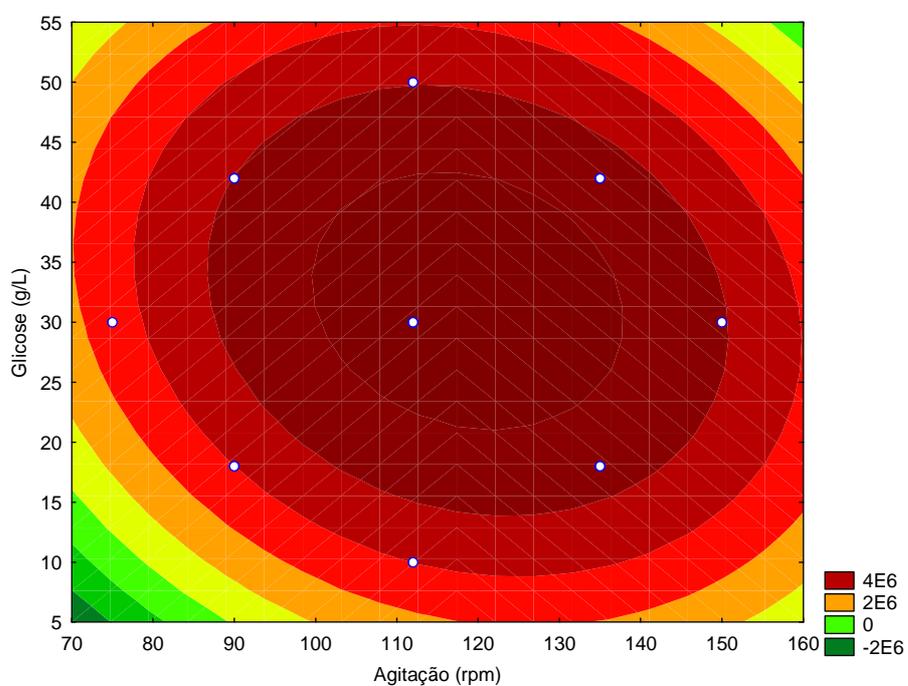
**Figura 11-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito da concentração de extrato de levedura e agitação.



**Figura 12-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações na concentração de extrato de levedura e agitação.



**Figura 13-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-feniletanol demonstrando o efeito da concentração de glicose e agitação.



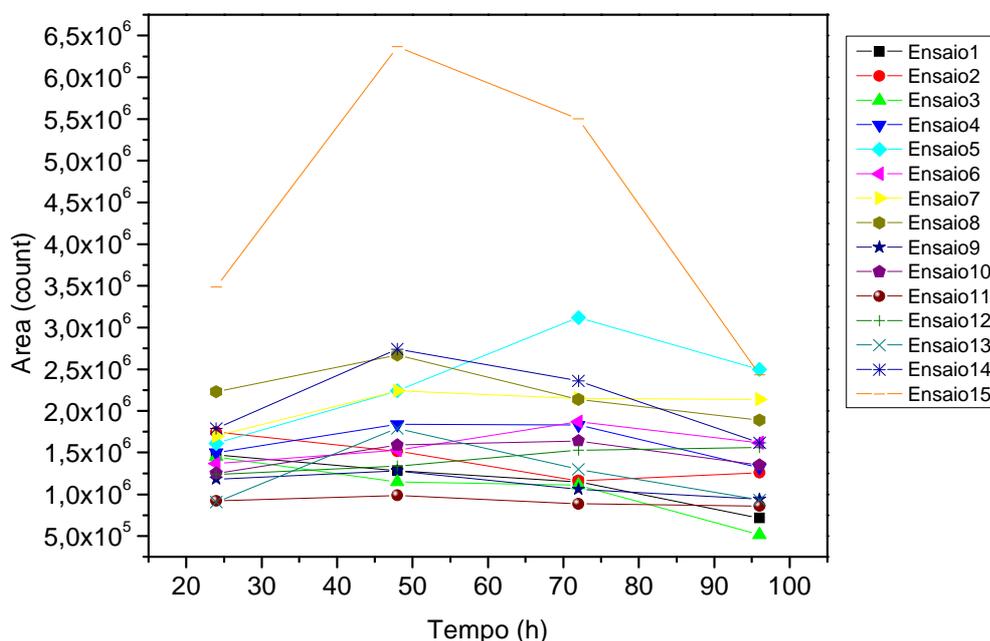
**Figura 14-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-feniletanol de acordo com as variações na concentração de glicose e agitação.

Na literatura vários trabalhos relatam a influência de parâmetros na produção do composto de aroma 2-feniletanol. Huang *et al.* (2000) utilizando o microrganismo *Pichia fermentam*, obtiveram maior rendimento do composto quando utilizado meio contendo 18% de sacarose, 0,25% de levedura e 0,1% de fenilalanina. Neste trabalho obteve-se maior produção de 2-feniletanol com uma menor quantidade de glicose (3%). Similarmente Stark *et al.* (2003) obtiveram maior produção deste composto utilizando meio contendo 3% de glicose e 6 g/L e a levedura *S. cerevisiae*. Enquanto, Oliveira (2010) estudando a produção de 2-FE em resíduo líquido de fecularia obteve uma maior produção do composto utilizando meio de cultivo contendo 2% de glicose.

Garavaglia *et al.* (2007) obtiveram maior produção o 2-FE em mosto de uva por *Kluyveromyces marxianus* utilizando agitação de 250 rpm e Damasceno *et al.* (2003) com agitação de 150 rpm utilizando manipueira, enquanto neste trabalho a maior produção foi obtida com agitação de 112 rpm, sendo que empregando a agitação a 150 rpm teve baixa produtividade .

#### **5.4.3- Cinética de Produção do composto de aroma 2-Fenetil acetato**

A produção do composto de aroma 2-fenetil acetato foi realizada em diferentes condições de fermentação de acordo com o planejamento experimental e a cinética de produção do composto (quantificação representada pela área de pico cromatográfico) foi acompanhada em cada ensaio a cada 24 h de fermentação conforme demonstrado na Figura 15.

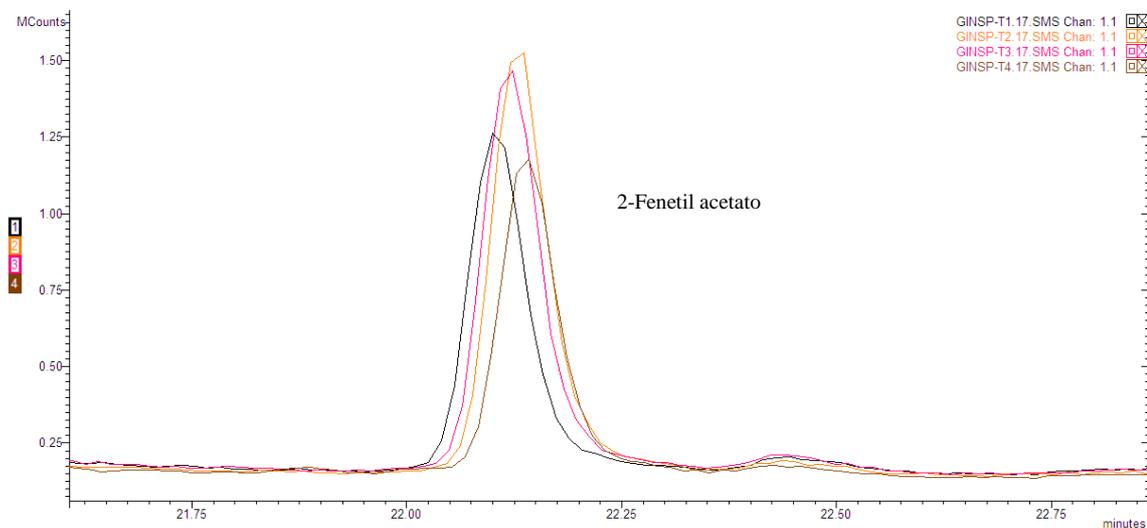


**Figura 15-** Cinética da FS para produção do composto de aroma 2-fenil acetato segundo o planejamento experimental completo (Tabela 16).

A máxima produção do composto 2-fenilacetato foi obtido em 24 h nos ensaios 1, 2 e 3, com 48 h para os ensaios 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14 e 15 com 72 h para os ensaios 5, 6 e 10 e com 96 no ensaio 12.

As áreas dos picos de produção do composto de aroma 2-fenil acetato variaram entre  $9,88E+05$  e  $6,37E+06$  count em todos os ensaios realizados (Tabela 16). A produção de 2-FEA foi superior a do composto 2-FE, porém nas mesmas condições operacionais, ou seja, quando utilizado meio de cultivo contendo 30 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e agitação de 112 rpm (condição do ponto central, ensaios 15-17). O cromatograma demonstrando o pico do composto 2-fenil acetato está apresentado na Figura 16. O pico do composto foi identificado em 22,136 min de corrida. Os picos sobrepostos (do preto ao laranja) correspondem a produção do composto a cada 24 h de fermentação, a produção do composto aumentou até 48 h e diminui nas horas seguintes.

A menor área do pico de produção deste composto também foi obtida quando utilizado 30 g/L de glicose, 0 g/L de extrato de levedura e agitação de 112 rpm (ensaio 11).



**Figura 16** - Cinética de produção do composto de aroma 2-Fenil acetato (Cromatogramas da melhor produção), os picos cor preta, laranja, rosa e marrom correspondem a sua presença nos fermentados obtidos nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas respectivamente.

**Tabela 16-** Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-Fenetilacetato e variável resposta em area (count) do pico cromatográfico

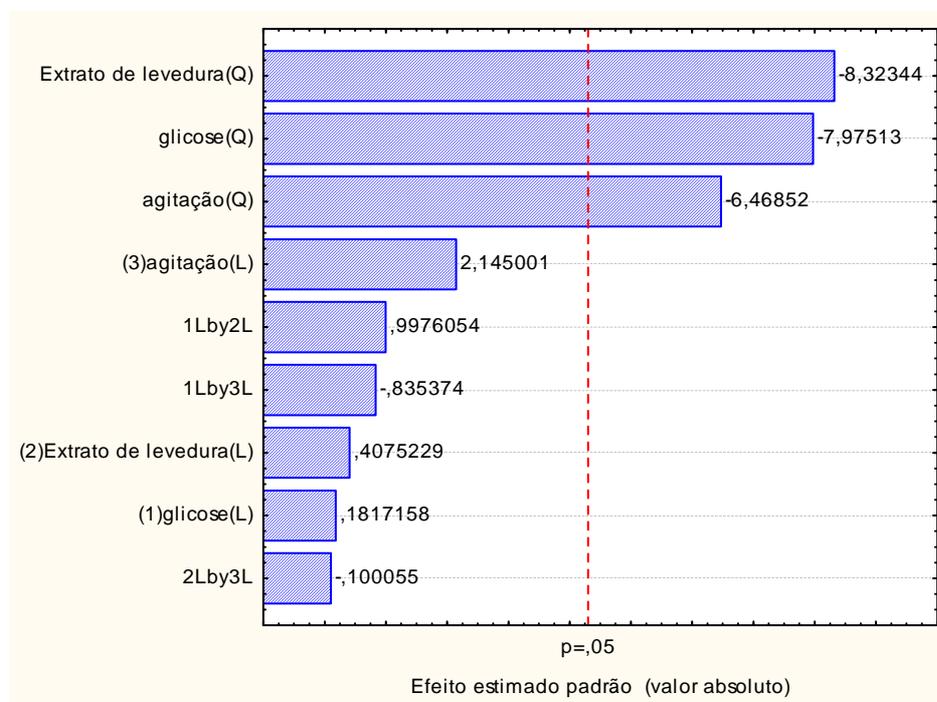
Ensaio	Variáveis Independentes			Variável resposta
	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Agitação (rpm)	Área (count)
1	18(-1)	2 (-1)	90 (-1)	1,47E+06
2	42(+1)	2 (-1)	90 (-1)	1,75E+06
3	18 (-1)	8 (+1)	90 (-1)	1,45E+06
4	42 (+1)	8 (+1)	90 (-1)	1,84E+06
5	18 (-1)	2 (-1)	135 (+1)	3,12E+06
6	42 (+1)	2 (-1)	135 (+1)	1,87E+06
7	18 (-1)	8 (+1)	135 (+1)	2,24E+06
8	42 (+1)	8 (+1)	135 (+1)	2,67E+06
9	10 (-1,68)	5 (0)	112 (0)	1,28E+06
10	50 (+1,68)	5 (0)	112 (0)	1,64E+06
11	30 (0)	0 (-1,68)	112 (0)	988319
12	30 (0)	10 (+1,68)	112 (0)	1,56E+06
13	30 (0)	5 (0)	75 (-,168)	1,79E+06
14	30 (0)	5 (0)	150 (+1,68)	2,74E+06
15*				
16*	30 (0)	5 (0)	112 (0)	6,37E+06
17*				

\*Triplicata

#### 5.4.4- Influência dos parâmetros na produção do composto de aroma 2-fenetil acetato

Através do gráfico de Pareto (Figura 17), verificou-se que os parâmetros quadráticos extrato de levedura, glicose e agitação foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O extrato de levedura foi o que mais interferiu na produção do composto, e de forma negativa, ou seja, quanto menor a quantidade de extrato maior a produção do composto. Isso aconteceu também com a glicose e a agitação que também influenciaram de maneira negativa, mostrando que

quanto menor a quantidade de glicose e menor agitação melhor a produção do composto em estudo.



**Figura 17-** Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-fenetil acetato.

A equação 3 representa o modelo codificado de segunda ordem, que descreve produção do composto 2-fenetil acetato em função das variáveis glicose, extrato de levedura e agitação, dentro das faixas analisadas.

$$\text{Área do pico de 2-FEA} = 6113556 - 1523565 [G]^2 - 1590107 [EL]^2 - 1236087 A^2 \text{ (eq.3)}$$

Onde: [G] é a concentração de glicose, [EL] é a concentração de extrato de levedura e A é agitação.

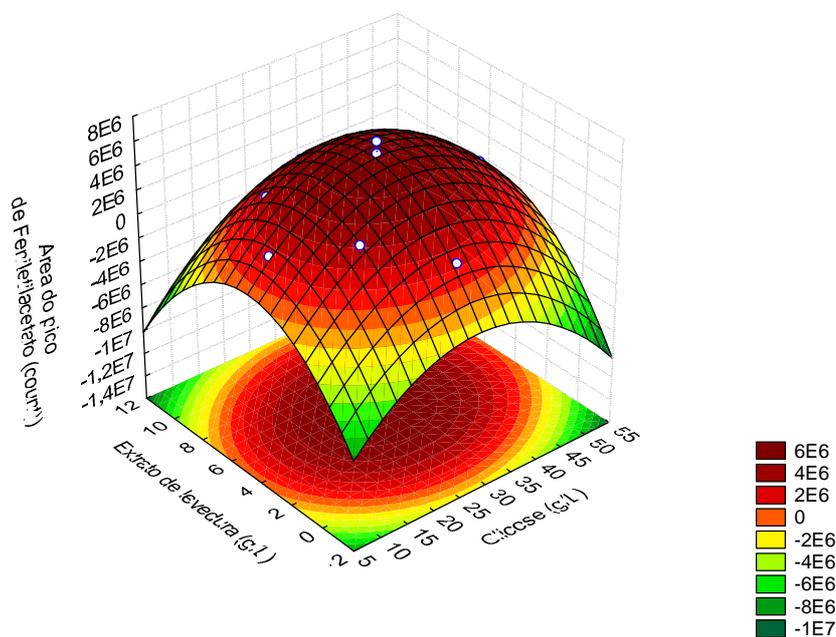
O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância (Tabela 17), onde o coeficiente de correlação foi de 0,9405 e o F calculado (12,32) foi cerca de 3 vezes maior que o F tabelado (3,68), portanto o modelo proposto na equação 4 é válido, podendo ser obtida a superfície de resposta.

**Tabela 17-** Análise de variância para a produção do 2-fenetil acetato

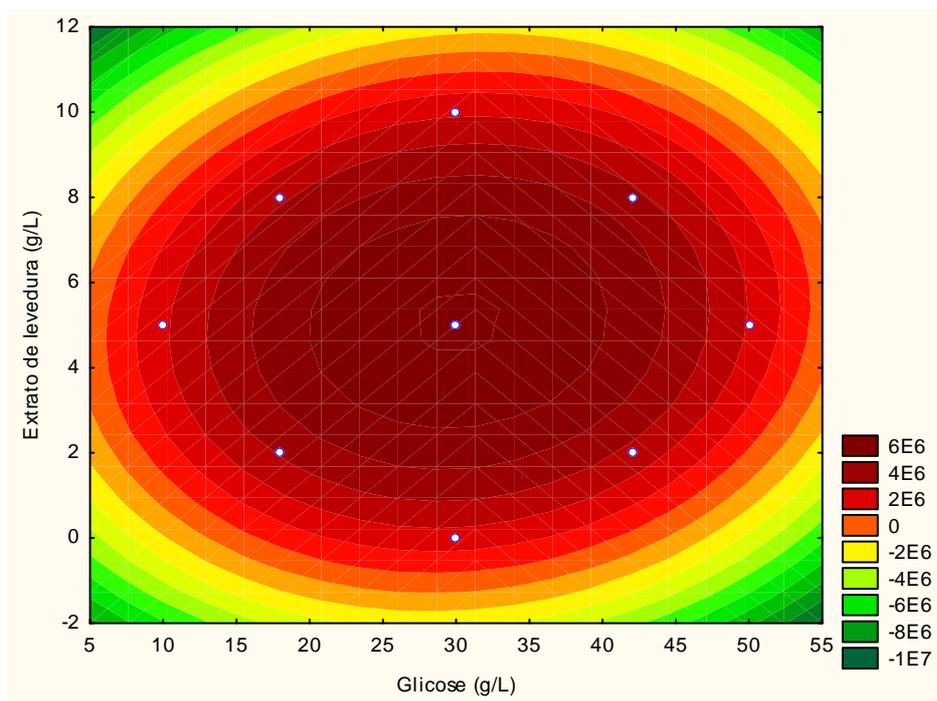
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	4,78E+13	9	5,31 E+12	12,32
Resíduo	3,02E+12	7	4,31 E+11	-
Falta de ajuste	2,22E+12	5	-	-
Erro puro	8,04E+11	2	-	-
Total	5,08E+13	16	-	-

Coefficiente de correlação  $R^2 = 94,05$ ;  
 $F_{9;7; 5\%} = 3,68$

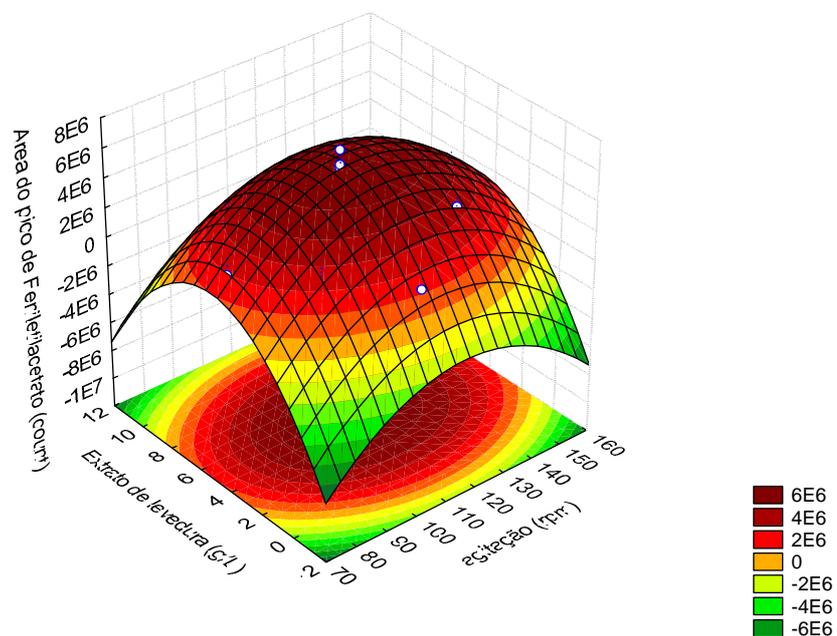
De acordo com as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figuras 18 a 23), verificou-se que a região otimizada para a produção do composto 2-fenetil acetato foi em concentrações de extrato de levedura entre 2,5 e 7,0 g/L, glicose entre 21 e 40 g/L e agitação entre 95 e 135 rpm.



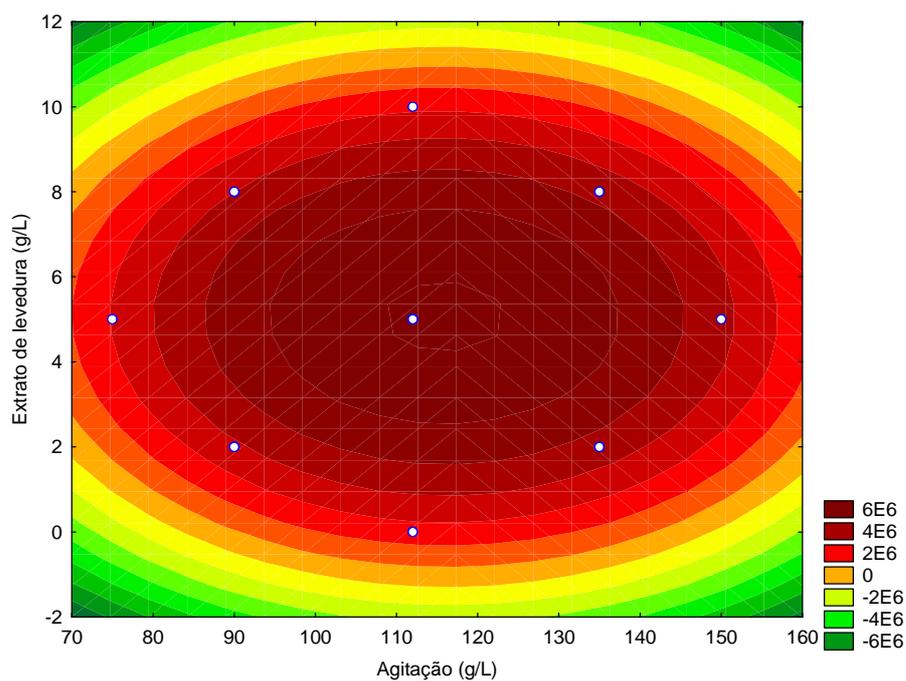
**Figura 18-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura.



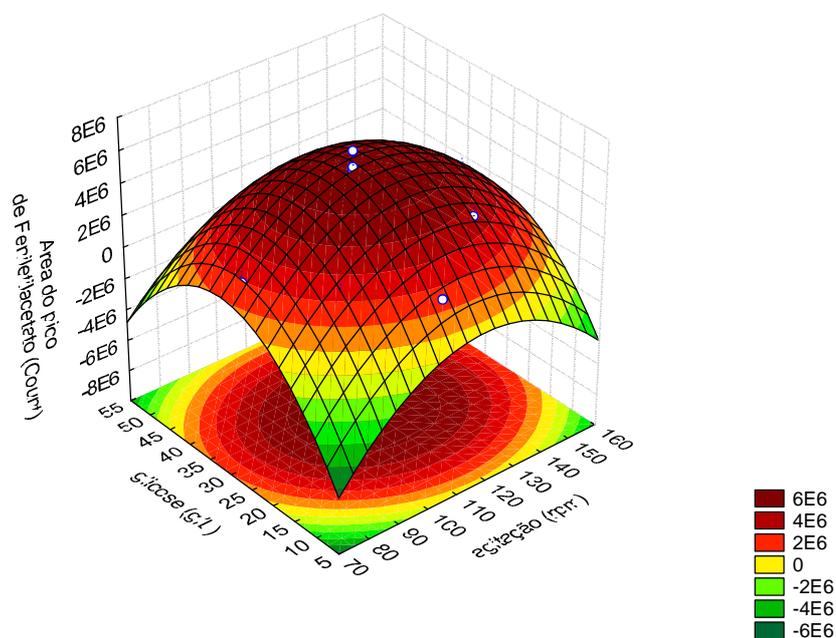
**Figura 19-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.



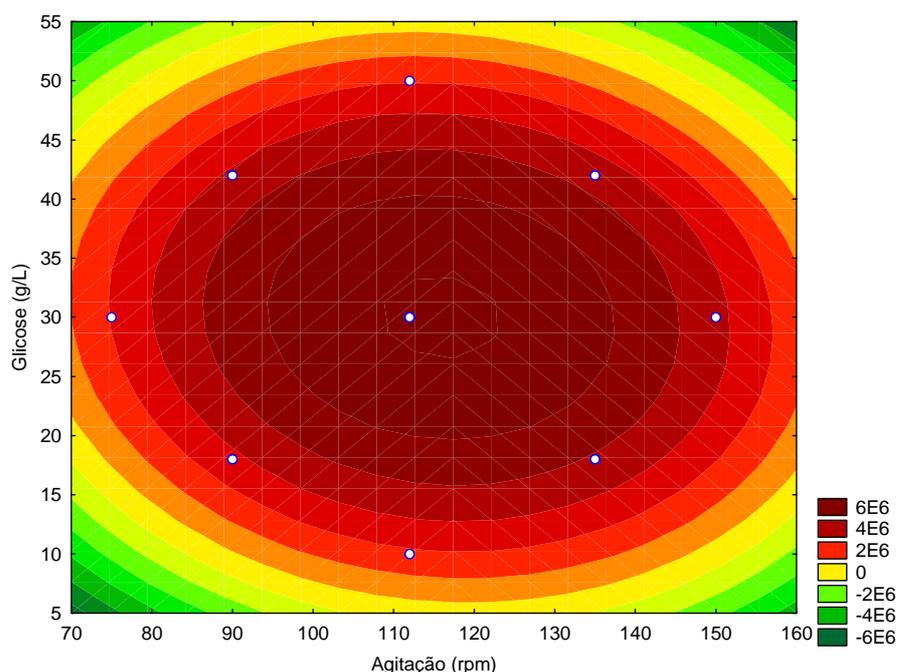
**Figura 20-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenetil acetato demonstrando o efeito da concentração de extrato de levedura e agitação.



**Figura 21-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenil acetato de acordo com as variações na concentração de extrato de levedura e agitação.



**Figura 22-** Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-fenil acetato demonstrando o efeito da concentração de glicose e agitação.



**Figura 23-** Curvas de contorno para a produção do composto de aroma 2-fenil acetato de acordo com as variações na concentração de glicose e agitação.

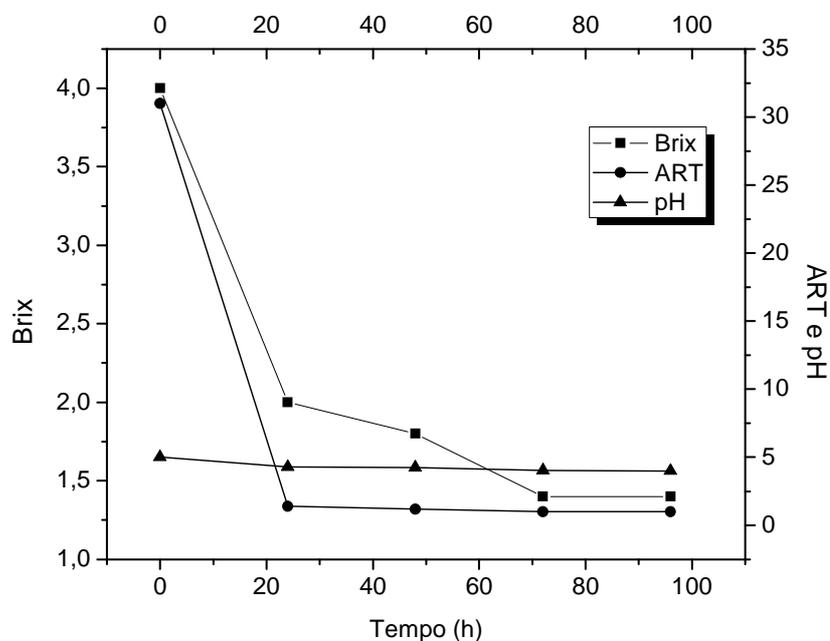
### 5.5. Cinética de consumo de substrato e acompanhamento do pH

Na condição de maior produção dos compostos de aroma (2-feniletanol e 2-fenil acetato), ou seja, utilizando meio de cultivo 30 g/L de glicose, 5g/L de extrato de levedura e agitação de 112 rpm, realizou-se um experimento para acompanhar a cinética de consumo de substrato, em função da determinação de açúcares redutores, °Brix e o pH do meio (Figura 24).

O consumo de substrato em função de ART foi de praticamente 100 % já nas primeiras 24 h de fermentação. Em relação °Brix verificou-se um decréscimo em torno de 50% nas primeiras 24 horas, e nas horas seguintes o °Brix permaneceu praticamente estável. Apesar do consumo quase total de açúcares ter sido em 24 h, a produção máxima dos compostos 2-feniletanol e 2-fenil acetato foi obtida em 48 h de fermentação.

Em relação ao pH verificou-se que este manteve-se praticamente estável entre 4,0 e 5,0 durante todo o tempo de fermentação. Esta variação no pH deve-se

provavelmente a formação de compostos ácidos ou devido a formação de íons de hidrogênio associado ao crescimento microbiano (STARZAK *et al.*, 1994).



**Figura 24** - Acompanhamento do ART, °Brix e pH durante os 5 dias de fermentação

## 6. CONCLUSÃO

Dentre os resíduos agroindustriais (acerola, graviola e mangaba) estudados, o resíduo de graviola foi o que apresentou maior potencial para a produção de aromas frutais por fermentação submersa utilizando a levedura *Kluveromyces marxianus*. Entre os 18 compostos de aroma produzidos, destacou-se a produção dos compostos 2-feniletanol e 2-fenetil acetato (maior área de pico), os quais possuem alto valor comercial. O processo de produção dos compostos foi otimizado, nas condições propostas, onde a maior produção de 2-fenetil acetato pode ser obtida em concentrações de extrato de levedura entre 2,5 e 7,0 g/L de extrato de levedura, glicose entre 21 e 40 g/L e agitação entre 95 e 135 rpm e maior produção do composto 2-feniletanol pode ser obtida em concentrações de extrato de levedura entre 4,0 e 6,0 g/L de extrato de levedura, glicose entre 22 e 42 g/L e agitação entre 100 e 120 rpm.

## REFERÊNCIAS

- ACREE, T.; ARN, H. F. 2004 <http://www.flavornet.org/flavornet.html>. Acesso dia 30 de novembro de 2011.
- ADLER, P.; HUGEN, T.; WIEWIORA, M.; KUNZ, B. Modeling of an integrated fermentation/membrane extraction process for the production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 285–292, 2011.
- ALBERTAZZI E.; CARDILLO R.; SERVI S.; ZUCCHI G. Biogeneration of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. **Biotechnol. Lett.**, v.16, p. 491-496, 1994.
- ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, p. 257-265, 2009.
- ACREE, T.E.; TERANISHI, R. **Flavor Science: sensible principles and techniques**. Washington: ACS Professional Reference Book, p. 351, 1993.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 2**, de 15 de janeiro de 2007 [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/2\\_rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/2_rdc.pdf). Acesso em 31 de Outubro de 2011.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul. Editora Gazeta Santa Cruz, 2008. 136p.
- AQUINO, A. C. M. S.; MOES, R. S.; LEAO, K. M. M.; FIGUEIREDO, A. V. D.; CASTRO, A. A. Avaliação físico-química e aceitação sensorial de biscoitos tipo *cookies* elaborados com farinha de resíduos de acerola. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 69, p. 379-86, 2010.
- ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R. C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Potencial do Fungo *Rhizopus stolonife* para o Enriquecimento protéico da Farinha de Sementes de Mangaba. In: II SIMPOSIO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E I CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTAS TROPICIAS. Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: UFS, 2010.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446–475, 2007.
- BELEM, M. A. F.; LEE, B, H. Oligossacarides extracted from cell walls of *A Kluyveromyces marxianus* grow on whey. **Biotechnol. Technol.**, v. 12, p. 229-233, 1998.

BERGER, R. G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1651-1659, 2009.

BICAS, J. L.; SILVA, J. C.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p.7-18, 2010.

BICCHI, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.3, p.449-59, 2002.

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in Solid Cultures from Agro-industrial Wastes. **Rev. Microbiol.** v. 29, p. 208-212, 1998.

CARVALHO, J. C. **Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

CHEONG, K. W.; TAN, C. P.; MIRHOSSEINI, H.; HAMID, N. S. A.; OSMAN A.; BASRI, M. Equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid-phase microextraction. **Food Research International**, v. 43, p. 1267–1276, 2010.

CHRISTEN, P.; MEZA, J. C.; REVAH, S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. **Mycological Research**, v. 101, p. 911-919, 1997.

COSTA, J. M. C.; FELIPE, E. M. F.; MAIA, G. A.; BRASIL, I. M.; HERNANDEZ, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, p. 228- 232, 2007.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 411-414, 2003.

DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. **J. Mol. Catal., B Enzym.**, v. 11, p. 265-270, 2001.

DHILLON, S. S.; GILL, R. K.; GILL, S. S.; SINGH, M. Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. **Int. J. Environ. Studies**, v. 61, p.199-210, 2004.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. Biotechnological production of 2 phenylethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 1-8. 2002.

ETSCHMANN M. M. W.; SELL D.; SCHRADER J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molassesbased medium. **Biotechnol Lett**, v. 25 p. 531–536, 2003.

ETSCHMANN M. M. W.; SELL D.; SCHRADER 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 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Prog.**, v. 14, p. 270–274, 1998.

FABRE, C. E.; DUVIAU, V. J.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Identification of volatile flavor compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1207-1212, 1995.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e Sabor de Alimentos: Temas Atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 246 p, 2004.

GAO, F.; DAUGULIS, A. J. Bioproduction of the Aroma Compound 2-Phenylethanol in a Solid–Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor System by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 132-139, 2009.

GARAVAGLIA, J.; FLORES, S. H.; PIZZALATO, T. M.; PERALBA, M. C.; ZACHIA AYUB, M. A. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. **World J. Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.1273–1279, 2007.

HUANG, C. J.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentam* L-5 as Affected by Some Medium Components. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, p. 142-147, 2000.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E.; HANG, L. E. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 305-307, 2003.

HUA, D.; LIN, S.; LI, Y.; CHEN, H.; ZHANG, Z.; DE, Y.; ZHANG, X.; XU, P. Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption. **Biocatal. Biotransfor.**, v. 28, p. 259-266, 2010.

HUA, D.; XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol, **Biotechnology Advances**. Disponível em [www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv).

IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp). Acesso em 25 de outubro de 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4°. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JANZANTTI, N. S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

JIANG, J. Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. **Process Biotechnology**, v. 30, p. 635-640, 1995.

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, p. 720-724, 2004.

KUBOTA, T. **Contribuição à química dos compostos voláteis dos frutos do nordeste: *Hancornia Speciosa* Gomes**. Dissertação de Mestrado. Universidade federal de Sergipe. São Cristóvão, 2007.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept, (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LEE, P. R.; ONG, W. L.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 853-861, 2010.

LONGO, M. A.; SANROMAN, M. A. Production of Food Aroma Compounds. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 335-353, 2006.

LOUSADA JÚNIOR, J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 70-76, 2006.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

MAARSE, H.; VISSCHER, C. A.; WILLESENS, L. C.; BOELENS, M. H.; Volatile Components in Food-Qualitative and Quantitative Data. Centraal Institute Voor Voedingsonderzoek. TNO Zeist, The Netherlands, 2000.

MATHEIS, G. Aroma, Flavoring and Food from a European Perspective, **Dragoco Report** v.4, p.157-187, 1997.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 33-39, 2000.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PASTORE, G. M.; SOCCOL, C. R. Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state

fermentation using different adsorbents. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 47-51, 2006.

MEILGAARD M. C. Flavor chemistry of beer. Part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **MBAA Technical Quarterly**, v.12, p. 151-168, 1975.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426, 1959.

NOGUEIRA P. C. L.; SAMPAIO T. S. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 606-610, 2006.

ODA, Y.; NAKAMURA, K. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose- resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, p.742-748, 2009.

OLIVEIRA, S. M. M; **Avaliação biotecnológica de 2-feniletanol em resíduo líquido de fecularia**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná, 2010.

PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 20, p. 217-224, 2003.

PEREIRA, C. D. A. **Produção de Metabólitos Voláteis Frutais por *Kluyveromyces marxianus* em Fermentação Submersa em meio à base de Melaço de Soja**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

PINHEIRO, R., BELO, I., MOTA, M. Growth and beta-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, 438-442, 2003.

PINO, J. A.; MARBOT, R. Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5880–5882, 2001.

PINO, J.A.; MARBOT, R; AGUERO, J. Volatile components of wild soursop (*Annona montana* Macf) fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 257-258, 2002.

PINOTTI, T.; CARVALHO, P. M. B.; GARCIA, K. M. G.; SILVA, T. R.; HAGLER, A. N.; LEITE, S. G. F. Media components and amino acid supplements influencing the production of fruity aroma by *Geotrichum candidum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 494-498, 2006.

RAJOKA, M. I. Kinetic parameters and thermodynamic values of beta-xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 2212–2219, 2007.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e Otimização de Processos. 1ª ed. Campinas - SP, 2005

RAMOS, A. S.; MARTINS, P. S. O.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F. Microextração em fase sólida de 6-pentil- $\alpha$ -pirona produzida por fermentação em estado sólido. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , v.29, p. 523-528, 2008.

RAMOS, A. S.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F. Production of 6-Pentyl- $\alpha$ -Pyrone by *Trichoderma harzianum* in Solid-state Fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 712-717, 2008.

RANGANNA, S. **Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products**. 2ª ed. New Delhi: Tata-Mc Graw-Hil, 643p, 1977.

RIBEIRO, P. L. G.; CABRAL, B. D.; SILVA, O. L.; LIMA, F. A.; MARTINS, M. R.; GOMES, A. J. A.; PEREIRA F. M.; FERNANDES, S. L.; GOMES, C. P. Composição química e cinética de fermentação ruminal de subprodutos de frutas no sul da Bahia - Brasil. **Livestock Research for Rural Developmen**, v. 20, 2008. Disponível em <http://www.lrrd.org/lrrd20/1/ribe20001.htm>, acessado em 22 de dezembro de 2011.

ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 155-159, 1999.

ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v. 42, p. 484-486, 2009.

ROUWENHORST, R. **Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces marxianus* yeasts**. Tese de doutorado. Departamento of Microbiology and Enzimology-Delft University of Technology, Netherlands, 1987.

SARHY-BAGNON, V; LOZANO, P; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G; ROUSSOS, S. Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. **Process Biochemistry**, v, 36, p.103–109, 2000.

SCHULTZ, N., CHANG, L. F., HAUCK, A., REUSS, M., SYLDATK, C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, p. 515-520, 2005.

SENDOVSKI, M.; NIR, N.; FISHMAN, A. Bioproduction of 2-Phenylethanol in a Biphasic Ionic Liquid Aqueous System. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 2260-2265, 2010.

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**, v.82, p. 103-110, 2003.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol.**, v. 23, p. 193-198, 2005.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN M. M. W.; SELL D.; HILMER J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial process and future prospects. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 463-474, 2004.

SHIREY, R. E. Rapid analysis of environmental samples using solid-phase microextraction (SPME) and narrow bore capillary columns. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, Riva del Garcia, Italy. **Proceedings...** p. 27- 30, 1994.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.4, p.318-324, 2002.

SOARES, M.; CHRISTEN ,P.; PANDEY , A.; SOCCOL, C. R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 857–861, 2000.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciênc. agrotec.**, v. 35, p. 554-559, 2011.

STARK D.; KORNMANN H.; MUNCH T.; SONNLEITNER B.; MARISON I. W.; VONSTOCKAR, U. Novel type of in situ extraction: Use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng.**, v. 8, p. 376–385, 2003.

STARK, D.; KORNMANN H.; MUNCH T.; SONNLEITNER B.; MARISON I. W.; VONSTOCKAR, U Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v.18, p.514-523, 2002.

STARZACK, M.; KRZYSZEK, L.; NOWICKI, L. Macroapproach kinetics of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: experimental studies and mathematical modelling. **The Chemical Engineering Journal**, v. 54, p. 221-240, 1994.

TORREA, D.; FRAILE P.; GARDE T.; ANCIN, C. production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. **Food Control**, v. 14, p. 565-571, 2003

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. CASE, C. L. Microbiologia. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2005. 894 p.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas- Campinas-SP, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 509-515, 2006.

YANG, X.; PEPPARD, T. Solid phase-microextraction for flavor analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1925-1930, 1994.

VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporodiobolus salmanicolor* CBS 2636. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina-SC, 2005.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím. Nova**, v.23, p. 523-530, 2000.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v.71, p. 195-198, 2000.

VIANA, F.; BELLOCH, C.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *International Journal of Food Microbiology*. v.151 p. 235-240, 2011.

VIANA, F.; GIL, J. V.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. V. 135, p.68-74, 2009.

VIEIRA, M. A. R. **Caracterização dos ácidos graxos das sementes e compostos voláteis dos frutos de espécies do gênero *Passiflora*.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

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

[http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl\\_acetate/12/ou/a4/](http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl_acetate/12/ou/a4/)  
Acesso no dia 20 de Dezembro de 2011.

[http://zipcodezoo.com/Fungi/K/Kluyveromyces\\_marxianus\\_var.\\_lactis/](http://zipcodezoo.com/Fungi/K/Kluyveromyces_marxianus_var._lactis/) Acesso no dia 20 de Dezembro de 2011.

<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso no dia 30 de novembro de 2011.

ANEXO

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Por favor, marque com um traço nas escalas abaixo a intensidade global do aroma percebido em cada amostra:

AMOSTRA	INTENSIDADE		
	fraco	moderado	forte
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_