



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS 2-
FENILETANOL, ACETATO DE 2-FENILETIL E β -CARIOFILENO PELA
UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO DE GOIABA**

Mércia de Sousa Galvão

SÃO CRISTÓVÃO-SE, 2014.

MÉRCIA DE SOUSA GALVÃO

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS 2-FENILETANOL, ACETATO DE 2-FENILETIL E β -CARIOFILENO PELA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO DE GOIABA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, na área de concentração em Biotecnologia Industrial, na linha de pesquisa de Ciência e Tecnologia de Alimentos no Ponto Focal de Sergipe como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narain

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino

SÃO CRISTÓVÃO-SE, 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA



- RENORBIO -

Ata da Sessão Solene de Defesa da 32ª Tese do
 Curso de Doutorado em Biotecnologia no
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
 da Rede Nordeste de Biotecnologia –
 RENORBIO no Ponto Focal de Sergipe.
 Doutorando (a): **MÉRCIA DE SOUSA
 GALVÃO.**

Ao vigésimo oitavo dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e catorze, com início às catorze horas, realizou-se no **LAF- Laboratório de Análise de Flavor da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe** a Sessão Solene de Defesa da Tese do Curso de Doutorado Acadêmico em Biotecnologia no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO no Ponto Focal de Sergipe de **MÉRCIA DE SOUSA GALVÃO**, sob o título: “**Processo biotecnológico para obtenção dos compostos 2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β-cariofileno pela utilização de resíduo de goiaba**”, presidida pelo Prof. Dr. Narendra Narain (**UFS & RENORBIO Ponto Focal SE**), que passou a palavra à aluna para proceder à apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o Presidente da Sessão passou a palavra a Prof.ª. Dr.ª. Marta Suely Madruga (**UFPB**), que arguiu a aluna, que teve igual período para suas explicações, em seguida passou a palavra a Prof.ª. Dr.ª. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva (**UFS**), para a arguição da aluna, que, após as considerações da referida Professora, realizou os esclarecimentos. Dando continuidade ao processo de avaliação passou a palavra a Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza (**UFS & RENORBIO Ponto Focal SE**), que explanou suas considerações e em seguida a aluna fez seus comentários e respostas. Posteriormente a palavra foi passada para a Prof.ª. Dr.ª. Luciana Cristina Lins de Aquino (**UFS**), segunda Orientadora, que fez suas considerações sobre o trabalho e finalmente a aluna fez suas ponderações. Em seguida, o Prof. Dr. Narendra Narain (**UFS & RENORBIO Ponto Focal SE**), Presidente da Comissão Examinadora, agradeceu os comentários e sugestões dos membros da banca. Encerrados os trabalhos, retirou-se do recinto a Banca Examinadora para atribuição de nota. A comissão decidiu APROVADO a candidata com **CONCEITO “A”**. Sendo

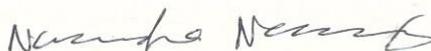


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
 – RENORBIO –**



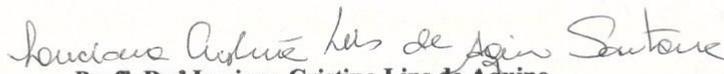
atendidas as exigências do Regimento do RENORBIO, que regulamenta a Apresentação e Defesa de Tese do Curso de Doutorado. Nada mais havendo a tratar, eu, Jackeline Oliveira Criscuolo Rittes, a Secretária da RENORBIO do Ponto Focal SE, lavrei a Presente ata que após lida e aprovada será assinada por todos os presentes.

Cidade Universitária, Prof. José Aloísio de Campos, 28 de fevereiro de 2014.



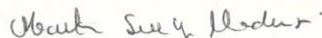
Prof. Dr. Narendra Narain

Presidente da Banca – Orientador (a)



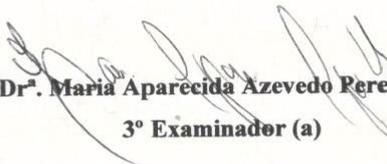
Prof. Dr.ª Luciana Cristina Lins de Aquino

Orientadora (a)



Prof. Dr.ª Marta Suely Madruga

2º Examinador (a)



Prof. Dr.ª Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva

3º Examinador (a)



Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

4º Examinador (a)



Mércia de Sousa Galvão

(Aluno (a) do Doutorado – RENORBIO)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sensatez e força nos momentos de dúvidas e aflição e por cuidar das pessoas que amo.

À meus filhos, Hawlmerson, Julius Caesar e Rafael, razão e amor incondicional.

Aos meus avós, pais e irmãos, infinitamente, por terem me ensinado os grandes valores da vida. Por vibrarem a cada vitória minha, pelo grande exemplo, cuidado, amor e dedicação, e por estarem tão presentes, mesmo estando distante.

Ao meu orientador, Prof. Narendra Narain, pela orientação e paciência ao longo dos anos que estivemos juntos, graduação, mestrado e doutorado. Sempre com palavras sábias e inspiradoras.

À Profa. Luciana, que foi mais que minha co-orientadora, apoio imprescindível em todas as etapas desse trabalho, transmitindo sempre força e coragem.

A todos os membros da banca examinadora que, com altruísmo e dedicação, permitiram que o processo até a defesa de tese fosse possível em um curto prazo. Muito obrigada pelas valiosas sugestões e correções.

A Profa. Jane Moreira, exemplo de dedicação que esteve sempre presente nos momentos de dúvidas com sua serenidade, colaborando da forma mais completa.

Ao “porão do LAF”: TT, ASF, Vivi, Moniquinha, Quel, Hannah e Patchel, sem vocês com certeza eu não teria conseguido! Não há palavras ou pensamentos que transmitam a gratidão pelo que vocês fizeram e fazem por mim. TT você é o maior exemplo de amizade que já conheci nessa vida!

A minhas companheiras de doutorado, Karen, Yzila e Mônica, que estiveram presentes em momentos críticos e especiais dessa caminhada.

À todos que passaram e ainda passam pelo LAF ao longo dessa jornada, em especial a Ana Lúcia (Luuuu), Michel (Mitchel), Antônio, Paulinha, Dannylo, Juliete, Katiúscia e a todos que contribuíram de alguma forma.

A minhas amigas de longe, Aninha, Janine e Sancha, que mesmo distantes estavam sempre presentes com palavras, saidinhas e conversas científicas valiosas.

As Empresas Pomar e a Maratá, pela doação dos resíduos.

Enfim, a todos que passaram pela minha vida nesses anos dedicados a vida acadêmica de graduação, mestrado e doutorado que, da sua maneira marcaram minha vida.

Obrigada!

RESUMO GERAL

A crescente demanda de aromas no mercado mundial exige novas estratégias de obtenção desses compostos. A obtenção via processos fermentativos utilizando substratos de baixo custo é uma alternativa economicamente viável e o aroma gerado é considerado como natural. Grandes volumes de resíduos na forma de bagaços, cascas, caroços ou sementes são gerados pelo processamento de frutas, e estes podem ser utilizados como substratos nesses processos fermentativos. Diante desse contexto, esse trabalho teve como principal finalidade utilizar resíduos agroindustriais para a produção de compostos voláteis de aroma através da fermentação submersa. Neste sentido, foi verificada a potencialidade da produção de compostos voláteis através da fermentação submersa utilizando resíduos de goiaba, maracujá e umbu como substratos utilizando microrganismos endófitos da goiaba, maracujá e umbu de cultura puras (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) para produzir compostos voláteis de aroma frutal ou floral. Inicialmente a polpa e os resíduos de goiaba, maracujá e umbu foram caracterizados quimicamente (umidade, cinzas, fibras, proteínas, lipídeos, açúcares, acidez titulável, Aw, pH e sólidos solúveis). Foram realizadas fermentações com os diferentes microrganismos em meio sintético, onde os produtos fermentados foram analisados sensorialmente. A partir dos resultados obtidos da análise sensorial, o resíduo de goiaba e a levedura *Kluyveromyces lactis* foram selecionados uma vez que estes apresentaram a melhor capacidade de produção de aromas. Os compostos voláteis produzidos foram capturados por duas técnicas de headspace (MEFS e *Purge & Trap*) e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram isolados 62 microrganismos, dentre estes seis foram selecionados e os produtos fermentados foram analisados por cromatografia gasosa como também as características de pH, sólidos solúveis e açúcar redutor para estabelecer a cinética do processo fermentativo a cada 24h durante cinco dias. As principais descrições de aroma para o fermentado de resíduo de goiaba foram frutal, mel, fruta verde, ameixa, goiabada, banana, fermento e álcool. Foram detectados 43 compostos voláteis no produto fermentado obtido pelo uso do resíduo de goiaba. Dentre os compostos identificados destacam-se: β -cariofileno, acetato de 2-feniletil, γ -humuleno, bisaboleno, humuleno, 3-metil butanol, bergamoteno, γ -cadineno, óxido de cariofileno e 2-feniletanol. A produção dos compostos voláteis foi bastante rápida, e na maioria dos casos, essa produção aconteceu a partir do primeiro dia de fermentação e teve o seu máximo entre 24-48h de fermentação. Segundo a análise da superfície de resposta, o processo de produção foi otimizado, onde a maior produção do acetato de 2-feniletil foi obtida em concentrações entre 25 a 35g/L de extrato de levedura, entre 40 a 60 g/L de glicose; do β -cariofileno foi obtido em concentrações entre 120 a 140g/L de resíduo de goiaba, e agitação entre 160 e 180 rpm enquanto a produção do 2-feniletanol foi obtida na agitação entre 228rpm e 5g/L de glicose. A partir dessas condições otimizadas foi possível realizar um escalonamento da produção desses compostos no biorreator e foi possível obter uma produção 6 vezes maior para os compostos 2-feniletanol e β -cariofileno, e 1,5 vezes para o acetato de 2-feniletil. Desta forma, neste trabalho verifica-se que o resíduo de goiaba e leveduras isoladas de frutas podem ser utilizados para produzir compostos de aroma de grande importância para a indústria de aromas e fragrâncias, como o acetato de 2-feniletanol, o 2-feniletanol e o β -cariofileno.

ABSTRACT

The increasing demand for flavors in the world market requires new strategies for obtaining these compounds which can be produced via fermentation processes using low cost substrates such as agroindustrial residues. This turns out to be a viable process and the aroma compounds generated are classified as natural. Large volumes of waste in the form of bagasse, husks, kernels or seeds including from the processing of fruit pulp are generated and these can be used as substrates in these fermentations. Thus the main purpose of this work was to use agro-industrial residues for the production of volatile aroma compounds by fermentation processes. In this regard, we investigated the potential of the production of volatile compounds by submerged fermentation using guava, passion fruit and umbu processing waste as substrates using endophytic microorganisms isolated from guava, passion fruit and umbu as well as by using the pure cultures (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis*) to produce volatile compounds characteristic of fruity or floral aroma. Initially the fruit pulp and wastes from the processing of guava, passion fruit and umbu were chemically characterized (moisture, ash, fiber, proteins, lipids, sugars, titratable acidity, Aw, pH and soluble solids). Fermentation with different microorganisms in synthetic medium was performed and the fermented products analyzed for aroma note. From the results of this sensory analysis, the guava residue and the yeast *Kluyveromyces lactis* were selected since these constituents in the medium produced fruity and floral aromas. The volatile compounds produced were captured by two headspace techniques (SPME and Purge & Trap) and analyzed in a system of gas chromatography coupled to mass spectrometry. Sixty-two microorganisms were isolated and out of these six were selected. The fermented products were analyzed for pH, soluble solids and reducing sugars as well as to establish the kinetics of the fermentation process at every 24 hours for five days. The main aroma descriptors in the fermented products were fruity, honey, fruity green, plum, guava, banana and alcohol type notes. Forty-three volatile compounds were detected in the fermented product obtained by using the Guava residue in the medium. Among the compounds identified were: β -caryophyllene, 2-phenylethyl acetate, γ -humulene, bisabolene, humulene, 3-methyl butanol, bergamoteno, γ -cadinene, caryophyllene oxide and 2-phenylethanol. The production of volatile compounds was quite rapid and in most cases, this production occurred on the first day of fermentation and had achieved its maximum concentration between 24-48h of fermentation. According to the response surface method analysis, the conditions of the manufacturing process were optimized. Increased production of 2-phenylethyl acetate was achieved at concentrations varying from 25 and 35g/L of yeast extract, 40 to 60 g/L glucose. β -caryophyllene was obtained at concentrations varying between 120 and 140g/L of guava waste, and an agitation performed between 160 and 180 rpm. The production of 2-phenylethanol was obtained at agitation varying from 228rpm and 5g/L glucose. From these optimized conditions, scale-up of fermentation was performed in a bioreactor wherein 6 times larger concentration of 2-phenylethanol and β -caryophyllene compounds, and 1.5 times higher concentration of 2-phenylethyl acetate were obtained. This study reveals that guava residue can be used to produce aroma compounds of great importance for the flavor and fragrance industry, the compounds being 2-phenylethyl acetate, 2-phenylethanol and β -caryophyllene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol.....	14
Tabela 2: Propriedades físicas e químicas do 2-FEA.....	16
Tabela 3: Microrganismos como produtores de aromas utilizando diversos substratos em diferentes tipos de processos fermentativos.....	24
Tabela 4: Classificação taxonômica do <i>A. niger</i>	35
Tabela 5: Composição química do farelo do resíduo de goiaba.....	39
Tabela 6: Composição química do resíduo de maracujá.....	42
Tabela 7: Composição química da polpa e resíduo de umbu.....	43
Tabela 8: Listagem dos microrganismos utilizados no experimento.....	79
Tabela 9: Composição físico-química de polpa e resíduo de goiaba, maracujá e umbu.....	93
Tabela 10: Total de microrganismos isolados e produtores de aromas.....	99
Tabela 11: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético.....	101
Tabela 12: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético.....	102
Tabela 13: Descrição dos aromas percebidos pelos provadores em meio sintético e meios com resíduo de maracujá (LAF3, LAF5 e LAF35) e goiaba (LAF9, LAF14 e LAF45).....	104
Tabela 14: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético e meio de resíduo de goiaba.....	105
Tabela 15: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá.....	106
Tabela 16: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF9 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	107
Tabela 17: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF14 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	108

Tabela 18: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF45 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	110
Tabela 19: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF3 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	112
Tabela 20: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF5 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	113
Tabela 21: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF35 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	114
Tabela 22: Compostos voláteis identificados nos produtos fermentados pelo uso de resíduo de goiaba .	121
Tabela 23: Variáveis e níveis codificados para os experimentos do planejamento fatorial fracionado	141
Tabela 24: Variáveis codificadas do planejamento fracionado	142
Tabela 25: Valores utilizados no DCCR para a produção de 2-FE.	142
Tabela 26: Valores utilizados no DCCR para a produção de 2-FEA.....	143
Tabela 27: Valores utilizados no DCCR para a produção de β -cariofileno.....	143
Tabela 28: Valores reais, codificados e variável resposta da matriz do planejamento fatorial fracionado para a produção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR	147
Tabela 29: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-FE e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) na produção do composto.....	150
Tabela 30: Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-FE.....	153
Tabela 31: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-FEA e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) na produção do composto.....	153
Tabela 32: Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-FEA.....	156
Tabela 33: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de β -cariofileno e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) do pico cromatográfico.	158
Tabela 34: Análise de variância (ANOVA) para a produção de CAR	160
Tabela 35: Quantificação dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR utilizando <i>Kluyveromyces lactis</i> em meio com resíduo de goiaba obtidos em Shaker e em Biorreator pelas técnicas de MEFS e <i>Purge and Trap</i>	188

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Parcelas de mercado dos setores individuais da indústria de flavor e fragrâncias.	20
Figura 2: Fluxograma geral da produção de polpa de fruta na indústria de alimentos.....	37
Figura 3: Dispositivo de MEFS com detalhes do aplicador (holder) e da fibra de sílica fundida.	46
Figura 4: Esquema das diferentes fibras de MEFS de acordo com o princípio de extração por absorção ou por adsorção.	47
Figura 5: Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos (fase estacionária) comerciais para MEFS.	47
Figura 6: Frutos de goiaba	78
Figura 7: Resíduo de goiaba antes e após moagem.....	78
Figura 8: Frutos e resíduo de maracujá	78
Figura 9: Frutos e resíduo (caroço) de umbu.....	78
Figura 10: Esquema de isolamento de microrganismos	84
Figura 11: Esquema de isolamento de microrganismos	85
Figura 12: Esquema de isolamento de microrganismos	86
Figura 13: Etapa da extração de compostos voláteis com a técnica MEFS.	88
Figura 14: Fluxograma da seleção do microrganismo para a produção de aroma.....	91
Figura 15: Fluxograma da seleção do resíduo para a produção de aroma.....	91
Figura 16: Comparação dos cromatogramas dos íons totais do produto fermentado obtido pelo uso de resíduo de goiaba extraídos por MEFS utilizando fibras de diferentes revestimentos.	98
Figura 17: Cromatogramas de resíduo de goiaba com programações de temperatura do forno 1 e 2.....	99
Figura 18: Notas de diversos aromas observados nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético	100
Figura 19: Notas de diversos aromas observados nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio sintético.....	101
Figura 20: Fotografias das placas das cepas selecionadas de goiaba	103
Figura 21: Fotografias das placas das cepas selecionadas de maracujá.....	103
Figura 22: Notas de diversos aromas percebidos nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético e meio de resíduo de goiaba.	104
Figura 23: Notas de diversos aromas percebidos nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio de resíduo de maracujá.	105

Figura 24: Acompanhamento do pH durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de maracujá.....	116
Figura 25: Acompanhamento do pH durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de goiaba.....	117
Figura 26: Acompanhamento do °Brix durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de maracujá..	117
Figura 27: Acompanhamento do °Brix durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de goiaba.....	118
Figura 28: Intensidade do aroma frutal ao longo da fermentação utilizando diversos microrganismos....	119
Figura 29: Intensidade do aroma frutal nos diferentes resíduos durante 96h.....	120
Figura 30: Cromatograma dos íons totais do produto fermentado do resíduo de goiaba obtido após 48h de fermentação (os números representam o composto correspondente da Tabela 21)	122
Figura 31: Cromatograma dos íons totais na análise de compostos voláteis dos produtos fermentados do resíduo de goiaba até 4 dias de fermentação (os números representam o composto correspondente da Tabela 21).....	124
Figura 32: Quantificação dos compostos 2-FEA e 2-FE produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.....	125
Figura 33: Quantificação dos alcoóis produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.	126
Figura 34: Quantificação dos principais terpenos produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.....	127
Figura 35: Teores de pH, Brix e ART nos produtos fermentados obtidos durante 4 dias de fermentação do meio contendo resíduo de goiaba.	128
Figura 36: Curva de calibração do 2-FEA	146
Figura 37: Curva de calibração do CAR	146
Figura 38: Diagrama de efeitos de Pareto para planejamento 2^{5-1} para a produção do 2-FE.	148
Figura 39: Diagrama de efeitos de Pareto para o planejamento 2^{5-1} para a produção do 2-FEA.....	149
Figura 40: Diagrama de efeitos de Pareto para planejamento 2^{5-1} para a produção do CAR.	149
Figura 41: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto 2-FE segundo as diversas condições do planejamento DCCR.....	151
Figura 42: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-FE.	152
Figura 43: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto 2-FEA nas diversas condições do planejamento DCCR.....	155
Figura 44: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto 2-FEA.....	156

Figura 45: Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-FEA demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura	157
Figura 46: Curvas de contorno para a produção do composto 2-FEA de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.	157
Figura 47: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto β -cariofileno nas diversas condições do planejamento DCCR.....	159
Figura 48: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma β -cariofileno.....	160
Figura 49: Superfície de resposta para a produção do composto de aroma β -cariofileno demonstrando o efeito da concentração de resíduo e agitação.....	161
Figura 50: Curvas de contorno para a produção do composto β -cariofileno de acordo com as variações nas concentrações de resíduo e agitação.	161
Figura 51: Acompanhamento da produção do 2-FE durante as 96h de fermentação da <i>Kluyveromyces lactis</i> usando resíduo de goiaba como substrato.	162
Figura 52: Acompanhamento da produção do 2-FEA durante as 96h de fermentação da <i>Kluyveromyces lactis</i> usando resíduo de goiaba como substrato.	163
Figura 53: Acompanhamento da produção do β -cariofileno durante as 96h de fermentação da <i>Kluyveromyces lactis</i> usando resíduo de goiaba como substrato.	163
Figura 54: Acompanhamento do pH durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.....	165
Figura 55: Acompanhamento do °Brix durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.....	165
Figura 56: Acompanhamento do ART durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.....	166
Figura 57: Cromatograma dos íons totais da produção do 2-FE no biorreator e no shaker	167
Figura 58: Cromatograma dos íons totais da produção do 2-FEA no biorreator e no shaker	167
Figura 59: Cromatograma dos íons totais da produção do β -cariofileno no biorreator e no shaker.....	168
Figura 60: Monitoramento da produção do 2-FE no shaker e no biorreator	169
Figura 61: Monitoramento da produção do 2-FEA no shaker e no biorreator.....	169
Figura 62: Monitoramento da produção do CAR no shaker e no biorreator	170
Figura 63: Monitoramento da produção do 2-FE obtido no fermentador utilizando a técnica do Purge & Trap	170

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	percentual
°Brix	Graus Brix
°C	graus Celsius
2-FE	2-feniletanol
2-FEA	Acetato de 2-feniletil
ABIAM	Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BOD	Biochemical oxygen demand
CAR	β-cariofileno
CEC	Council of the European Communities
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-O	Cromatografia gasosa-olfatometria
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
Da	Dalton
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DTA	Departamento de Tecnologia de Alimentos
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/carboxen/ polidimetilsiloxano
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FD	Fator de detecção
FDA	US Food and Drug Administration
FEMA	Federal Emergency Management Agency
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
g.L-1	grama por litro
GRAS	<i>Gerally Regarded As Safe</i>
h	horas
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAF	Instituto Brasileiro de Frutas
IK	Índice de Kovats
IOFI	International Organization of the Flavor Industry
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
IR	Índice de retenção
IRL	Índice de Retenção Linear
Kg	Quilo
L	Litros
LAF	Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas

LMA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
L-PHE	L-fenilalanina
MEFS	Micro extração em fase sólida
mg	Miligrama
min.	Minuto
mL	mililitro
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	nanômetro
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
pH	Potencial hidrogeniônico
PROCTA	Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Q	Coeficiente quadrático
QPS	Qualified Presumption of Safety
rpm	Rotação por minuto
SAS	Statistical Analysis System
SmF	Fermentação submersa
SSF	Fermentação estado sólido
t	Tempo (h)
TR	Tempo de retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFS	Universidade Federal de Sergipe
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
µg	micrograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
APRESENTAÇÃO	1
INTRODUÇÃO	2
Referências bibliográficas	4
OBJETIVOS.....	9
Objetivo Geral:.....	9
Objetivos Específicos	9
CAPÍTULO 1	10
PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	10
1.1. INTRODUÇÃO	10
1.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	11
1.2.1 Ácidos.....	12
1.2.2 Alcoóis.....	12
1.2.3 Aldeídos	14
1.2.4 Cetonas	15
1.2.5 Ésteres.....	15
1.2.6 Lactonas	17
1.2.7 Pirazinas	17
1.2.8 Sulfurados	17
1.2.9 Terpenos	18
1.3. INDÚSTRIA E MERCADO DE AROMAS.....	18
1.4. AROMAS NATURAIS E SINTÉTICOS.....	20
1.5. BIOAROMAS.....	22
1.6. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS.....	35
1.6.1 <i>Aspergillus niger</i>	35
1.6.2 <i>Kluyveromyces marxianus e lactis</i>	35
1.7. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POTENCIAIS PRODUTORES DE COMPOSTOS DE AROMAS	36

1.7.1 Goiaba	38
1.7.2 Maracujá	41
1.7.3 Umbu	43
1.8. METODOLOGIA DA PESQUISA DO SABOR	44
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 2	72
SCREENING DE MICRORGANISMOS E SELEÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA BIOPRODUÇÃO DE AROMA	72
Resumo	72
CHAPTER 2	74
SCREENING OF MICROORGANISMS AND SELECTION OF AGROINDUSTRIAL WASTE FOR AROMA BIOPRODUCTION	74
Abstract.....	74
2.1 INTRODUÇÃO	76
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
2.2.1 Local de execução	77
2.2.2 Frutas	77
2.2.3 Resíduos agroindustriais	77
2.2.4 Microrganismos	79
2.2.5 Manutenção das cepas	79
2.2.6 Equipamentos	79
2.2.7 Reagentes, padrões químicos e meios de culturas:.....	80
2.2.8 Determinação físico-química das polpas e dos resíduos.....	80
2.2.8.1 Umidade.....	80
2.2.8.2 Cinzas	80
2.2.8.3 Fibras.....	80
2.2.8.4 Proteínas	80
2.2.8.5 Lipídios	81
2.2.8.6 Açúcares.....	81
2.2.8.7 pH.....	81
2.2.8.8 Sólidos solúveis	81
2.2.8.9 Atividade de água	82
2.2.8.10 Acidez total titulável	82

2.2.9 Testes preliminares (seleção da fibra e otimização das condições de análises cromatográficas dos compostos voláteis)	82
2.2.10 Isolamento e seleção de microrganismos endófitos	82
2.2.10.1 Esterilização superficial das amostras:	82
2.2.10.2 Isolamento dos microrganismos	83
2.2.10.3 Seleção dos microrganismos endófitos	86
2.2.10.4 Análise dos compostos voláteis	87
2.2.10.4.1 Análise dos compostos através da técnica MEFS	87
2.2.10.4.2 Análise dos compostos através da técnica <i>Purge and Trap</i>	88
2.2.10.4.3 Identificação e quantificação de compostos voláteis	89
2.2.10.5 Análise dos compostos não voláteis	89
2.2.11 Seleção do resíduo e microrganismo com potencial produtor de aromas	90
2.2.11.1 Obtenção do pré-inóculo	90
2.2.11.2 <i>Screening</i> dos microrganismos potenciais produtores de aromas:	91
2.2.11.3 Seleção dos resíduos potenciais produtores de aromas:	91
2.2.11.4 Análise sensorial dos produtos fermentados	92
2.2.11.5 Análise dos compostos voláteis e não voláteis	92
2.2.11.5.1 Análise de compostos não voláteis	92
2.2.11.5.2 Análise dos compostos voláteis	92
2.2.12 Análise estatística	92
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
2.3.1 Determinação físico química da polpa e dos resíduos obtidos após processamento de polpas de frutas	92
2.3.2 Seleção da fibra	96
2.3.3 Otimização das condições de análises cromatográficas dos compostos voláteis	98
2.3.4 Isolamento dos microrganismos a partir das diversas frutas (goiaba, maracujá e umbu)	99
2.3.4.1 Seleção do microrganismo	99
2.3.4.2 Fermentação por microrganismos selecionados no meio contendo resíduos agroindustriais	102
2.3.4.3 Análise dos compostos voláteis	106
2.3.4.4 Acompanhamento de pH e °Brix	116
2.3.5 Seleção do microrganismo promissor produtor de aromas frutais	118
2.3.6 Seleção do resíduo agroindustrial com potencial para a bioprodução de aroma frutal/floral	119
2.3.6.1 Análise dos compostos voláteis	120

2.3.6.2 Monitoramento da produção dos compostos voláteis de aroma durante a fermentação.....	123
2.3.6.3 Análises de compostos não voláteis.....	127
2.4 CONCLUSÕES.....	129
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
CAPÍTULO 3.....	137
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA O MELHOR RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA.....	137
Resumo.....	137
CHAPTER 3.....	138
OPTIMIZATION OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS CONDITIONS FOR BETTER YIELD IN VOLATILE AROMA PRODUCTION.....	138
Abstract.....	138
3.1. INTRODUÇÃO.....	139
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	140
3.2.1 Local de execução.....	140
3.2.2 Resíduos agroindustriais:.....	140
3.2.3 Microrganismo.....	140
3.2.4 Equipamentos.....	140
3.2.5 Metodologia experimental.....	140
3.2.5.1 Obtenção do inóculo.....	140
3.2.5.2 Otimização das condições de fermentação para a produção de aroma frutal utilizando o resíduo de goiaba e a levedura <i>Kluyveromyces lactis</i>	141
3.2.5.3 Planejamento do tipo Composto Central Rotacional (DCCR).....	142
3.2.5.4 Análise estatística.....	143
3.2.5.5 Produção dos compostos de aroma em escala de biorreator.....	143
3.2.5.6 Análise dos compostos não voláteis.....	144
3.2.5.7 Captura e separação dos compostos voláteis.....	144
3.2.5.7.1 Análise dos compostos voláteis pela técnica de MEFS:.....	144
3.2.5.7.2 Análise dos compostos voláteis pela técnica de <i>Purge & Trap</i> (P&T):.....	144
3.2.5.8 Identificação e quantificação de compostos voláteis.....	145
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	145
3.3.1 Seleção de parâmetros significativos para a produção dos compostos de aroma através do planejamento fatorial fracionado.....	145

3.3.2. Otimização do processo biotecnológico para a produção dos compostos de aroma	149
3.3.2.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o 2-FE.....	150
3.3.2.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o 2-FEA	153
3.3.2.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o β -cariofileno	158
3.3.3 Monitoramento da produção dos compostos de aroma durante a fermentação	162
3.3.4 Cinética do consumo de substrato e variação de pH e °Brix.....	164
3.3.5 Processo biotecnológico para a obtenção de compostos de aroma em biorreator de bancada	166
3.3.5.1 Análise dos compostos de interesse através da técnica MEFS.....	166
3.3.5.2 Análise dos compostos de interesse através da técnica <i>Purge and Trap</i>	170
3.4 CONCLUSÕES.....	172
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
CONCLUSÕES	176
APÊNDICE	177

APRESENTAÇÃO

A Tese de Doutorado intitulada “Processo biotecnológico para obtenção dos compostos 2-feniletanol, acetato de 2-feniletíl e β -cariofileno pela utilização de resíduo de goiaba” foi estruturada em três capítulos, na forma de artigos, nos quais foram abordados (i) uma revisão bibliográfica sobre a produção biotecnológica de compostos voláteis utilizando resíduos agroindustriais como substratos; (ii) *Screening* de microrganismos e seleção de resíduos agroindustriais para bioprodução de aroma e (iii) Otimização das condições do processo fermentativo para o melhor rendimento na produção de compostos voláteis de aroma.

INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, as frutas tem grande importância na alimentação do homem, que se deslocava em busca de alimentos em função da sua sazonalidade. A diversidade climática, solos férteis e disponíveis, torna o Brasil com grande potencial produtivo. Aliado a isso, temos uma crescente demanda de frutas tropicais no mercado internacional colocando o Brasil como um dos mais promissores países a dominar este mercado. Neste cenário, o Brasil destaca-se na produção mundial de frutas como um dos maiores produtores de frutas, com uma produção superior a 43 milhões de toneladas em 2011, representando cerca de 5% da produção mundial (FAO, 2013).

A região Nordeste destaca-se pela atividade intensa de fruticultura tropical e subtropicais tais como manga, melão, uva, laranja, etc. As frutas são processadas para produção de sucos, polpas, doces, néctares e comercializados tanto no mercado interno como exportados para outros países, o que resulta em grandes volumes de resíduos na forma de bagaços, cascas, caroços ou sementes que devem ser adequadamente dispostos. Esses resíduos possuem alto valor nutricional, ricos em proteínas, enzimas e óleos essenciais que podem ser utilizados como substratos em bioprocessos para a produção e obtenção de produtos com valores diferenciados e apreciados, tais como a produção de aroma (Laufenberg, *et al.*, 2003; Dhillon *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2011; Ayala-Zavala, *et al.*, 2011; Dhillon *et al.*, 2013). Dentre os resíduos disponíveis podemos destacar os resíduos de goiaba, maracujá e umbu, frutos produzidos na região e bastante utilizados pelas indústrias de processamento de sucos do Estado.

De acordo com os dados do IBGE (2012) são produzidos mais de 300 mil toneladas de goiaba anualmente, onde mais de 60% é destinado ao seu processamento gerando cerca de 70 mil ton de resíduo de goiaba. O maracujá também tem uma produção expressiva produzindo mais de 900 mil ton desse fruto, e cerca de 40% destinado ao processamento na forma de polpa e suco, gerando cerca de 250 mil ton de resíduo de maracujá. O umbu é produzido em menor escala (9 mil ton/ano), no entanto a maior parte da produção é realizada no Nordeste (94%), onde quase 2 mil ton são destinadas ao processamento.

Aromas são componentes importantes para indústria de alimentos e representam cerca de ¼ do mercado mundial de aditivos alimentícios movimentando em torno de 22 bilhões de dólares por ano (Dubal *et al.*, 2008; Leffingwell, 2013).

Os aromas sintéticos, por serem oriundos de síntese química, vêm sendo substituídos gradativamente pelos de origem enzimática ou fermentativa, em função das novas exigências do consumidor por produtos naturais (Bicas *et al.*, 2010; Dhillon *et al.*, 2013). Em alguns países, como o Japão e Alemanha, por exemplo, o consumo de aromas sintetizados quimicamente tem

diminuído em função de regulamentações que favorecem os produtos obtidos de fontes naturais (Huang et al., 2001; Maróstica & Pastore, 2007).

Diferentemente dos processos químicos, que requerem temperaturas e pressões extremas, as conversões microbianas ocorrem sob condições brandas e, em alguns exemplos, os produtos são formados estereosseletivamente. Vários microrganismos, tais como bactérias e fungos, são reconhecidos por sua capacidade de sintetizar diferentes compostos de aroma. A produção de aromas por via biotecnológica apresenta inúmeras vantagens: os produtos são legalmente reconhecidos como substâncias naturais, a estereosseletividade é garantida pela alta especificidade dos biocatalisadores e as influências externas adversas como fatores climáticos, sazonalidade e problemas ambientais podem ser negligenciados. Além disso, a via biotecnológica permite a obtenção de produtos mais concentrados e, assim, diminui seu custo de extração (Berger, 1995; Demyttenaere & De Kimpe, 2001; Luerce, 2002; Damasceno et al., 2003). Podemos, ainda, acrescentar que o rendimento do produto pode ser maximizado por uma estirpe adequada ou otimização do processo, e os custos de produção podem ser minimizados através da utilização de materiais de partida baratos (Rungsardthong & Noomhom, 2005).

Dentro desse contexto, o aproveitamento de resíduos agroindustriais como fonte de carbono em bioprocessos vem sendo bastante pesquisado. Segundo o IPEA (2012), os principais setores da agroindústria geram cerca de 290 milhões de toneladas/ano de resíduos sólidos, e a sua utilização como substrato em processos fermentativos, minimizaria problemas ambientais causados pelo acúmulo destes compostos no ambiente, além de gerar produtos de grande relevância industrial com grandes benefícios para o país. Podemos destacar a aplicação desses resíduos em bioprocessos para obtenção de produtos de alto valor agregado como papel e celulose (Prasertsan & Prasertsan, 1996), enzimas (Antier et al., 1993; Boccas *et al.*, 1994; Bravo *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 2000; Kapoor et al., 2000; Dhillon *et al.*, 2004; Oliveira et al., 2006; Damaso et al., 2008; Mamma et al., 2008; Guimarães et al., 2009; Souza et al., 2010; Santos et al., 2011; Onofre et al., 2012), ácidos orgânicos (Vandenberghe et al., 2000; John et al., 2006; Chenyu et al., 2008; Imandi et al., 2008; Sharma et al., 2008; Mafakher et al., 2010; Dhillon et al., 2011), antibióticos (Adinarayana et al., 2003; Ellaiah et al., 2004), compostos bioativos (Vattem & Shetty, 2003; Hernández et al., 2008), pigmentos (Fregova et al., 1994; Aksu & Eren, 2005; Tinoi et al., 2005) e compostos voláteis (Medeiros et al., 2000; Soccol & Vandenbergue, 2003; Laufenberg, *et al.*, 2003; Ramos et al., 2008; Rossi et al., 2009; Aggelopoulos et al., 2014; Paraskevopoulou & Mantzouridou, 2014).

Entretanto, estudos utilizando resíduos de frutas são escassos, e a maioria deles visa à obtenção de enzimas: polpa de maçã (Berovic & Ostroversnik, 1997; Liu et al., 2008), coco verde (Coelho et al., 2001), resíduo de morango e maçã (Zheng & Shetty, 2000), resíduo de citros (Mamma et al., 2008), resíduo de maracujá (Souza et al., 2010), resíduo de manga (Santos et al., 2011).

Na literatura consultada foram registrados poucos trabalhos utilizando resíduos de frutas como substrato para a produção de compostos voláteis, destacando-se bagaço de maçã (Bramorski et al., 1998; Christen et al., 2000; Medeiros et al., 2000); casca de coco verde (Ramos et al., 2008), resíduo de citrus (Rossi et al., 2009; Aggelopoulos et al., 2014; Paraskevopoulou & Mantzouridou, 2014). Estes estudos têm chamado atenção das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica que têm compostos naturais e que, em pouco tempo, deve dinamizar esta área de pesquisa. Diante do exposto, é incontestável o estudo na otimização da bioprodução de compostos voláteis de aroma utilizando substratos disponíveis como os resíduos de frutas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos resíduos agroindustriais em produzir aromas através de fermentação submersa, como também otimizar as condições do processo biotecnológico para obtenção de compostos de aroma promissores tais como: β -cariofileno, 2-feniletanol e acetato de 2-fenil.

Referências bibliográficas

- Adinarayana, K.; Prabhakar, T.; Srinivasulu, V.; Rao, M. A.; Lakshmi, P. J.; Ellaiah, P. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, v.39, p.171-177, 2003.
- Aggelopoulos, T.; Katsieris, K.; Bekatorou, A.; Pandey, A.; Banat, I.M.; Koutinas, A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, v.145, p.710–716, 2014.
- Aksu, Z.; Eren, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, v. 40, p.2985-2991. 2005.
- Antier, P.; Minjares, A.; Roussos S.; Raimbault, M.; Viniestra-Gonzalez, G. Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbial Technology*, p 15254-26, 1993.
- Ayala-Zavala, J.F.; Vega-Vega, V.; Rosas-Domínguez, C.; Palafox-Carlos, H.; Villa-Rodriguez, J.A.; Wasim Siddiqui, Md.; Dávila-Aviña, J.E.; González-Aguilar, G.A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, v. 44, p. 1866-1874, 2011.
- Berovic, M.; Ostroversnik, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology, Amsterdam*, v. 53, n. 1, p. 47-53, 1997.
- Berger, R. G. (1995). Aroma compounds from microbial De Novo synthesis. In: *Aroma Biotechnology*. p. 51-75, Ed. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 240p.
- Bicas, J.L.; Dionísio, A.P.; Pastore, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. *Chemical Reviews*, v.109, p. 4518-4531. 2009.

Boccas, F.; Roussos, S.; Gutierrez, M.; Serrano, L.; Viniegra, G.G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science Technology*, v.31, p.22-26, 1994.

Bramorski, A.; Soccol, C. R.; Christen, P.; Revah, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiologia* v. 29, p. 208-212, 1998.

Bravo, C.E.C.; De Carvalho, E.P.; Schwan, R.F.; Gómez, R.J.H.C.; Pilon, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 24, p.137-152, 2000.

Castilho, L.R.; Alves, T.L.M.; Medronho, R.A. Production and extraction of pectinases obtained by solid fermentation of agro industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.71, p. 45-50, 2000.

Chenyu, D.; Lin, S.K.C.; Koutinas, A.; Wang, R.; Dorado, P.; Webb, C. A wheat biorefining strategy base on solid-state fermentative production of succinic acid. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8310-8315, 2008.

Christen, P.; Bramorski, A.; Revah, S.; Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grow on agroindustrial solid wastes. *Bioresource Technology*, v. 8, 211-215, 2000.

Coelho, M.A.Z.; Leite, S.G.F.; Rosa, M.F. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *Boletim CEPPA*, v. 19, p.33-42, 2001.

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.

Damaso, M.C.T.; Passianoto, M.A.; Freitas, S.C.; Freire, D.M.G.; Lago, R.C.A.; Couri, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, n.4, p.676-681, 2008.

Demyttenaere, J.; Kimpe, N. Biotransformation of terpenes by fungi study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 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*. *International Journal of Environmental Studies*, v. 61, p.199-210, 2004.

Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, p.83-92, 2011.

Dhillon, G.S.; Kaur, S.; Brar, S.K. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.27, p.789–805, 2013.

Dubal, S.A.; Tilkari, Y.P.; Momin, S.A.; Borkar, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced Biotech*, v.20, p.20-31, 2008.

Ellaiah, P.; Srinivasulu, B.; Adinarayana, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.39, p.529-534, 2004.

FAO. Agricultural Statistics. 2009. Disponível em: <www.faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 15 jan. 2013.

Guimarães, L. H. S., Somera, A. F., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M.; Jorge, J. A. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochemistry*, v.44, p. 237-241, 2009.

Hernández, J. S.; Aguilera-Carbó, A. F.; Herrera, R. R.; Martínez, J. L.; Aguilar, C. N. Kinetic production of the antioxidant ellagic acid by fungal solid state culture. *Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference*. Portugal: CHEMPOR, p.1849-1854, 2008.

Huang, C.-Jr; Lee, S.-L.; Chou, C.-C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Research International*, 34, n.4, p.277-282, 2001.

Imandi, S. B.; Bandaru, V.V.R.; Somalanka, S.R.; Bandaru, S.R.; Garapati, H.R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4445-4450, 2008.

IPEA. Plano Nacional de Resíduos Sólidos: diagnóstico dos resíduos urbanos, agrosilvopastoris e a questão dos catadores. *Comunicados do IPEA*, n. 145. 2012.

John, R. P.; Nampoothiri, K. M.; Pandey, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, v.41, p.759-763, 2006.

Kapoor, M.; Beg, Q.K.; Bhushan, B.; Dadhich, K.S.; Hoondal, G.S. Production and partial purification and characterization of a thermo alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*, 36, p. 467-473, 2000.

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

Leffingwell. The Flavor & Fragrance Market Disponível em < <http://www.leffingwell.com>>. Acesso em 15 jan. 2013

Liu, C.; Sun, Z.-T.; Du, J.-H., Wang, J. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. *Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology*, v.35, p.703–711, 2008.

Luerce, R.F. Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa*. 70f. Dissertação. Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

Mafakher, L.; Mirbagheri, M.; Darvishi, F.; Nahvi, I.; Esfahani, H.Z.; Emtiazi, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology*, v. 27, p.337-340, 2010.

Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, v.99, p.2373-2383, 2008.

Maróstica Júnior, M.R.; Pastore, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, v.30, p. 382-387, 2007.

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.

Oliveira, L. A.; Porto, A. L. F.; Tambourgi, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresources Technology*, v.97, p.862-867, 2006.

Onofre, S.B.; Groff, S.A.; Sartori, A., Bertolini, J.; Kagimura, F.Y.; Rotta, D.; Mazzali, L.; Steilmann, P. Production of α -amylase and amyloglucosidase by the fungus *Cylindrocladium* sp. in semi-solid state fermentation. *Journal of Microbiology Research*, v. 2, p. 123-126, 2012.

Paraskevopoulou, A.; Mantzouridou, F. Exploitation of Orange Peel for the Production of Flavor-Active Compounds with the Use of a Commercial Wine Strain. *Flavour Science, Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, p.613-617, 2014.

Prasertsan, S., Prasertsan, P. Biomass residues from palm oil mills in Thailand: an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy*, v.11, p.387–395, 1996.

Ramos, A. S.; Fiaux, S. B.; Leite, S. G. F. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 712-717, 2008.

Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Soares, I. B.; Maior, A.M.S.; Baudel, H.M.; Abreu, C.A.M. Dilute Mixed-Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Biomass and Bioenergy* v.35, p.663-670, 2011.

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.

Rungsardthong, V.; Noomhoom, A. Production of 2-acetyl-1-pyrroline by microbial cultures. *Flavour Fragrances Journal*, v.20, p.710–714, 2005.

Santos, T.C.; Cavalcanti, I.S.; Bonomo, R.C.F.; Santana, N.B.; Franco, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, v.41, p.2210-2216, 2011.

Sharma, A.; Vivekanand, V.; Singh, R. P. Solid state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, v.99, p.3444-3450, 2008.

Soccol, C.R.; Vandenbergue, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v.13. 2003.

Souza, R.L.A.; Oliveira, L.S.C.; da Silva, F.L.H.; Amorim, B.C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, p.987-992, 2010.

Tinoi, J.; Rakariyathama, N.; Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, v.40, p.2551–2557, 2005.

Vandenberghe, L. P. S.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; Lebeault, J-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.74, p.175-178, 2000.

Vattem, D. A.; Shetty, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, v.39, p.367-379, 2003.

Zheng, Z.; Shetty, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 8, 825-830, 2000.

OBJETIVOS

Objetivo Geral: Utilizar resíduos gerados pela indústria de processamento de polpas dos frutos de goiaba, maracujá e umbu como substratos para a produção de compostos voláteis de aroma através de fermentação submersa e otimizar as condições do processo biotecnológico.

Objetivos Específicos

- Determinar as características físico-químicas da polpa e dos resíduos dos processamentos de polpas de goiaba, maracujá e umbu;
- Isolar e selecionar microrganismos endófitos a partir das frutas de goiaba, maracujá e umbu com potencial para produção de aromas promissores mediante análise sensorial;
- Avaliar sensorialmente as notas dos aromas e determinar instrumentalmente os compostos de aroma produzidos na fermentação dos resíduos das frutas com os microrganismos endófitos selecionados;
- Verificar a eficácia de culturas puras (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) utilizadas em meio sintético para a produção de aroma mediante a análise sensorial do aroma dos produtos fermentados;
- Selecionar o melhor resíduo agroindustrial entre os resíduos de goiaba, maracujá e umbu, para a produção de aroma por cultura pura selecionada em fermentação submersa;
- Separar, identificar e quantificar os compostos voláteis de aroma nos produtos fermentados através da técnica analítica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa;
- Otimizar as condições de fermentação (composição do meio de cultura, agitação e temperatura) para a obtenção de compostos voláteis de aroma;
- Verificar o potencial do processo fermentativo realizado em escala de bancada e no biorreator.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

1.1. INTRODUÇÃO

O interesse no estudo da biotransformação para a produção de compostos de interesse comercial tais como produção de enzimas, aromas, corantes, biossurfactantes, biopesticidas, ácidos orgânicos, alimentos fermentados, biorremediação e biodegradação de compostos e detoxificação biológica de resíduos agroindustriais é imenso e pode ser considerado uma consequência da demanda por insumos de menor custo (Pandey et al., 2000; Coelho et al., 2001; Battestin et al., 2005). O estudo sobre a obtenção de aromas a partir de resíduos de frutas tem chamado a atenção dos pesquisadores, onde verifica-se que é possível extrair aromas de resíduos agroindustriais para a aplicação na indústria de alimentos, uma vez que microrganismos existentes nos próprios resíduos podem produzir diversos aromas de forma natural.

A produção biotecnológica de aromas naturais é bastante estimulada pela demanda dos consumidores por produtos naturais e saudáveis, aumentando as pesquisas na produção microbiana dos chamados “bioaromas” enquanto a produção convencional de aromas envolve um processo químico (sintético). A obtenção de aromas por esta nova tecnologia é realizada de forma natural, via fermentação, a partir do uso de material orgânico. Sendo assim, o aspecto inovador desta tecnologia é o próprio produto, que é diferenciado dos demais por ser totalmente natural, além do estabelecimento das condições ótimas para sua obtenção (Li et al., 2012).

Por outro lado os resíduos agroindustriais são fontes de carbono proporcionando um meio importante para redução de custos de fermentação e minimizar problemas ambientais causados pela sua disposição, o que representa uma solução econômica e interessante para os países com uma abundância destes materiais, como é o caso do Brasil (Galembeck, 2010; Virmond et al., 2013). Acompanhando o cenário nacional, a fruticultura no Estado de Sergipe está em plena expansão com a presença de empresas promissoras de processamento de frutas e as mesmas geram grandes volumes de resíduos, que constituem matérias-primas naturais de baixo custo, justificando o desenvolvimento deste trabalho. Desta forma, pretende-se dar acesso ao conhecimento aprofundado de uma tecnologia promissora, como, por exemplo, a produção biotecnológica de compostos voláteis utilizando resíduos agroindustriais, e assim visando a contribuição com impactos ambientais e sociais positivos.

1.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS

Os compostos voláteis de aroma são resultados das misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações (Uenojo & Pastore, 2006).

O estudo dos compostos voláteis tem grande importância na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica e química movimentando 20 bilhões de dólares, sendo que as 10 maiores empresas representam 73% desse mercado (Leffingwell, 2013). Atualmente, a Europa é o maior mercado consumidor de aromas e fragrâncias, representada pelas Empresas Givaudan e Firmenich com cerca de 50% desse mercado, refletindo a tradição de manipulação e fabricação de perfumes pelos países do velho continente (Speziali, 2012). Apesar do mercado de aromas ser bem consolidado e um grande número de compostos identificados, não existem relação destes compostos e sua aplicação industrialmente (Pinheiro & Pastore, 2004).

Compostos de aroma são resultantes principalmente do metabolismo secundário de plantas e microrganismos (Heath & Reineccius, 1986; Hamilton-Kemp et al., 1996). Metabólitos primários tais como açúcares e aminoácidos são essenciais para o crescimento celular e também podem contribuir com notas de sabor e odor. Por exemplo, alguns peptídeos são doces, enquanto outros são amargos ou salgados (Scharpf et al., 1986). Contrariamente, os metabólitos secundários são substâncias que não são necessárias para a síntese celular (Scharpf et al., 1986; Abraham & Berger, 1994). Entre as principais classes de compostos voláteis, os alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, terpenos e lactonas podem ser classificados nesta categoria de metabólitos secundários, além de outras moléculas complexas resultantes do metabolismo secundário de plantas ou de fontes animais (Hamilton-Kemp et al., 1996; Valduga et al., 2010). Os ésteres formados dos fungos, também são exemplos de metabólitos secundários, como mecanismo de remoção de ácidos e alcoóis do meio, pois o seu acúmulo seria tóxico para o microrganismo (Scharpf et al., 1986; Gatfield, 1995; Pinheiro & Pastore, 2004; Valduga et al., 2010).

Os compostos voláteis para fins alimentícios são obtidos através de processos sintéticos (química fina), por ação microbiana, originários de metabólitos de plantas ou, em menor escala, de fontes animais. No entanto, a pesquisa de compostos voláteis é bastante complexa, pois além de apresentar diferentes propriedades químicas e estarem presentes em baixas concentrações, esses compostos são termolábeis, onde qualquer elevação de temperatura poderá resultar em diversas reações químicas (rearranjos, hidrólise, oxidações, ciclizações, etc.) (Bicas et al., 2010).

Compostos voláteis podem ser formados a partir do metabolismo de lipídios, aminoácidos e carboidratos. No metabolismo dos lipídios os produtos primários formados são aldeídos e cetonas, como também quantidades substanciais de ácidos, alcoóis, lactonas e ésteres

são produzidos pelas reações de oxidações, reduções e esterificações. As diferentes vias que ocorrem esses processos incluem a β -oxidação, clivagem de hidroxiácidos (produção de lactonas) e a oxidação via enzimas lipoxigenases. O metabolismo dos aminoácidos produz muitos compostos de aroma tais como alcoóis metílicos ramificados, ésteres, cetonas, compostos voláteis que contêm enxofre. Alguns compostos voláteis têm origem na tirosina e fenilalanina, como é o caso do eugenol (Heath & Reineccius, 1986).

A importância de alguns compostos voláteis para o aroma, assim como sua origem, está resumida a seguir, considerando-se as distintas classes químicas a que pertencem.

1.2.1 Ácidos

Poucos ácidos orgânicos encontrados durante o processo fermentativo são suficientemente voláteis para contribuir com seu aroma. Porém, tem grande contribuição por serem substratos para a biossíntese de outros compostos de aroma tais como em produtos lácteos (Armstrong & Brown, 1994). Os ácidos carboxílicos são relativamente baratos e de grande importância para a indústria de aromas, seja pelo seu intenso aroma ou como substrato em reações enzimáticas (Schrader et al., 2004). Os ácidos propanóico, 2-metilpropanóico e 3-metilpropanóico são produtos laterais do metabolismo de proteínas das leveduras, enquanto os ácidos graxos lineares saturados com número par de átomos de carbono surgem do metabolismo dos lipídios (Sponholz et al., 1981).

1.2.2 Alcoóis

Alcoóis primários e secundários destacam-se como compostos de aroma importantes para os alimentos. São os menores contribuintes para o aroma, a não ser que estejam presentes em altas concentrações (ppm), ou seja, insaturados (p.ex. octen-3-ol). Os alcoóis são importantes como precursores para futuras bioconversões, como, por exemplo, para ésteres e aldeídos (Armstrong & Brown, 1994). Os alcoóis nunca foram considerados como fator de qualidade, pois a maioria apresenta odor desagradável; com algumas exceções, como o 2-feniletanol (2-FE) foi descrito com notas agradáveis como “de perfume” (Etiévant, 1991). Além disso, os alcoóis terpênicos (linalol, geraniol, nerol, α -terpineol, etc.) contribuem positivamente na qualidade aromática. Alcoóis com mais de 2 átomos de carbono e com ponto de ebulição superior ao etanol são chamados de alcoóis superiores ou fúseis. A maioria dos alcoóis fúseis é formada como produtos laterais da fermentação (Bidan, 1975).

Alcoóis podem surgir da via metabólica primária de um microrganismo ou pela redução de uma carbonila ao álcool correspondente. A produção de um álcool através do metabolismo de aminoácidos pode ocorrer por transaminação, descarboxilação e redução ou por desaminação oxidativa seguida de descarboxilação e redução. Nas duas vias de produção o produto é sempre

um aminoácido menos um grupo amino e um átomo de carbono Na fermentação alcoólica, além do etanol, a levedura produz alcoóis de cadeia longa e complexa. Estes compostos e os seus ésteres derivados têm interessantes propriedades organolépticas. (Heath & Reineccius, 1986).

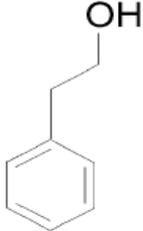
2-Feniletanol (2-FE)

Um dos álcoois aromáticos mais relevantes é o 2-FE, o qual possui aroma semelhante a rosas. Sua principal aplicação é na indústria de fragrâncias e em menores volumes, na indústria de alimentos para aumentar o sabor e aroma de bebidas leves, bombons, biscoitos e outros alimentos (Etschmann et al., 2003; Sendovski *et al.*, 2010). Além disso, é considerado como o segundo álcool mais usado em perfumaria e em cosméticos (Etschmann et al., 2004). A fragrância de rosas é altamente desejada e popular (Etschmann et al., 2002). É ainda predominantemente sintetizado por vias petroquímicas de tolueno, benzeno, estireno, ou metilfenilacetato, enquanto que o natural 2-FE é extraído a partir de pétalas de rosa, principalmente através de um processo de alto custo, com baixo rendimento (Serpe et al., 2003). O óleo essencial de rosas pode, dependendo da variedade, conter mais de 60% de 2-FE (Schrader et al., 2004), porém em muitos casos, as concentrações de óleo são muito baixas (Etschmann et al., 2002). Pelo seu alto custo, o 2-FE é gerado quimicamente, minimizando os custos de sua utilização pela indústria. Anualmente, em torno de 10.000 ton de 2-FE são produzidas, a maioria através da síntese química (Hua & Xu, 2011), cuja desvantagem é o custo elevado para a purificação desse composto e a geração de resíduos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Enquanto na forma sintética, o 2-FE custa US\$122/Kg e na forma natural custa US\$4725 (Sigma, 2013). De acordo com Adams et al. (2005), o 2-FE não é mutagênico e nem tóxico.

Diferentes estirpes de levedura tais como *Hansenula anomala*, *K. marxianus* ou *Saccharomyces cerevisiae* mostraram um elevado potencial para a produção industrial desse composto aromático, o qual é derivado a partir de 2-fenilalanina por bioconversão. Assim, verifica-se que este composto possui grande interesse industrial (Fabre et al., 1999). Segundo Stark et al. (2003), ele pode ser adicionado para modificar certas composições de aromas, especialmente em formulações de notas frutadas, onde contribui organolepticamente. Na Tabela 1 estão representadas as principais características físicas e químicas do 2-FE.

A maioria dos compostos químicos possui várias nomenclaturas: por exemplo, o álcool fenilético ou 2-feniletanol é conhecido como álcool 2-fenilético, álcool β -fenilético, benzil carbinol, β -hidroxi-etil-benzeno. Assim sendo, está incluído no catálogo FEMA-GRAS, de compostos seguros para serem utilizados em alimentos como substâncias flavorizantes, e está cadastrado sob o número 2858.

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas do 2-feniletanol

Propriedades	Descrição
Características	líquido incolor com um cheiro de pétalas de rosa e mel
Coloração	Líquido incolor
Densidade à 20°C	1,0202 g/cm ³
Fórmula espacial	
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀ O
Índice de refração à 20°C	1,5325
Massa molecular	122,16 g/mol
Ponto de ebulição (101,3 Kpa)	219-221°C
Ponto de fusão	-27°C
Sinônimos	álcool feniletílico, álcool 2-feniletílico, álcool β-feniletílico, benzil carbinol, β-hidroxi-etil-benzeno.
Solubilidade	19g/L em água a 20°C, solúveis em álcoois, ésteres, aldeídos, benzil benzoato, óleo mineral, solventes clorados

Fonte: Etschman *et al.* (2002)

De maneira geral, inúmeras leveduras são capazes de produzir 2-FE durante seu metabolismo (Etschmann *et al.*, 2002). O 2-FE pode ser obtido através de rotas metabólicas usando glicose como fonte de carbono, ou então pela adição de L-fenilalanina (L-PHE), sendo o seu precursor natural (Wittmann *et al.*, 2002). Sendo assim, se obtém 2-FE através da bioconversão de L-PHE ou então, pela síntese de novo a partir do catabolismo da glicose.

As leveduras são ótimas produtoras de 2-FE, tanto através do catabolismo dos açúcares e/ou o anabolismo de L-PHE. Muitas espécies são capazes de produzir 2-FE, porém, as quantidades e a rota utilizada podem sofrer modificações. Dentre as espécies de leveduras produtoras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* e várias cepas de *Kluyveromyces* são capazes de formar grandes quantidades de 2-FE a partir de L-PHE (Stark *et al.*, 2003b). *Pichia fermentans* L5, uma cepa isolada do solo, e também é capaz de produzir 2-FE (Huang *et al.*, 2001). Leal (2012) utilizou a *Kluyveromyces marxianus* em meio contendo resíduo de graviola para produzir 2-FE.

1.2.3 Aldeídos

Os aldeídos são compostos bastante voláteis, de aromas penetrantes e enjoativos, dependendo do tamanho da cadeia e quantidade presente. De modo geral, aldeídos com até oito

átomos de carbono tais como acetaldeído (C_2H_4O), formaldeído (CH_2O) e furfural ($C_5H_4O_2$), apresentam aromas indesejáveis enquanto que os de cadeia maiores, acima de dez carbonos, apresentam aromas agradáveis e são geralmente formados pela redução de ácidos graxos, sendo de ocorrência da fermentação alcoólica (Nykäne, 1986; Rodríguez & Mangas, 1996; Alcarde et al., 2011).

Os aldeídos têm grande importância comercial, com destaque para o acetaldeído, visto que este contribui para a nota de frescor e pungência em alimentos e bebidas. Outro exemplo é a vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído), que é o aroma químico mais apreciado mundialmente (Sinha et al., 2008).

Outro importante aldeído é o hexanal, que tem sido utilizado nas indústrias cosmética, para produção de fragrâncias, e alimentar, devido às suas propriedades antimicrobianas (Griffin et al., 1999; Schade et al. 2003). O benzaldeído é um importante intermediário na indústria de perfumes, corantes, alimentar (como aromatizante), farmacêutica e agroquímica (Dudareva et al., 2004).

1.2.4 Cetonas

Cetonas e dicetonas são caracterizadas pela presença do grupo carbonila e podem ser classificadas em alifáticas, aromáticas ou derivadas de fenol. Cetonas alifáticas, como acetona e diacetil são importantes em aroma de queijos maturados por fungos. As cetonas produzidas por via biotecnológica são na sua maioria alifáticas como, por exemplo, as 2-alcanonas (metilcetonas) produzidas por fungos (Armstrong & Brown, 1994).

A cetona β -ionona, possui aroma de rosas, apresenta limite de percepção de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$. É muito utilizado em perfumaria devido ao seu aroma floral característico, quando diluído em solução aquosa. Alguns descritores de aroma para esta cetona incluem também "fruta", "banana" e "doce" (Zea et al., 2001; Ledauphin et al., 2003; Peinado et al., 2004).

1.2.5 Ésteres

Os ésteres estão entre os compostos mais importantes para a indústria de aromas. São importantes tanto para alimentos naturais, como frutas, quanto em alimentos fermentados, presentes consideravelmente em baixas concentrações (1 a 100ppm) (Kempler, 1983).

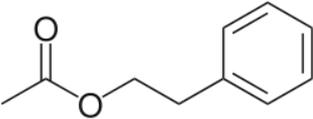
O principal contribuinte dos aromas frutais em produtos fermentados são os ésteres acetatos, destacando-se: acetato de isoamila, acetato de etila e acetato de feniletila (Yoshikawa, 1999; Hernández-Orte et al., 2002; Torrea et al., 2003).

Os ésteres foram os primeiros compostos produzidos sinteticamente, porém sabe-se que podem ser produzidos por rotas microbiológicas ou enzimáticas (Janssens et al., 1992; Jong & Birgmingham, 1993). Muitos dos ésteres detectados durante a fermentação são formados enzimaticamente, através da proteólise da acil coenzima-A correspondente, pela ativação dos cetoácidos ou por esterificação de um ácido orgânico com um álcool (Armstrong & Brown, 1994). A segunda via, pode levar a inúmeros ésteres de importância econômica como butirato de etila.

Acetato de 2-fenetil (2-FEA)

O 2-fenetil acetato (2-FEA) é um éster aromático, ocorrendo naturalmente no melão, maçã, abacaxi, uva, conhaque, amoras, azeitonas. Possui 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) (Sigma, 2013). Na Tabela 2 estão representadas as principais características físicas e químicas do 2-FEA.

Tabela 2: Propriedades físicas e químicas do 2-FEA

Propriedades	Descrição
Características	Líquido claro, amarelo pálido com cheiro doce, floral
Coloração	Líquido incolor
Densidade à 20°C	1,032g/cm ³
Fórmula Centesimal	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Fórmula espacial	
Índice de refração à 20°C	1,498
Massa molecular	164,2g/mol
Ponto de ebulição (101,3 Kpa)	238-239°C
Ponto de fusão	-31°C
Sinônimos	fenetilacetato, acetato de fenetila, acetato de 2-fenetila, 2-fenil-etilacetato, acetato de β-fenil-etil, benzilcarbinilacetato.
Solubilidade	Insolúvel em água, solúvel em etanol, éter e outros solventes orgânicos

Fonte: Sigma (2013); [http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl acetate/12/ou/a4/](http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-phenylethyl%20acetate/12/ou/a4/)

Apesar do reconhecido potencial aromático desse composto, poucos relatos existem na literatura à respeito de suas aplicações e propriedades, principalmente no tocante a produção exclusiva deste compostos 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.

1.2.6 Lactonas

São ésteres cíclicos de hidroxiácidos, potentes compostos de aroma encontrados em grande variedade de alimentos. Estão associados com aromas de frutas, como coco (δ -dodecalactona) e pêssigo (4-decalactona), manteiga (jasmína), doce (δ -dodecalactona) e nozes (γ -decalactona) (Kempfer, 1983; Janssens *et al.*, 1992). Contudo, podem ser responsáveis por odores indesejáveis como o de ranço. As lactonas têm alto valor comercial devido ao seu baixo valor de threshold (Jong & Birgmingham, 1993). As lactonas podem ser formadas a partir de aminoácidos (Heath & Reineccius, 1986) ou ácidos graxos (Feron *et al.*, 1996). A maioria das lactonas é produzida quimicamente, porém a utilização de microrganismos tem a vantagem da produção de lactonas opticamente ativas (Gatfield, 1995). Alguns fungos do gênero *Trichoderma* produzem a 6-pentil- α -pirona, que possui aroma de coco e apresenta propriedades antimicrobianas.

1.2.7 Pirazinas

São compostos heterocíclicos que contêm nitrogênio e contribuem significativamente para o aroma de muitos alimentos. São frequentemente associados a aroma típico de alimentos tostados, formados na reação de Maillard. As pirazinas têm sido isoladas de vegetais e associadas à características sensoriais de alimentos como pipoca, batatas, pimentão (Heath & Reineccius, 1986; Jong & Birgmingham, 1993). Com a atual demanda de alimentos pré-prontos, as pirazinas têm sido usadas como aditivos para contribuir no aroma (Longo & Sanromán, 2006). Alguns exemplos de pirazinas utilizadas como aromas são 3-metoxi-isopropil-pirazina (aroma de ervilha, batata), 2-metoxi-3-isobutil-pirazina (aroma de pimenta), 2,5-dimetil-pirazina (aroma de nozes) (Reineccius, 2006).

1.2.8 Sulfurados

Os compostos sulfurados apresentam valores de “threshold” muito baixo e, portanto, podem ser percebidos em concentrações muito baixas, além do fato de pequenas variações positivas em sua concentração poderem causar aroma desagradável no produto. Normalmente associa-se uma conotação negativa ao cheiro emanado pelos compostos sulfurados (Darriet *et al.*, 1999). Os compostos sulfurados podem ocorrer devido à processos de degradação enzimáticos ou não enzimáticos. O processo enzimático envolve a degradação de aminoácidos, ou de outros produtos oriundos do processo fermentativo que contenham enxofre. A via não

enzimática inclui reações térmicas, fotoquímicas e outros tipos de reações de compostos sulfurados durante o processo (Mestres et al., 2000). Os compostos dimetil sulfito, 3-metiltiopropanol (metionol), 4-metiltiobutanol foram identificados como aromas de impacto favoráveis em alimentos e bebidas (Darriet et al., 1999).

1.2.9 Terpenos

Os terpenos são os maiores constituintes e responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais. Tais compostos são hidrocarbonetos, compostos de unidades de isopreno, podendo ser cíclicos, com cadeia aberta, saturados ou insaturados e oxidados. Os terpenos com propriedades aromatizantes podem ser sintetizados como metabólitos secundários por uma grande variedade de vegetais superiores e microrganismos, principalmente Ascomicetos e Basidiomicetos, capazes de produzir terpenos como citronelol, geraniol, linalol, nerol e α -terpineol (Janssens et al., 1992). Estes fungos são adequados aos processos biotecnológicos devido ao seu comportamento nos meios de cultura, crescendo tanto em meio líquido ou semissólido, de composição simples. Terpenos são substratos favoritos para o processo de bioconversão. Muitos microrganismos são capazes de hidrolizar terpenos, produzindo compostos de maior valor. Os mais recentes avanços nesta área foram obtidos na biotransformação do limoneno em α -terpineol, composto muito usado em cosmética e produtos alimentícios (Janssens et al., 1992; Longo & Sanromán, 2006; Bicas et al., 2010). Um dos primeiros relatos na conversão do limoneno a α -terpineol foi utilizando *Cladosporium* sp, onde foi obtido cerca de 1g/L do composto (Kraidman et al., 1969).

1.3. INDÚSTRIA E MERCADO DE AROMAS

Historicamente, gregos e romanos perfumavam seus vinhos com rosas, violetas, ervas e condimentos exóticos, trazidos da China, Índia e Egito pelos mercadores venezianos. Na Europa, esses ingredientes foram misturados, também, aos alimentos para torná-los mais palatáveis. Durante o século XIX, avanços na química orgânica tornaram possíveis que importantes substâncias aromatizantes, como a vanilina e a cumarina, fossem sintetizadas e adicionadas aos produtos alimentícios (Chiappini et al., 2005). Aromas e fragrâncias desempenham o importante papel de prazer e satisfação há centenas de anos.

O sabor é fator decisivo na aceitação e escolha dos alimentos e bebidas e consiste numa resposta integrada às sensações do gosto e aroma. O gosto é resultado dos componentes não voláteis presentes nos alimentos, tais como açúcares, sais, ácidos, etc. Por outro lado, o aroma resulta da mistura de compostos químicos, com baixo peso molecular (<400 Dalton), biologicamente ativo, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais,

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

O aroma em alimentos é considerado o mais importante atributo pela sua grande influência na aceitação/rejeição de um alimento e sua percepção é um processo dinâmico que envolve características físicas, químicas e sensoriais (Piggott, 2000). São formados por diversas classes químicas, dentre essas temos os terpenos, alcoóis, aldeídos, ésteres, lactonas, e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo de fungos filamentosos e leveduras, com diferentes propriedades físico-químicas. (Gatfield, 1988; Gómez *et al.*, 1994; Rosillo *et al.*, 1999; Longo & Sanromán, 2006)

A indústria original de aromas e fragrâncias foi influenciada por quatro áreas tecnológicas: 1) a extração natural de aromas e óleos essenciais de plantas e, em menor escala, de fontes animais; 2) a química, que tem representado um papel importante na identificação de algumas moléculas de propriedades sensoriais, e também no desenvolvimento de processos eficientes, baseados na síntese orgânica utilizando derivados petroquímicos como matéria-prima; 3) alimentos fermentados tradicionais, como cerveja, vinho, vinagre, pão, queijo e iogurte, que incentivaram pesquisas biotecnológicas e agora são beneficiadas pelos avanços na engenharia de bioprocessos. E finalmente, o progresso que propiciou um aumento no conhecimento científico das reações que ocorrem durante o cozimento e o processamento dos alimentos (Cheetham, 1993).

Aromas são componentes importantes para indústria de alimentos e representam cerca de ¼ do mercado mundial de aditivos alimentícios (Figura 1) movimentando em torno de 22 bilhões de dólares por ano (Dubal *et al.*, 2008; Leffingwell, 2013). No Brasil, estima-se que o setor de aditivos atingiu cerca de 2 bilhões de reais, em 2008, e desse montante 50% seja mercado de aromas (ABIAM, 2013). Os compostos aromáticos podem ser obtidos tradicionalmente através de extrações dos recursos naturais (Xie *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Dhillon *et al.*, 2013), tais como plantas, flores, frutos, pela ação de enzimas e microrganismos ou pela síntese química. As plantas são a maior fonte de óleos essenciais e aromas, mas o seu uso depende da dificuldade de fatores de controle como as condições do tempo e pragas em plantas. Uma alternativa é a utilização de metodologias biotecnológicas pela ação de enzimas e/ou microrganismos, originários de metabólitos de plantas ou ainda do metabolismo animal (Janssens *et al.*, 1992; Cheetham, 1993).

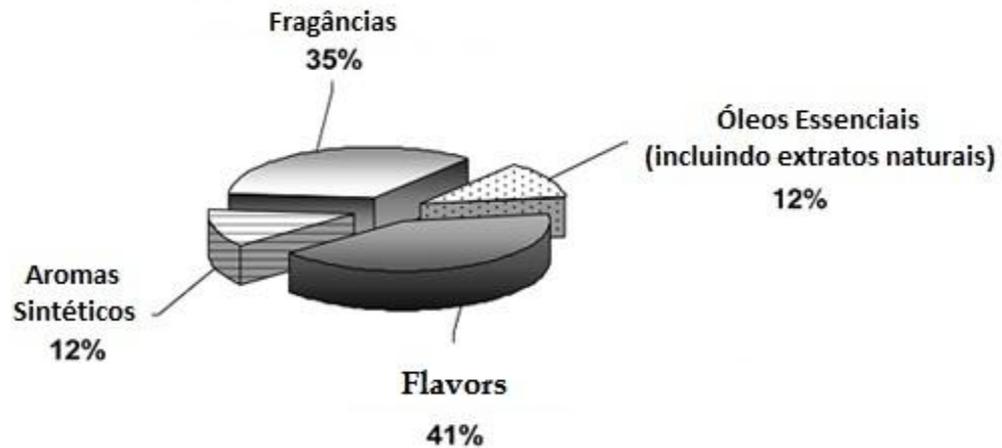


Figura 1: Parcelas de mercado dos setores individuais da indústria de flavor e fragrâncias.
 Fonte: Leffingwell (2013).

1.4. AROMAS NATURAIS E SINTÉTICOS

As substâncias químicas promissoras de aroma podem ser classificadas devido à sua origem, em aromas naturais e aromas sintéticos. Schrader et al. (2004) define aroma natural como produtos derivados de bioprocessos a partir de substratos naturais, os quais já foram identificados em plantas ou outras fontes naturais.

A síntese química convencional é viável e bastante utilizada, porém a geração de aromas por biotecnologia está altamente impulsionada pelas inúmeras vantagens e benefícios tornado-se altamente atrativa (Krings e Berger, 1998; Schrader et al., 2004). Embora esteja limitado a alimentos “Premium” visto seu alto preço (até duas ordens de magnitude) do que os de seus análogos quimicamente sintetizados (Schrader et al., 2004).

A legislação para aromas naturais na Europa, Brasil e EUA, é claramente definida pelos órgãos competentes. Na Europa através da Diretiva 88/388/EEC (CEC, 2013), é definido como uma “substância flavorizante, a qual é obtida por apropriados processos físicos (incluindo destilação e extração com solventes) ou processos enzimáticos ou microbiológicos a partir de material de origem vegetal ou animal, tanto na forma de matéria-prima, quanto no estado após o processamento para utilização no consumo humano através de tradicionais processos de obtenção de alimentos.”.

Nos EUA o código federal de regulamentação (FDA, 2013) define, “óleos essenciais ou oleoresinas, essências ou extratos, hidrolisados proteicos, resíduos de destilação, ou qualquer produto obtido por torrefação, aquecimento ou lise com enzimas, o qual contenha os constituintes de aroma derivado de especiarias, suco de frutas, vegetais ou suco de vegetais, leveduras comestíveis, ervas, árvores (casca, brotos, raízes, folhas ou similares), carnes, frutos do

mar, aves domésticas, ovos, laticínios ou produtos da fermentação que possuam significância tanto nutricional ou flavorizante no alimento”.

No Brasil, em 2007, foi aprovado o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes e Aromas (Anvisa, 2007) que, à semelhança dos regulamentos internacionais, define como aromas naturais “àqueles obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias primas aromatizantes e aromas naturais. Entende-se por matérias-primas aromatizantes/aromas naturais os produtos de origem animal ou vegetal normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimáticos, etc.). Os aromatizantes/aromas naturais compreendem óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas e substâncias aromatizantes/aromas isolados.”.

De acordo com Tyrell (1995) existem 3 categorias de aromas naturais: 1- Formados durante o metabolismo natural de animais e plantas; 2- Formados durante a ação das enzimas e microrganismos e 3- Formados durante o processamento térmico de ingredientes naturais.

A International Organization of the Flavor Industry (IOFI), organismo representativo da indústria mundial de flavorizantes, incluiu o uso de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células animais ou vegetais, e enzimas derivadas destas, como processo bioquímico para produção de substâncias flavorizantes naturais. Entretanto, certas condições devem ser asseguradas para que o aroma produzido biotecnologicamente seja considerado natural: matéria-prima seja natural, apenas processos físicos (extração, destilação e cristalização) sejam utilizados para o isolamento e purificação (Gatfield, 1995).

Tradicionalmente, as principais fontes de extração de aromas naturais eram matérias-primas como carnes, frutas, folhas, ervas e sementes condimentares. Devido a questões ecológicas e políticas, o uso de animais e plantas foi se tornando problemático e essas fontes tradicionais foram sofrendo uma diminuição na sua disponibilidade, acarretando um aumento no valor comercial dos compostos extraídos. Além disso, a sazonalidade, dependência de fatores climáticos, a natureza do processo de extração dos compostos e a variabilidade na quantidade e na qualidade do produto final foram fatores que tornam a obtenção onerosa e provocaram irregularidades no suprimento do mercado (Rungsardthong & Noomhom, 2005; Longo & Sanromán, 2006).

Há uma tendência mundial da substituição gradativa de aromas sintéticos por aromas de origem biotecnológica, classificados como naturais, sejam de origem enzimática ou fermentativa, embora cerca de 80% da produção do mercado de aromas e fragrâncias ainda sejam através de processos químicos (Krings & Berger, 1998; Maróstica Júnior & Pastore, 2007; Laufenberg et al., 2013). Dentro deste contexto, os microrganismos desempenham um importante papel na produção de aromas, em função das novas exigências do mercado consumidor, sendo

considerados mais saudáveis e seguros que os seus similares sintéticos e de grande valor industrial. Além disso, possuem estereoespecificidade e pureza, eliminando a presença de misturas racêmicas. Por outro lado, possui baixa produtividade e alto custo (Damasceno et al., 2003; Maróstica Júnior & Pastore, 2007).

1.5. BIOAROMAS

A produção de aromas em alimentos utilizando microrganismos é uma prática existente a centenas de anos. Inicialmente, seu uso visava o aumento da vida útil, ocasionada pelos processos fermentativos, mas inquestionavelmente contribuía significativamente na formação de aromas característicos. Produtos como cerveja, vinho, vinagre, queijos, pães e vegetais fermentados devem seu aroma típico à capacidade metabólica de numerosos microrganismos. O uso de microrganismos oferece um método alternativo para a produção de aromas, favorecido pela produção controlada e podendo ser aplicada em diversas indústrias, principalmente na alimentícia.

Em princípio, podemos dizer que o aroma pode ser obtido através de transformação química ou biotecnológica, a qual inclui biotransformações microbiológicas e enzimáticas, engenharia genética e síntese *de novo*, onde os microrganismos são capazes de produzir compostos de aroma por fermentação a partir de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos; ou pelo processo de bioconversão, onde os microrganismos catalisam reações específicas de precursores adicionados ou intermediários (Janssens et al., 1992; Franco, 2004).

De maneira geral, os microrganismos são metabólitos secundários sendo gerados até que este tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado a fase estacionária do ciclo de crescimento (Tortora *et al.*, 2005), quando está na fase estacionária, normalmente a produção de metabólitos é aumentada (Scharpf et al., 1986). Os metabólitos secundários inibem as espécies competidoras e assim contribuem para a sobrevivência do microrganismo. Além disso, segundo os mesmos autores, a liberação de compostos voláteis em fungos estimularia a germinação de esporos. Porém, existem casos relatados na literatura que a produção desses compostos não ocorre na fase de metabolismo secundário (Berger, 1995). Um estudo realizado por Jiang (1995) demonstrou produção de ácido abscísico já na fase inicial de crescimento por *Cercospora rosicola*, que aumentou em paralelo com a massa celular seca. Abraham & Berger (1994) têm relatado a produção de citronelol por cultura submersa de *Myrcena* pura já a partir do primeiro dia de fermentação.

A produção de aroma por células vivas depende, como qualquer processo fisiológico, de parâmetros exógenos, tais como técnica de produção, temperatura, aeração, pH, iluminação, agitação, atividade de água, pressão parcial dos gases e variedade de nutrientes e linhagem da cepa (Sariaslani & Rosazza, 1984; Scharpf et al., 1986; Gatfield, 1988; Janssens et al., 1992;

Armstrong & Brown, 1994; Welsh, 1994; Berger, 1995; Sanchez & Demain, 2002; Hernández-Orte et al., 2005; Liu et al., 2006; Bhatt et al., 2013).

A composição do meio de cultura - fontes de carbono, nitrogênio e outros elementos - são também fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aroma produzidos. Fosfatos e elementos traços, como ferro, zinco e magnésio estão envolvidos em várias etapas do metabolismo, conseqüentemente tem papel importante na produção de aroma, não apenas a presença como também a ausência, pode ser fundamental na produção destes compostos (Armstrong & Brown, 1994; Aksu & Eren, 2005). Embora outros compostos possam ser utilizados para as fermentações, os açúcares são os substratos principais deste processo.

A especificidade da cepa é um fator crítico para a produção de aroma e a literatura relata que pode haver grande variação entre as cepas de um único microrganismo, como é o caso de *Phlebia radiata* que possui no mínimo 25 cepas, sendo que apenas 2 são capazes de produzir compostos de aroma (Armstrong & Brown, 1994).

O desafio na produção de aromas a partir de microrganismo está no conhecimento das vias metabólicas da formação dos compostos voláteis, sua natureza química, além das reações não enzimáticas que poderiam alterar ou destruir aromas desejáveis. Um dos primeiros relatos sobre a biossíntese de aromas através de microrganismos foi realizado por Omelianski (1923), onde os gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* e outros isolados de uva, de grãos úmidos de cevada, de suco de abacaxi, de folhas de ruibarbo, de queijo, de leite e de pão foram citados como produtores de um agradável e complexo aroma de frutas.

Apenas a partir da década de 50, após estudos sobre a fisiologia microbiana e a produção de aromas, como também o avanço na cromatográfica gasosa de alta resolução acoplada com a espectrometria de massas um número significativo de trabalhos sobre compostos aromatizantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras começou a ser publicado, conforme pode ser verificado na Tabela 3. A literatura tem relatado ao longo dos anos alguns trabalhos relacionados a produção de aromas por processos fermentativos, os quais estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3: Microrganismos como produtores de aromas utilizando diversos substratos em diferentes tipos de processos fermentativos

Tipo de Fermentação	Substrato	Microrganismo	Compostos de aroma	Referência
SmF	Destilados de leite	<i>Pseudomonas fragi</i>	Ésteres de isovalerato	Pereira & Morgan (1958)
SmF	Leite homogeneizado	<i>Pseudomonas fragi</i>	Acetato de etila; propionato de etila; butanoato de etila; isovalerato de etila; hexanoato de etila	Reddy et al. (1968)
SSF	Farelo de trigo	<i>Aspergillus flavus</i>	3-metil-butanol; 3-octanona; 3-octanol; 1-octen-3-ol; 1-octanol; cis-2-octen-1-ol.	Kaminski et al (1972)
SmF	Meio sintético	<i>Sporobolomyces odorus</i>	Alcoóis, ésteres, aldeídos e lactonas	Tahara et al. (1973)
SSF	Farelo de Trigo	<i>Aspergillus (diversos tipos), Penicillium (diversos tipos), Alternaria, Cephasporum, Fusarium sp.</i>	1-octen-3-ol	Kaminski et al. (1974)
SmF	Meio sintético	<i>Ceratocystes moniformis</i>	Ésteres	Lanza et al. (1976)
SmF	Meio sintético	<i>Kluyveromyces lactis</i>	citronelol, linalol, genraniol	Drawert & Barton (1978)
SmF	Meio sintético	<i>Fusarium poae</i>	Lactonas	Sarris & Latrasse (1985)
SmF	Meio sintético	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Benzaldeído; Anisalaldeído	Berger et al. (1987)
SmF	Meio sintético	<i>Geotrichium penicillatum</i>	Ésteres	Janssens et al. (1988)
SmF	Meio sintético	<i>Geotrichium candidum</i>	Alcoóis; Ésteres	Latrasse & Dameron (1988)
SmF	Meio sintético	<i>Neurospora sp</i>	Hexanoato de etila; 3-metil 1-butanol; Acetoína	Yoshizawa et al. (1988)
SmF	arroz	<i>Aspergillus oryzae</i>	1-octen-3-ol	Ito et al. (1990)
SmF	Leite desnatado	<i>Pseudomonas fragi</i>	Butanoato de etila; hexanoato de etila, 2-hexanoato de etila, isovalerato de etila; 2-metil hexanoato de etila	Raymond et al. (1990)
SmF	Leite desnatado	<i>Pseudomonas fragi</i>	Butanoato de etila; etil 3-metilbutanoato; hexanoato de etila	Cormier et al. (1991)
SmF	Meio sintético	12 linhagens de <i>Neurospora</i>	1-octen-3-ol	Yamauchi et al. (1991)
SmF	Meio sintético	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Álcool isoamílico, feniletanol, acetoina, acetato de feniletila, isobutanol ácido isobutírico e isoamílico	Jiang (1993)
SmF	Meio sintético	8 linhagens de <i>Neurospora sp</i>	1-octen-3-ol; 3-metil-1-butanol, acetato de etila; etanol	Pastore et al. (1994a)

SmF	Meio sintético	isoladas de beiju <i>Geotrichum</i> sp.	Isovalerato de etila; hexanoato de etila; propionato de etila; butanoato de etila	Pastore et al (1994b)
SmF	Meio sintético	20 linhagens de <i>Basidiomicetos</i>	Alcoóis; Ésteres; Cetona; Aldeídos	Abraham & Berger (1994)
SmF	Meio sintético	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Álcool isoamílico, isobutanol, 2-feniletanol, ácido isobutírico, 2-feniletil acetato 2-feniletil isobutirato e 3-hidroxi-2-butanona	Jiang (1995)
SmF	Meio sintético	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Álcool isoamílico; 2-fenil etanol; ácido butírico	Fabre et al. (1995)
SmF	Óleo de mamona	<i>Sporobolomyces odoros</i>	γ -decalactona	Lee et al. (1995)
SmF	Meio sintético	<i>Nerouspora</i> sp	1-octen-3-ol	Yamauchi et al. (1996)
SmF	Bagaço de cana, farelo de trigo e bagaço de mandioca	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	24 CV (1 aldeído, 7 alcoóis, 4 cetonas e 8 ésteres)	Christen et al. (1997)
SFF	Soja	<i>Bacillus subtilis</i>	Pirazinas	Besson et al. (1997)
SSF	Bagaço de mandioca, bagaço de maçã, amaranto e soja.	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Alcoóis, ésteres, cetonas, ácidos e aldeídos.	Bramorski et al. (1998)
SmF	Meio sintético	<i>Pichia membranefaciens</i>	Acetato de etila, isobutanol, butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool amílico, acetato de isoamila, acetato de butila, caproato de etila e álcool feniletil	Marques (1998)
SmF	Meio sintético	<i>Aspergillus</i> sp	Metilcetonas	Oliveira (1998)
SmF	Manipueira	<i>Geotrichum fragrans</i>	1-butanol, 3-metil 1-butanol, 2-metil 1-butanol, 1,3-butanediol, feniletanol, acetato de etila, propionato de etila, 2-metil propionato de etila e 2-metil propanóico.	Damasceno (1999)
SSF	Soja	<i>Bacillus subtilis</i>	Pirazinas	Larroche et al. (1999)
SSF	Bagaço de mandioca; Bagaço de maçã	<i>4 cepas de Rhizopus</i>	Acetaldeído; etanol; 1-propanol; acetato de etila, propionato de etila; 3-metil butanol	Christen et al. (2000)
SmF e SSF	Bagaço de cana de açúcar	<i>Trichoderma harzianum</i>	6-Pentil- α -pirona (6-PP)	Sarhy-Bagnon et al. (2000)
SSF	Casca de café	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Acetaldeído, etanol, isopropanol, acetato de etila	Soares et al. (2000)
SSF	Bagaço de maçã,	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Acetato de etila; etanol; acetaldeído	Medeiros et al. (2000)

	mandioca e cana-de-açúcar, semente de girassol e palma			
Reator SmF	Bagaço de mandioca Meio suplementado com fenilalanina	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i>	Acetato de etila; etanol; acetaldeído 2-feniletanol	Medeiros et al. (2001) Huang et al. (2001)
SSF SmF	Bagaço de cana de açúcar Meio sintético	<i>Trichoderma</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	6-pentil-a-pirona (6-PP) Acetoína	Araújo et al. (2002) Teixeira et al. (2002)
SmF	Meio sintético	<i>Dekkera bruxellensis</i>	4-etilfenol	Dias et al. (2003)
SmF	Resíduo de milho	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Candida krusei</i>	Alcoóis, carbonil, esters, ácidos	Annan et al. (2003)
SSF SmF	Resíduos de café Meio sintético	<i>Ceratocystis fimbriata</i> <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Hansenula subpelliculosa</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> , <i>S. Cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> .	Acetato de etila; Etanol; Acetaldeído Acetato de etila; Acetato de isoamila	Medeiros et al. (2003) Plata et al. (2003)
SmF	Manipueira	<i>Geotrichum fragrans</i>	1-butanol, 3-metil 1-butanol, 2-metil 1-butanol, 1-3 butanodiol; feniletanol; acetate de etila, etil propionato, 2-metil etil propionato e 2-metil propanóico	Damasceno et al. (2003)
Semi-sólida SmF	Milho Meio sintético	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Acremonium nigricans</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Diacetil 2-acetil-1-pirrolina	Escamilla-Hurtado et al. (2005) Rungsardthong & Noomhom (2005)
SSF	Casca de café	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Etanol; Acetaldeído; Acetato de etila; Propionato de etila; Acetato de isoamila	Medeiros et al. (2006)
SmF	Meios de cultura	<i>Geotrichum candidum</i>	Etanol, acetato de etila, isobutanoato de etila, isovalerato	Pinotti et al. (2006)

	contendo sacarose ou melação e milhocina ou peptona (com adição de aminoácidos)		de etila, etil tiglate, isobutil isoalerato; isoamil isoalerato.	
SmF	Meio sintético	<i>7 linhagens isoladas de grãos de café, água de lavagem de café, folhas de pé de café, terra de cafezal e de frutas (banana, mexerica, laranja, melão, mamão, goiaba, uva e damasco)</i>	Aromas frutais (abacaxi, pêra, banana, doce)	Uenojo & Pastore (2006)
SmF	Meio sintético	<i>Geotrichum candidum</i>	Ésteres etílicos	Mdaini et al. (2006)
SmF	Melaço de soja	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Alcoóis; Ésteres	Pereira (2007)
SmF	farelo de soja	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetoína	Xiao et al. (2007)
SmF	soja	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Etanol, acetona, acetato de etila, 2-butanona, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol.	Feng et al. (2007)
SSF	Pó de casca de coco verde	<i>Trichoderma harzianum</i>	6-pentil- α -pirona (6-PP)	Ramos et al. (2008)
SSF	Resíduo de polpa cítrica com farelo de soja, melaço de cana de açúcar	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Acetaldeído; Etanol; Acetato de etila; Acetato de isoamila; Acetato de propila; Isobutirato de etila; 2-hexanona; 2-hexanol.	Rossi et al. (2009)
SmF	Meio sintético	7 cepas (1 levedura, 1 fungo e 5 bactérias) isoladas de flores (Mal-me-quer)	β -ionona; β -Damascona; pseudoionona	Uenojo & Pastore (2010)
SmF	Caldo de mamão	<i>Sacharomyces</i>	Etanol, acetato de isoamila, álcool isoamílico, octanoato de etila, 2-fenil acetato, 2-fenil etanol	Lee et al. (2010)
SmF	Meio sintético	<i>Antrodia camphorata</i>	Lactonas, série de compostos alifáticos C8	Lu et al. (2011)
SmF	Meio sintético	<i>Proteus vulgaris</i>	Alcoóis e sulfurados	Deetae et al. (2011)
SSF	Meio sintético	<i>Antrodia camphorata</i>	Oct-1-en-3-ol, octan-3-ona e aceto de 2-feniletíl	Xia et al. (2011)
SmF	Meio sintético	<i>Neurospora sp.</i>	1-octen-3-ol	Carvalho et al. (2011)
SmF	Resíduos de acerola, graviola e mangaba	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2-feniletanol; 2-fenetil acetato	Leal (2012)
SSF	Bagaço de cana, pó de	<i>Trichoderma harzianum</i>	6-pentil- α -pirona	Calasans (2012)

	casca de coco, bagaço de mandioca			
SSF	soro de leite, melação, resíduos sólidos de cerveja, resíduos de laranja e batata	<i>K. marxianus e S. cerevisiae</i>	Ésteres, alcools, cetonas e terpenos	Aggelopoulos et al., 2014
SSF	Borra de café expresso	<i>Trichoderma harzianum</i>	6-pentil- α -pirona (6-PP)	Rivera et al., 2014
SmF	Casca de laranja	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Acetato de isoamila, acetato de feniletil e ésteres etil (hexanoato, octanoato, decanoato, dodecanoato)	Paraskevopoulou & Mantzouridou (2014)

SmF: Fermentação submersa

SSF: Fermentação estado sólido

Os primeiros estudos encontrados datam da década de 50 quando Pereira & Morgan (1958) avaliaram a produção de ésteres produzidos pela *Pseudomonas fragi* em destilados de leite. A produção de ésteres, principalmente os ésteres de isovalerato, foi, segundo os autores, favorecida pelo enriquecimento do leite com etanol. Eles ainda salientam que o aroma frutal foi devido a presença dos ésteres de isovalerato e de acetato.

Kaminski et al. (1974) identificaram os compostos voláteis produzidos pelos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium chrysosenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium fumiculosum*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium fumiculosum*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium viridicatum*, *Alternaria*, *Cephasporum* e *Fusarium* sp. Esses microrganismos foram cultivados em meio de farelo de trigo (28°C/28h). Foram detectados 6 compostos voláteis (3-metil butanol, 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, octanol e 2-octen-1-ol. Dentre estes, o 1-octen-3-ol apresentou odor de cogumelo e foi o composto predominante.

Lanza et al. (1976) verificaram a produção de aroma por *Ceratocystes moniformis*. Os autores reportaram que a composição do meio e idade das culturas influenciavam diretamente na qualidade e intensidade dos aromas obtidos. Foram identificados os compostos de etanol acetato de etila, aceto de n-propila, acetato de isobutila e acetato de isoamila.

Drawert & Barton (1978) avaliaram a produção de terpenos pela levedura *Kluyveromyces lactis* em cultura aeróbia submersa. Foram produzidos cerca de 50µg/L de citronelol e linalol, entretanto o geraniol foi detectado em apenas quantidade traços.

Sarris & Latrasse (1985) utilizaram o *Fusarium poae* em caldo de malte e verificaram a produção de forte odor de fruta. Os autores afirmam que o aroma frutal encontrado foi devido a presença das lactonas (-penta, -hexa, -hepta, -octa, -nona, -deca, -onodeca, -dodeca, cis-6-dodecen-4-olide e -decalactonas).

Berger et al. (1987) avaliaram a produção de compostos voláteis utilizando *Ischnoderma benzoinum*, isolados de madeiras apodrecidas. O benzaldeído e anisalaldeído foram os compostos majoritários. Além deles foram relatados: 4-octanolide, 2-octen-4-olide, linalool, octanol.

Janssens et al. (1988) utilizaram *Geotrichium penicillatum* para produzir éster. O isolamento dos compostos aromáticos foi através do headspace dinâmico, utilizando o Tenax como polímero. Foram identificados os compostos: acetato de propila, crotoato de etila, propionato de isobutila, valerato de etila, butanoato de isobutila, isohexanoato de etila, propionato de isopentila, hexanoato de etila e β-fenil etil acetato. Os compostos tiveram tempo de produção em momentos diferentes do crescimento do microrganismo. Os acetatos foram formados após 57 horas de fermentação, propionato e butanoatos após 75 horas, isobutanoato após 87 horas. Os autores afirmam que a fonte de nitrogênio e a adição de precursores estão diretamente relacionados com a alta produtividade e especificidade dos ésteres produzidos.

Latrasse & Dameron (1988) utilizaram uma linhagem de *Geotrichium candidum* visando a produção de ésteres. Foi produzido um aroma frutal, com característica de aroma de marmelada. As principais classes encontradas foram os alcoóis e ésteres. Foi realizado “sniffing” e o aroma de marmelo foi atribuído ao etil isobutanoato, enquanto o aroma de levedura foi percebido durante a eluição do 2-fenil etanol. Os autores perceberam que o aroma foi produzido até o quarto dia de fermentação, enquanto o pH do meio aumentava. Foram identificados também os alcoóis isobutanol, 2-metil butanol e 2-fenil etanol, sendo originários da valina, leucina e fenilalanina, respectivamente.

Yoshizawa et al. (1988) avaliaram linhagens de *Neurospora* sp como produtoras de aromas frutais. Os autores verificaram que a maior produção de aroma ocorria em caldo extrato de malte 5%, com forte aroma de pêssego, pera e maçã. Os compostos predominantes foram: hexanoato de etila, 3-metil 1-butanol e acetoína.

Raymond et al. (1990) avaliaram a influencia da temperatura, agitação, pH e biomassa na produção de aroma de morango utilizando a *Pseudomonas fragi* em meio contendo leite desnatado. Os principais compostos tais como butirato de etila, hexanoato de etila, 2-hexanoato de etila, isovalerato de etila e 2-metil hexanoato de etila foram obtidos com 60 h de fermentação, 11°C e agitação de 150 rpm.

Cormier et al. (1991) cultivaram *Pseudomonas fragi* em leite para a produção de compostos voláteis. Foi observada a produção de aroma de morango quando o leite era desnatado a 15°C. Os compostos voláteis produzidos foram extraídos pela técnica de Purge and Trap. Os compostos majoritários foram: butanoato de etila, 3-metil butanoato de etila e hexanoato de etila.

Yamauchi et al. (1991) testaram 12 linhagens de *Neurospora* na produção de aromas em meio contendo calde malte 5% (30°C, 3 a 5 dias). Apenas as linhagens isoladas de beiju produziram aromas frutais. O composto 1-octen-3-ol foi o responsável pelo aroma de cogumelo dentre os outros compostos.

Pastore et al. (1994a) estudaram oito linhagens de *Neurospora* sp isoladas de beiju na produção de compostos voláteis. O hexanoato de etila esteve presente em todas as linhagens e foi o responsável pelo aroma frutal enquanto o 1-octen-3-ol foi o responsável pelo aroma de cogumelo.

Pastore et al (1994b) isolaram uma linhagem de *Geotrichum* sp. de mamão. Foi observada a formação de aroma de maçã e morango. Foram detectados 22 compostos voláteis, dentre esses oito foram identificados: acetato de etila, 2-propanol, propionato de etila, butanoato de etila, isovalerato de etila, 2-metil propanol, 3-metil butanol e hexanoato de etila.

Jiang (1995) analisou a produção de metabólitos voláteis por *Kluyveromyces lactis* durante a fermentação em fermentadores de 2 litros utilizando meio composto por glicose, extrato de levedura e vitaminas B₁ e H. Mais de 50 compostos voláteis foram identificados durante a fermentação, sendo as principais classes de hidrocarbonetos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, compostos carbonílicos e compostos heterocíclicos. Os componentes predominantes foram o álcool isoamílico, isobutanol, 2-feniletanol, ácido isobutírico, 2-feniletil acetato 2-feniletil isobutirato e 3-hidroxi-2-butanona. Foi verificado também que a produção de compostos voláteis foi diretamente proporcional ao aumento da biomassa, indicando que o metabolismo secundário começou na fase inicial do crescimento microbiano.

Fabre *et al.* (1995) avaliaram a produção de compostos voláteis por *Kluyveromyces marxianus* utilizando a fermentação submersa. O meio composto por glicose, extrato de levedura e sais minerais produziu um forte aroma frutal caracterizado por um forte odor de banana, devido à produção de acetato de isoamila. Os ácidos foram produzidos após 63 horas, enquanto os ésteres 70 horas de fermentação. Os compostos predominantes foram: álcool isoamílico (180mg/L), 2-fenil etanol (400mg/L) e ácido butírico (290mg/L), chegando a uma produtividade de voláteis totais iguais a 10869 µmol/L/mL/h.

Lee *et al.* (1995) avaliaram o efeito das condições (pH, aeração e alimentação) de fermentação por *Sporobolomyces odorus* com adição de hidrolisado do óleo de mamona visando a obtenção de γ -decalactona. A máxima produção foi atingida quando a aeração estava na faixa de 1,0 a 1,5 vvm, adição do substrato com 3 a 5 dias de cultivo, no entanto, o pH (4-7) não influenciou.

Yamauchi *et al.* (1996) avaliaram a influência da irradiação de luz na produção de aroma a partir de três linhagens de *Nerouspora* sp e verificaram a redução na quantidade de caproato de etila e de forma contrária, o aumento na produção do 1-octen-3-ol.

Christen *et al.* (1997) estudaram a capacidade do fungo *Ceratocystis fimbriata* em produzir aromas frutais utilizando bagaço de cana, farelo de trigo e bagaço de mandioca como substrato. Foi percebido que quando o meio foi suplementado com leucina ou valina, apresentou um forte aroma de banana.

Bramorski *et al.* (1998) avaliaram a capacidade do fungo *Ceratocystis fimbriata* de produzir aromas frutais a partir da fermentação semi-sólida em meios contendo diferentes proporções de bagaço de mandioca, bagaço de maçã, amaranto e soja. O meio contendo amaranto produziu um agradável aroma de abacaxi, enquanto os outros meios proporcionaram um forte aroma frutal. 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 CG-EM, sendo identificados do total de 15 compostos: 6 álcoois (etanol, 2-propanol, 1-propanol, 1-butanol, álcool isoamílico, 2-hexanol), 5 ésteres (acetato de etila, propionato de etila, butanoato de etila,

acetato de butila, acetato de isoamila), 2 cetonas (acetona, 2-hexanona), 1 ácido (ácido acético) e 1 aldeído (acetaldeído).

Marques (1998) utilizou a levedura *Pichia membranefaciens* para a produção de compostos voláteis. O autor avaliou a influencia das condições de cultivo (composição do meio, pH, temperatura e tempo de incubação) na obtenção dos compostos de aroma. Os compostos majoritários foram: acetato de etila, isobutanol, butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool amílico, acetato de isoamila, acetato de butila, caproato de etila e álcool feniletil.

Oliveira (1998) avaliou a produção de metilcetonas utilizando *Aspergillus* sp. Foram identificadas quatro metilcetonas: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona. As melhores condições foram: 96h de incubação, 30°C, pH 4,5 e sistema de reação contendo uma mistura de lipase. O autor também reporta que quando a fermentação ocorria isenta de esporos não havia a produção de metilcetonas.

Damasceno (1999) estudou a fermentação de *Geotrichum fragrans*, isolada de manípueira na produção de compostos voláteis. Foram identificados os seguintes compostos: 1-butanol, 3-metil 1-butanol, 2-metil 1-butanol, 1,3-butanediol, feniletanol, acetato de etila, propionato de etila, 2-metil propionato de etila e 2-metil propanóico. A produção de aromas foi detectada desde as primeiras horas de fermentação, e estava diretamente associada a produção de biomassa.

Christen et al. (2000) testaram 4 cepas de *Rhizopus* e encontraram notas alcoólicas e notas frutais, respectivamente, durante a fermentação em meios contendo diferentes proporções de resíduos agroindustriais (bagaço de mandioca e bagaço de maçã), amaranto, soja e óleo de soja. Verificaram que a produção de compostos voláteis dependia mais do meio que da cepa. A maior produção de voláteis foi obtida com meio amaranto e foi aumentada com a adição de soluções salinas minerais. O composto predominante foi o etanol e sua maior produção ocorreu com alta relação C/N e baixa aeração, associado com o cultivo estático. A produção de compostos voláteis foi muito rápida, na maioria dos casos, ocorrendo no primeiro dia de cultura.

Sarhy-Bagnon et al. (2000) produziram pentil- α -pirona (6-PP) utilizando o microrganismo *Trichoderma harzianum* e obtiveram uma produção 17 vezes maior por fermentação em estado sólido do que por fermentação submersa .

Soares et al. (2000) relataram a produção de aroma frutal por *Ceratocystis fimbriata* utilizando casca de café e glicose (nas concentrações 20, 30 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. Altas concentrações de glicose (46g/100g) ficou evidenciada a baixa produção de aroma, com um fraco odor de banana. A produção de acetato de etila e acetato de isoamila foi altamente estimulada pela adição de leucina ao meio, produzindo um forte cheiro de banana.

Medeiros *et al.* (2000) testaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* para a produção de compostos voláteis usando cinco resíduos agroindustriais (bagaço de maçã, mandioca e cana de açúcar, farelo de sementes de girassol e de palmas) por fermentação em estado sólido. Os resíduos que obtiveram aromas frutais mais intensos foram o bagaço de mandioca e o farelo de palma. Este aroma frutal foi atribuído aos compostos acetato de etila, etanol e acetaldeído.

Huang *et al.* (2001) utilizaram *Pichia fermentans* em meio líquido suplementado com fenilalanina e avaliaram o efeito do pH inicial do meio (4-11), temperatura de cultivo (20-40°C) e velocidade de rotação (0-250rpm) para a produção de 2-feniletanol. A máxima produção de 2-feniletanol foi alcançada com pH 8,5, temperatura de cultivo entre 30° e 35°C e 250 rpm de rotação. O estudo da cinética revelou que a produção de 2-feniletanol aumentou quase em paralelo com o aumento da biomassa durante o período inicial da fermentação. A máxima produção de 2-feniletanol foi de 505.5 mg/L obtido após 16h h de fermentação.

Araújo *et al.* (2002) estudaram a produção de 6-pentil-a-pirona (6-PP), com odor característico de coco, utilizando fermentação estado sólido com o fungo *Trichoderma* em meio contendo bagaço de cana-de açúcar como substrato. Foi encontrada a quantidade de 3mg/g de 6-PP após 5 dias de fermentação.

Dias *et al.* (2003) avaliaram os efeitos da produção de 4-etilfenol por *Dekkera bruxellensis* em meio contendo glicose. O substrato foi consumido para a produção de etanol durante a fase exponencial de crescimento e, após o consumo de glicose, houve a utilização do etanol para a produção de 4-vinilfenol durante a fase estacionária de crescimento. A produção de 4-etilfenol é resultado de duas reações consecutivas. Um metabólito intermediário (4-vinilfenol) foi testado se poderia ser usado como precursor de 4-etilfenol na ausência e na presença de ácido *p*-cumárico. Ao ser adicionado 4-vinilfenol no meio de cultura, a produção de 4-etilfenol procedeu da mesma forma que no meio de glicose como única de fonte de carbono e a velocidade de crescimento, produção de etanol, consumo e produção de ácido acético foram similares ao meio suplementado com ácido *p*-cumárico e em meio contendo etanol como única fonte de carbono.

Medeiros *et al.* (2003) utilizaram duas cepas de *Ceratocystis fimbriata* para produção de aromas através de fermentação em estado sólido utilizando como substrato resíduos de café. O aroma foi avaliado através de headspace estático, onde foram produzidos 12 compostos voláteis, dentre estes os majoritários foram: acetato de etila, etanol e acetaldeído, os quais foram ditos como responsáveis pelo aroma frutal.

Medeiros *et al.* (2006) avaliaram a produção de compostos voláteis utilizando *Ceratocystis fimbriata* em casca de café como substrato em dois diferentes tipos de bioreator: coluna (escala laboratório) e horizontal (semi-piloto). A produção de compostos voláteis foi maior no bioreator horizontal. Foram detectados 20 compostos voláteis através de headspace, dentre eles: etanol, acetaldeído, acetato de etila, propionato de etila e acetato de isoamila. Foram testadas 3 diferentes resinas para recuperação do aroma (carvão ativo, tenax e

poliestireno-divinil-benzeno-Amberlite XAD-2), onde esta última foi a que recuperou mais compostos.

Damasceno *et al.* (2003) estudaram 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 não apresentou efeito sobre os perfis qualitativos dos compostos voláteis produzidos.

Uenojo & Pastore (2006) verificaram a produção de aroma frutal por microrganismos pectinolíticos isolados de grãos de café, água de lavagem de café, folhas de pé de café, terra de cafezal e de frutas (banana, mexerica, laranja, melão, mamão, goiaba, uva e damasco) através da fermentação. Através da análise sensorial apresentaram descrições como frutal, abacaxi, pêra, banana, doce, fermento e solvente.

Ramos *et al.* (2008) utilizaram a fermentação em estado sólido de pó de casca de coco verde com *Trichoderma harzianum* para produzirem o composto aromático 6-pentil- α -pirona (6-PP) e através da técnica de MEFS conseguiram quantificar 5mg/g de 6-PP após sete dias de fermentação.

Rossi *et al.* (2009) utilizaram o fungo *Ceratocystis fimbriata* através de fermentação em estado sólido da polpa cítrica suplementada com 50% de farelo de soja, 25% de melaço de cana de açúcar e solução salina mineral e obtiveram 99,6 $\mu\text{mol/L}$ de compostos voláteis. Nove compostos foram detectados: o acetaldeído, etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de propila, isobutirato de etila 2- hexanona, 2- hexanol.

Uenojo & Pastore (2010) isolaram mais de 300 microrganismos, onde 80 desses tinham potencial para degradar carotenóides, dentre eles sete foram selecionados através de análise sensorial com produção de aromas e foram submetidos a fermentação submersa para análise cromatográfica. Foram identificados β -ionona, β -ciclocitral, dihidroactinidiolide e 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona, todos produtos da degradação de carotenóides.

Calasans (2012) utilizou três resíduos agroindustriais (bagaço de cana, pó da casca do coco e bagaço de mandioca) como substrato na fermentação em estado sólido com três cepas de *Trichoderma harzianum* (cepa 4040, cepa 4042 e cepa 4038) para produção do 6-pentil- α -pirona. Pelos resultados obtidos foi selecionado o bagaço de cana e a linhagem 4040 do *Trichoderma harzianum* relatando com a maior produção do 6-PP de 3,78mg/g no 7º dia de fermentação.

Esta revisão sobre as condições de fermentação para a produção de substâncias com o aroma característico frutal ou floral revela que nenhum trabalho foi realizado utilizando os resíduos agroindustriais utilizados nessa tese (goiaba, maracujá e umbu), nem que estes sejam

do uso parcial no meio. A literatura citam pesquisas utilizando bagaço de maçã (Bramorski et al., 1998 SSF; Christen et al., 2000; Medeiros et al., 2000); casca de coco verde (Ramos et al., 2008), resíduo de citrus (Rossi et al., 2009; Aggelopoulos et al., 2014; Paraskevopoulou & Mantzouridou, 2014), resíduo de acerola, graviola e mangaba (Leal, 2012).

1.6. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS

1.6.1 *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* é o gênero mais comum dos fungos filamentosos, possuindo mais de 100 espécies, entretanto somente 30 são bem definidas e distinguíveis (Rosa et al., 2002), crescendo em ampla faixa de pH (1.4-9.8) e temperatura (6-47°C) (Schuster et al., 2002). Sua reprodução é assexuada e seu micélio é septado. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, ácidos orgânicos e produção de biossurfactantes (Rocha, 2010; Santos et al., 2011). *A. niger* é utilizada para a produção comercial de ácidos cítrico, glucônico e gálico, beta-galactosidase, lipase e pectinases, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food Drug Administration) dos Estados Unidos. Estudos produzindo aromas utilizando *Aspergillus* também são encontrados na literatura (Kaminski et al., 1974; Rungsardthong & Noomhom, 2005), onde relatam a produção de álcoois insaturados. A Tabela 4 demonstra a classificação taxonômica do *Aspergillus niger*.

Tabela 4: Classificação taxonômica do *A. niger*

Reino	Fungi
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordem	<i>Eurotiomycetidae</i>
Família	<i>Trichocomaceae</i>
Gênero	<i>Aspergillus</i>
Espécie	<i>A. niger</i>

Fonte: http://zipcodezoo.com/Fungi/A/Aspergillus_niger/

1.6.2 *Kluyveromyces marxianus e lactis*

As *Kluyveromyces* multiplicam-se por brotamento multilateral e as células podem ser esféricas, elipsoidais, cilíndricas ou alongadas. Esse gênero possui muitas características que favorecem sua ampla utilização em diversos processos industriais: (1) alta velocidade de crescimento; (2) não são patogênicas, reconhecidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) e QPS (Qualified Presumption of Safety) nos Estados Unidos e União Europeia, respectivamente; (3) possui alta afinidade para vários açúcares; (4) metaboliza lactose, xilose, rafinose e sacarose; (5) produz pequenas quantidades de etanol (efeito Cabtree negativo); faixa de temperatura

ótima de crescimento (30°C-45 °C), fato que diminui os custos com resfriamento e riscos de contaminação (Furlan et al., 1995; Wittmann et al., 2002). As *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* podem ainda ser classificadas como microrganismos unicelulares, nucleados, que não possuem motilidade, podendo se reproduzir sexuadamente (conjugação) ou assexualmente (fissão), capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, forma ovóide, pH ótimo de 5,0 (Rouwenhorst, 1987, Belém et al., 1998). A principal característica comum entre elas consiste na capacidade de assimilar a lactose e utilizar este açúcar como uma fonte de carbono (Lane & Morrissey, 2010).

Há relatos de diversas aplicações biotecnológicas com esses microrganismos, como: a produção de etanol (Oda & Nakamura, 2009), proteína celular (Hong et al., 2007; Schultz et al., 2005), enzimas (Pinheiro et al., 2003), em aplicações ambientais (Hang et al., 2003), produção de compostos de aroma (Drawert & Barton, 1978; Jiang, 1993; Fabre et al., 1995; Jiang, 1995; Medeiros et al., 2000; Medeiros et al., 2001; Plata et al., 2003; Rungarthong & Noomhom, 2005). De maneira geral, produzem aroma de frutas e rosas, com a produção de ésteres, terpenos e feniletanol.

1.7. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POTENCIAIS PRODUTORES DE COMPOSTOS DE AROMAS

A fruticultura no Brasil é responsável pelo desenvolvimento rural, geração de renda e emprego nas diversas regiões do Brasil, favorecida pelas condições climáticas proporcionando ampla variedade de frutas tropicais. O excesso dessa produção é processado na forma de sucos, polpas, doces, geleias, sorvetes e outros produtos. Durante as etapas de processamento de frutas (Figura 2), são gerados resíduos, contendo cascas, sementes, bagaços, caroços. A utilização desses resíduos é uma alternativa para a redução de perdas, redução de problemas ambientais e desenvolvimento da agroindústria do país.

A tendência é que o volume desses resíduos agroindustriais aumente exponencialmente devido ao desenvolvimento econômico da sociedade moderna e uma maior consciência dos problemas ambientais atuais. O descarte inadequado desses resíduos gera inúmeras consequências ao meio ambiente, em contrapartida, a maior parte dos rejeitos é constituída, basicamente, de matéria orgânica, bastante rica em açúcares e fibras, com um alto valor nutricional agregado, podendo ser consumido ou suplementado na alimentação humana (Abud & Narain, 2009).

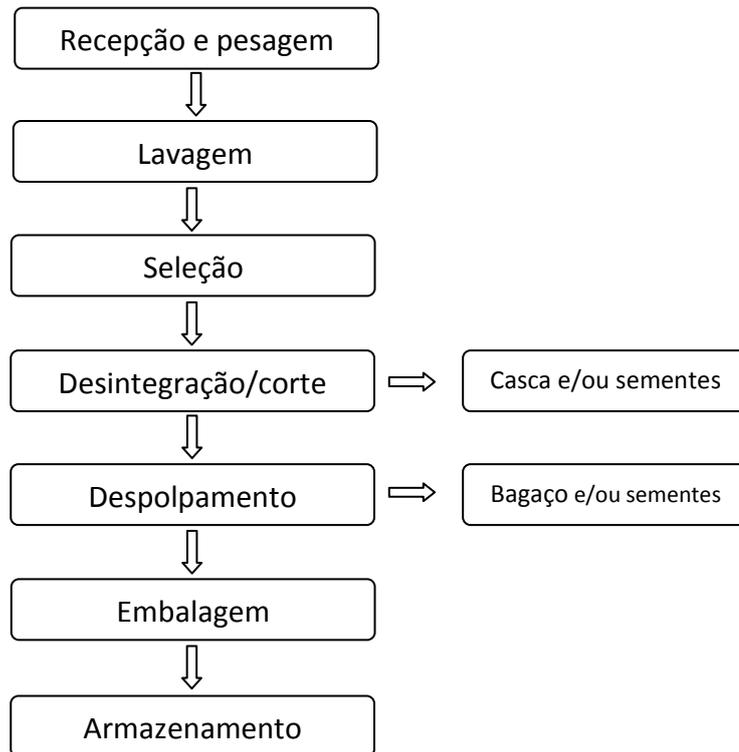


Figura 2: Fluxograma geral da produção de polpa de fruta na indústria de alimentos

Fonte: Adaptado de Silva (1995); Lima et al. (2002);

Dessa forma, o uso de resíduos agroindustriais em bioprocessos vem sendo gradualmente utilizado, uma vez que esses materiais são produzidos em uma enorme quantidade e representam produtos de enorme potencial para bioconversão de produtos de alto valor agregado. Dentre os resíduos mais utilizados industrialmente temos bagaço de cana-de-açúcar (Christen *et al.*, 1997; Sarhy-Bagnon et al., 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Araújo et al., 2002; Oliveira et al., 2006; Sharma et al. 2008; Guimarães et al., 2009; Rossi et al., 2009; Rocha et al., 2011); resíduo de maçã (Berovic & Ostroversnik, 1997; Bramorski et al., 1998; Christen et al., 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Zheng & Shetty, 2000; Medeiros et al., 2000; Dhillon et al., 2011; Aggelopoulos et al., 2014); bagaço de mandioca (Christen *et al.*, 1997; Bramorski et al., 1998; Christen et al., 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Medeiros et al., 2001; Damasceno et al., 2003; Oliveira et al., 2006); farelo de trigo (Kaminski et al., 1972; Kaminski et al., 1974; Christen *et al.*, 1997; Castilho et al., 2000; Damaso et al., 2008; Chenyu et al., 2008; Nizamunddi et al., 2008); polpa e casca de café (Antier et al., 1993; Boccas et al., 1994; Soares et al., 2000; Medeiros et al., 2003; Medeiros et al., 2006; Orozco et al., 2008); farelo de soja (Besson et al., 1997; Larroche et al., 1999; Xiao et al., 2007; Feng et al., 2007; Rossi *et al.*, 2009); casca de arroz (Nizamuddi et al., 2008; Onofre et al., 2012); soro de leite (Fregova et al., 1994; Aggelopoulos et al., 2014).

Dentro desse contexto, visando o aproveitamento de resíduos de frutas produzidas e processadas na região, podemos destacar a goiaba, o maracujá e o umbu, sendo estes bastante utilizadas na produção de polpas, nectáres e sucos industrializados. São inexistentes os trabalhos

que relatam o aproveitamento dos resíduos dessas frutas na produção de compostos de aroma através de processos fermentativos.

1.7.1 Goiaba

A goiabeira pertence ao gênero *Psidium*, da família Myrtaceae, que é composta por mais de 70 gêneros e 2800 espécies. A espécie *Psidium guava* é originária das Américas Central e do Sul, sendo um dos frutos de maior importância nas regiões tropicais e subtropicais, não apenas ao seu valor nutritivo como também pela alta aceitação *in natura*, alta aplicação industrial, além de sua fácil adaptação a diferentes climas (Gongatti Neto et al., 1996; Silva, 2007). Quando maduro são bastante aromáticos e com diferentes tamanhos, pesos, forma e sabor. Sua polpa pode ser de diferentes tonalidades: amarelada, amarelado-ouro, branca, creme, rósea e vermelha escura. Quando madura, sua polpa é sucosa e bastante doce, com sementes reniformes, duras, com tamanhos de 2 a 3mm (Zambão & Bellintani Neto, 1998). De maneira geral, possui baixo teor de açúcar e gordura, com quatro vezes mais vitamina C do que a laranja. Além disso, é rica em fibras, licopeno e vitamina E, com o dobro do teor do tomate (Mattiu, 2004). A composição química do resíduo de goiaba segundo diversos autores está descrita na Tabela 5, onde é possível observar o potencial desse resíduo com relação ao seu teor de fibras.

De acordo com a FAO (2010) os maiores produtores mundiais de goiaba são a Índia, Paquistão, México e Brasil. A região Nordeste é atualmente a maior produtora de goiaba no país. A produção brasileira de goiaba, no ano de 2010, foi de 316.363 toneladas, e os Estados de Pernambuco (102.671 toneladas) e Bahia (15.695 toneladas) destacam-se como os mais produtivos devidos principalmente as condições favoráveis de solo e clima dessa região (IBGE, 2011; AGRIANUAL, 2009). Vale destacar que a maior parte da produção é destinada à indústria para a produção de doce, suco, geléia, polpa congelada, entre outros, uma vez que, o seu consumo "*in natura*" é pequeno, estimado em 300g/per capita/ano (IEA, 2005).

Vale ressaltar que a produção brasileira de goiaba destina-se quase que totalmente ao mercado interno que, nos últimos anos, vêm experimentando significativo aumento de oferta. Do processo de beneficiamento deste fruto há o descarte das sementes que junto com parte da fração da pele e polpa, não separada no processo físico de despulpamento, compõem o resíduo.

Tabela 5: Composição química do farelo do resíduo de goiaba

Determinação	Prasad & Azeemuddin (1994)	Silva (1999)	Schieber et al. (2001)	Matias et al. (2005)*	Kobori & Jorge (2005)	Lousada Jr (2006)	Azevedo et al. (2007)	Uchoa et al. (2008)	Abud & Narain (2009)	Silva et al. (2009)	Santos et al. (2009)	Silva et al. (2009b)	Lira et al. (2011)	Sousa et al (2011)*	Silva 2012	Santos et al. (2012)
Umidade (g/100g)	4,1			74,36	42		28,56	3,33	8,65	8		-	50	65,54	8,13	
Proteínas (g/100g)	7,6	8,6-9,4		1,65		8,47	8,62	1,16	0,58	21	10,9	10,09	9,6	2,82	1,12	
Lipídeos (g/100g)	16%	9,8-11,3	5-13%	0,13	12,3	6,01	7,68	9,74	16,25	12	11,20	11,71	10,8	2,94	9,6	9,6
Cinzas (g/100g)	0,93	1,4-1,6				3,43	1,39	2,14	2,32	4,8	2,21	1,25	2,38	0,72	1,4	
Fibras (g/100g)	61,4			21,11		54,65	65,54	39,5	42,68	43	46,88	55,62	56		53	53
Açúcares redutores (g/100g)				13,30				5,31	-							
Açúcares totais (g/100g)				13,42				5,31	-							
Sólidos solúveis (°Brix)				15,4				10,48	-							
pH				3,51				4,6	4,88							5,85
ATT (g/100g) ²				1,59					0,08							0,20

* Resíduo *in natura*

Cerca de 200 mil toneladas de goiaba são processadas pela indústria na forma de sucos e doces, onde se estima que os resíduos correspondam a 10% (aproximadamente 30 mil toneladas de resíduos) que é constituído principalmente por sementes, que também possuem quantidades significativas de ácido graxo insaturado e matéria fibrosa (Prasad & Azeemoddin, 1994; Goiabras, 2003; Mantovani et al., 2004; Corrêa et al., 2005; Pommer et al., 2006; Souza et al., 2011). Esses resíduos, ao saírem da indústria, apresentam alto teor de umidade, que, no resíduo de goiaba, pode chegar a 53% (Silva et al., 2009). Essa característica tem limitado o uso desses resíduos *in natura*. Por serem estes subprodutos caracterizados frequentemente como potenciais poluidores ambientais, ações que minimizem o volume desses resíduos pode se apresentar como uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e bebidas (Amante et al., 1999; Henningsson et al., 2004; Uchoa et al., 2008)

Todavia, há diversas pesquisas sobre a obtenção de aromas a partir de polpas, sucos ou da fruta *in natura*, dessas frutas como, por exemplo:

MacLeod & Troconis (1982) verificaram a presença de 52 compostos voláteis em goiaba e a classe dos ésteres foi predominante (55%), com acetato de etila, hexanoato de etila, butanoato de etila e acetato de feniletil, sendo os mais representativos.

Ortega et al. (1998) analisou os compostos voláteis em goiaba de 4 variedades e os compostos majoritários foram: limoneno, β -cariofileno, hexanoato de etila e acetato de etila, (*Z*) e (*E*)-hex-2-enal, β -ionona, e (*Z*)-hex-3-enol. Yen & Lin (1999) que comparou suco de goiaba *in natura* e com tratamento térmico e as principais classes de compostos voláteis foram ésteres e alcoóis. Clara et al. (1999) verificou os compostos voláteis presentes em polpa de goiaba vermelha e detectaram 77 compostos com alta concentração de C6 aldeídos (*E*)-hex-2-enal e hexanal. Shibamoto & Tang (1990) atribuíram aos compostos benzoato de metila, 2-feniletil acetato, cinnamil acetato responsáveis pelo aroma da goiaba.

Askar et al.(1986) reportaram que os derivados de cinâmico, aldeídos C6 e β -cariofileno são os responsáveis pelo aroma de goiaba. Pino et al. (2002) consideraram como maiores contribuidores do aroma de goiaba os compostos alifáticos e terpênicos. Os autores detectaram cerca de 170 compostos voláteis utilizando a técnica de extração e destilação simultânea.

Jordan et al. (2003) detectaram 51 compostos voláteis em purê de goiaba. O perfil foi caracterizado pela presença de terpenos e 3-hidroxi-2-butanona. Correa et al. (2010) avaliando os compostos voláteis de néctares de goiaba reportaram a presença de 8 compostos: hexanal, (*E*)-hex-2-enal, 1-hexenol, (*Z*)-hex-3-enol, acetato de (*Z*)-hex-3-enil, acetato de fenil-3-propila, acetato de cinamila e ácido acético.

Soares et al. (2007) avaliaram os compostos voláteis produzidos pela goiaba branca variedade Cortibel em 3 estágios de maturação. Foi utilizada a técnica de headspace. Nos frutos no estágio de maturação verde os compostos predominantes foram os aldeídos tais como: (*E*)-2-

hexenal e (Z)-3-hexenal. No fruto maduro, ésteres como acetato de (Z)-3-hexenil e acetato de E-3-hexenil e sesquiterpenos cariofileno, α -humuleno e β -bisaboleno estavam presentes.

Steinhaus et al. (2008) avaliaram os voláteis presentes na polpa de goiaba e revelaram que 4-metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, acetato de 3-sulfanilhexila, 3-sulfanil-1-hexanol butanoato de etila, hexanal, methional e acetato de cinamila como importante para o aroma.

Sinuco et al. (2010) avaliaram os compostos voláteis produzidos por duas variedades de goiaba da Colombia durante o amadurecimento. Eles reportaram que a concentração de aldeídos C₆, como também a quantidade de compostos sulfurados diminuíram com o amadurecimento.

Porat et al. (2011) encontraram um total de 30 compostos voláteis nos frutos maduros de goiaba, contendo principalmente ésteres, como acetato de (E)-3-hexenil, acetato de 3-fenilpropila e ésteres etílicos, os quais o autor afirma que contribuem com o forte aroma doce e frutal.

1.7.2 Maracujá

O maracujazeiro é originário da América Tropical, com mais de 530 variedades tropicais e subtropicais sendo 150 nativas do Brasil e dentre elas, 60 espécies utilizadas para consumo humano. É um fruto rico em minerais e vitaminas e é bastante apreciado pelo seu aroma e sabor agradável. As espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata*). O maracujá-amarelo é o mais cultivado no mundo, responsável por mais de 95% da produção do Brasil, mais adaptado ao clima quente e utilizado principalmente no preparo de sucos.

O Brasil é o maior produtor mundial com produção de 920 mil toneladas e área de aproximadamente 62 mil hectares (IBGE, 2012). A produtividade média é de 12 a 15 toneladas por hectare, havendo potencial para produção de 30 a 35 toneladas por hectare (Silva et al., 2009b). No Brasil, a produção da fruta destaca-se nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte. Os Estados da Bahia, Espírito Santo e São Paulo são os maiores estados brasileiros produtores do maracujá. A Bahia é o principal produtor, com cerca de 80 mil toneladas, em 7,8 mil hectares (IBGE, 2012).

Na Tabela 6 pode-se observar a composição química do resíduo de maracujá de acordo com a literatura. O resíduo do maracujá é composto de casca e semente e representa 65-70% do fruto. Dentre os subprodutos do maracujá a semente tem merecido destaque por ser um produto rico em fibras, minerais e lipídios, com boa quantidade de proteínas, podendo ser utilizada na produção de óleos comestíveis ou na indústria de cosméticos (Oliveira et al., 2002; Córdova et al., 2005).

Tabela 6: Composição química do resíduo de maracujá

Determinação	Henderso Medina et al. (1978)	Medina et al. (1980)	Butolo (1993)	Correa et al. (1994)	Korndorfer et al. (1998)*	Vieira et al. (1999)	Ferrari et al. (2004)	Kobori & Jorge (2005)	Lousada Jr (2006)	Neiva et al. (2007)	Azevedo et al. (2007)	Abud & Narain (2009)	Souza et al. (2010)**	Oliveira et al. (2011)
Umidade (g/100g)			38,79		24,7	10-17		9		23,70	19,5	8,85	0,15	14,8
Proteínas (g/100g)			12,4		15,3	7,5-9,8	15,62		12,36	8,65	9,97	0,41	5,72	
Lipídeos (g/100g)	24,5	27	21,6	25			25,7	24	1	4,87	12,20	19,05		
Cinzas (g/100g)			3,55						9,84		3,68	4,41	6,33	
Fibras (g/100g)			45,58		50				48,9		57,18	47,00		
Açúcares redutores (g/100g)													11,71	
pH					4,1							4,21	3,57	
ATT (g/100g) ²												0,15		

* *in natura*

** casca

1.7.3 Umbu

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) é uma espécie frutífera xerófila, rústica, pertencente à família *Anacardiaceae*, perfeitamente adaptada às regiões semiáridas do Nordeste brasileiro, de tronco curto, vida longa (100 anos). O seu fruto possui casca amarelo-esverdeada e polpa branco-esverdeada, mole, succulenta e de sabor agridoce agradável, rica em vitamina C e sais minerais (Folegatti et al., 2003), possuindo 30-45% de resíduo (casca e caroço). O umbu possui qualidade nutritiva, aroma e sabor agradáveis, sendo consumidos principalmente como fruta fresca, como também na forma processada como refresco, polpas, sorvetes, geleia, doces, licor, vinho, picolés, sucos, néctares e “umbuzada” (polpa de umbu cozida com leite e açúcar).

Em 2009 foram coletadas no país 9.428 toneladas de umbu, sendo a Bahia a maior produtora (89%), seguida por Pernambuco 4% e Rio Grande do Norte com 2%. O restante da produção é proveniente da Paraíba, Ceará, Minas Gerais e Piauí (IBGE, 2010).

A Tabela 7 apresenta os valores da composição química da polpa e resíduo de umbu por vários autores. Abud & Narain (2009) avaliaram o resíduo de umbu composto de casca seca propondo utilizar na formulação de biscoitos. Silva (2012) caracterizou o resíduo (caroço) de umbu com o objetivo de utilizá-lo como adsorvente em tratamento de efluentes.

Tabela 7: Composição química da polpa e resíduo de umbu

Determinação	Galvão (2002) *	Lima et al. (2002) *	Lira Junior et al. (2005*)	Abud & Narain (2009) **	Santos et al. (2011) *	Da Silva (2012)***
Umidade (g/100g)	89,22			8,88	91,3	8,5
Proteínas (g/100g)	0,88			0,43	0,63	16,38
Lipídeos (g/100g)	0,43			10,75	0,11	16,63
Cinzas (g/100g)	0,70			12,50	0,99	3,19
Fibras (g/100g)	2,20			13,52	1,36	8,82
Açúcares redutores (g/100g)	2,11				4,12	
Açúcares totais (g/100g)	3,13				7,49	
Sólidos solúveis (°Brix)	17,8	11,25	14,84		10,00	
pH	2,75	2	2,20	3,12	2,4	
ATT (g/100g) ²	2,35	1,77	1,66	0,27	1,32	

* Polpa; ** Casca; *** Caroço

São escassos os estudos que utilizam resíduos de umbu, sendo importante o seu estudo no setor agroindustrial que está em plena expansão nos últimos anos.

Galvão et al. (2011) estudaram o aroma de umbu em dois estádios de maturação e encontraram 246 compostos voláteis e as principais classes foram alcoóis, ésteres, cetonas, terpenos, entre outros.

1.8. METODOLOGIA DA PESQUISA DO SABOR

A pesquisa dos constituintes voláteis do sabor é bastante complexa e ainda é um desafio, pois estes compostos são bastante sensíveis, estando sujeitos a modificações e perdas durante a extração, além de apresentar diferentes propriedades químicas e estarem presentes em quantidade extremamente diminuta, instáveis e geralmente são termolábeis. Qualquer aumento de temperatura pode acarretar em reações químicas, tais como rearranjos, hidrólise, ciclizações, entre outras, modificando assim a composição original da amostra. Esta etapa merece mais atenção em se tratando de amostras geradas biotecnologicamente, pois são ainda mais sensíveis e biologicamente ativas (Bicas et al., 2010).

Este tipo de pesquisa compreende pode ser divididas em quatro etapas fundamentais: o isolamento dos compostos voláteis; a separação por cromatografia gasosa de alta resolução; a identificação dos compostos voláteis e a análise sensorial.

- Isolamento dos compostos voláteis

A etapa de isolamento é a mais crítica, requerendo maiores cuidados visto que qualquer modificação causada nesta etapa não poderá mais ser recuperada/corrigida, por mais sofisticado que sejam os equipamentos utilizados nas próximas etapas. Para extrair e concentrar os compostos voláteis produzidos vários métodos podem ser utilizados para a remoção seletiva destes compostos do meio fermentativo. Este isolamento pode ser realizado através de duas abordagens: análise total e análise por “headspace” (Franco & Janzantti, 2004).

A análise total consiste na análise de todos os compostos voláteis presentes na amostra. Neste tipo de análise é frequentemente utilizada uma unidade de destilação-extração simultânea (Nickerson & Likens, 1966), com a desvantagem de utilizar temperaturas elevadas e uso de solvente, ocasionando em modificações significativas na composição dos voláteis. A extração por solvente (líquido-líquido) é baseada na partição do analito entre uma fase aquosa e um solvente orgânico imiscível na água (Vendramini & Trugo, 2000). Esta técnica pode utilizar solventes puros ou misturas de solventes, sendo os mais utilizados o diclorometano, éter etílico, acetato de etila, pentano e o hexano, principalmente por apresentarem um baixo ponto de ebulição, permitindo que os componentes mais sensíveis não sejam destruídos por aquecimento, e seletividade, ou seja, permitindo que as substâncias odoríferas sejam removidas primeiro (Marsili, 1997; Nogueira, 2002). Algumas desvantagens desta técnica são devido ao emprego de calor, perdas ou modificações significativas podem ocorrer na composição de voláteis, assim como impurezas

presentes no solvente podem contaminar o isolado, a grande manipulação que a amostra sofre, baixa reprodutibilidade, perdas de compostos de baixo ponto de ebulição e um grande volume de solvente utilizado, tornando-se necessária uma concentração posterior. A técnica de micro extração com solvente é mais rápida e reprodutível, fundamentalmente porque elimina a etapa de concentração. Em estudos envolvendo bebidas alcoólicas, o grau alcoólico pode afetar diferencialmente os coeficientes de distribuição, sendo, portanto, necessária a adição de sais para minimizar o efeito (Ortega et al., 2001). Outra técnica é a extração em fase sólida (SPE) onde os componentes do aroma ficam retidos num polímero e posteriormente são eluídos com solvente. Esta técnica tem a desvantagem de extrair compostos pouco voláteis que podem contaminar o injetor/detector (Santos, 2006).

A segunda abordagem envolve uma análise do "headspace", escolha que vem oferecendo resultados significativos e reprodutíveis de uma forma simples e eficiente (Venema, 1990). Nessa técnica, o estudo de uma amostra (líquida ou sólida) é substituído pela análise da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra. Existem dois tipos de análise por "headspace": "headspace" estático e "headspace" dinâmico. No primeiro, a amostra é mantida em um recipiente fechado até que se atinja um equilíbrio termodinâmico dos compostos voláteis entre a fase líquida e a fase de vapor, a uma determinada temperatura, geralmente a ambiente. A fase de vapor, onde estão concentrados os voláteis, que está em equilíbrio com a fase sólida/líquida da amostra é retirada com uma seringa e injetada diretamente no cromatógrafo gasoso. A análise direta do headspace estático, apesar da simplicidade e pouco manuseio da amostra, permite detectar apenas os componentes que apresentam maior pressão de vapor e, portanto, maior concentração no headspace, de um sistema fechado (Franco & Janzantti, 2004). Devido às pressões parciais significativamente menores do que a pressão parcial do vapor de água, os analitos de interesse estão em concentrações geralmente baixas, obtendo-se, portanto, cromatogramas pobres e limitados. Como a injeção de um volume maior é um procedimento contrário à prática cromatográfica, os compostos voláteis do "headspace" devem ser concentrados requerendo um controle rígido da temperatura de equilíbrio, tempo e pressão (Gobato & Lanças, 2001).

No "headspace" dinâmico há uma coleta contínua dos compostos voláteis realizada por um sistema a vácuo (Franco & Rodriguez-Amaya, 1983) ou pela passagem de um gás inerte (Jennings et al., 1972; Jennings & Rapp, 1983) através de polímeros porosos (tais como Porapak e Tenax), e posterior retenção dos voláteis por adsorção, seguida de eluição pelo emprego de solvente ou temperatura. Nestes sistemas, o tempo de captura e da dimensão da armadilha são as variáveis que determinam as condições ótimas da análise. Posteriormente, os compostos voláteis são eluídos da armadilha utilizando-se um solvente orgânico adequado, ou desorvidos pelo aquecimento do trap. Nesse caso, os compostos desorvidos vão sendo arrastados diretamente para a coluna cromatográfica e a perda de voláteis é praticamente nula (Noble et al., 1980; Salinas et al., 1994; Rosillo et al., 1999).

O método de micro extração em fase sólida (MEFS) é uma ferramenta sensível e poderosa para a caracterização de compostos orgânicos voláteis em matrizes complexas (Ibáñez et al., 1998; Hayasaka et al., 2003). As primeiras publicações nessa área foram de Berlardi & Pawliszyn (1989) e Arthur & Pawliszyn (1990). O sistema básico para MEFS (Figura 3) consiste de um “holder”, um êmbolo e uma agulha de aço. Quando o êmbolo é deslocado para baixo, a haste metálica é exposta, e na extremidade dessa haste contêm a sílica recoberta pelo polímero com diferentes fases estacionárias, podendo ser polímero (polidimetilsiloxano - PDMS, poliacrilato - PA, divinilbenzeno - DVB ou carbowax - CW) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado = carboxen - CAR).

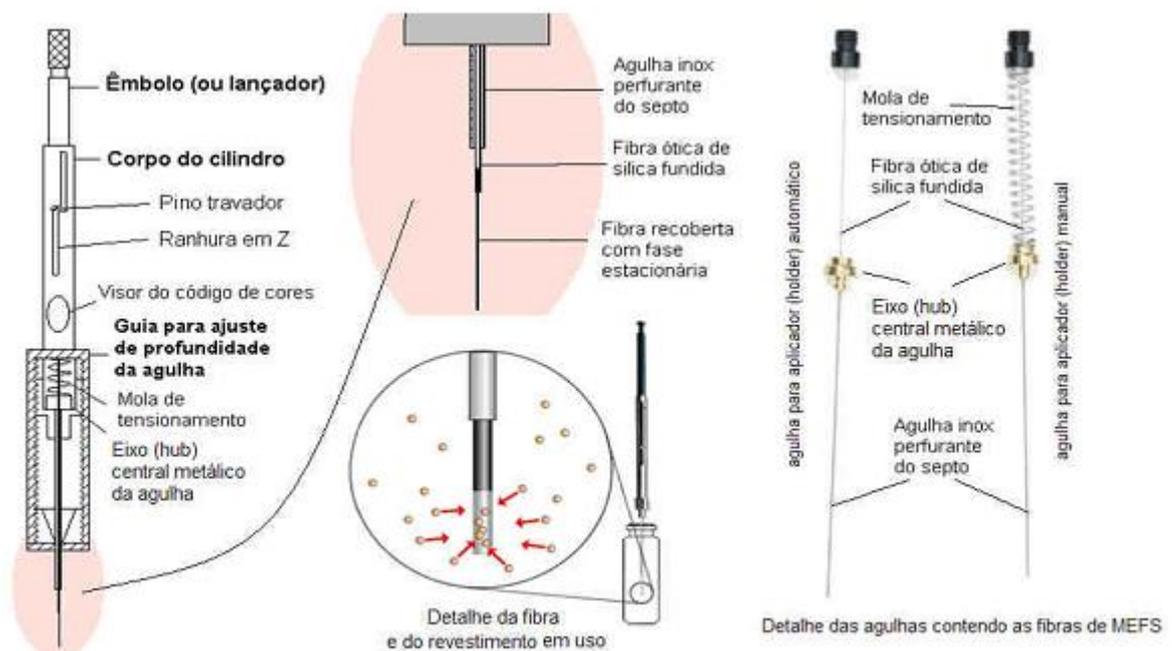


Figura 3: Dispositivo de MEFS com detalhes do aplicador (holder) e da fibra de sílica fundida.

Fonte: Damasceno (2007)

Esse método é baseado na técnica de sorção (absorção e/ou adsorção), conforme Figura 4. A desorção é realizada diretamente com a exposição no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás, onde os analitos sofrem desorção térmica e são subsequentemente analisados. As principais vantagens são a simplicidade, a rapidez, mínima manipulação e o não uso de solvente, entretanto, é muito dependente das condições do experimento e da amostra, o que é refletido na sensibilidade e reprodutibilidade do método analítico (Yang & Peppard, 1994; Zeldá, 1996; Martí et al., 2003; Zhang et al., 2007; Bosh-Fustéa et al., 2007).

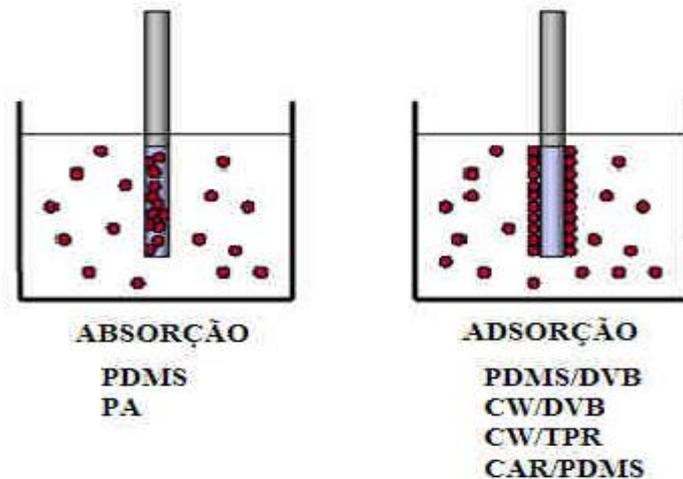


Figura 4: Esquema das diferentes fibras de MEFS de acordo com o princípio de extração por absorção ou por adsorção.
 Fonte: Aumatell (2005)

A espessura do revestimento e a sua natureza (Figura 5) polar (PA, CW-DVB), apolar (PDMS), bipolar ou semipolar (PDMS-DVB, CAR-PDMS) e a dotada de triplo revestimento de polaridade intermediária (DVB-CAR-PDMS) são as principais características que governam a seletividade e a eficiência da extração (Damasceno, 2007). As características da fibra extratora devem ser escolhidas de acordo com as características dos analitos a serem extraídos.



Figura 5: Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos (fase estacionária) comerciais para MEFS.
 Fonte: Damasceno (2007).

A extração dos analitos com a fibra de MEFS pode ser utilizada por submersão em uma fase líquida (imersão direta) ou por exposição a uma fase gasosa (*headspace*) em equilíbrio com

a amostra, a uma determinada temperatura (Arthur et al., 1992). Os compostos adsorvidos são desorvidos termicamente por exposição da fibra no injetor do cromatógrafo.

Essa técnica baseia-se na cinética de transferência de massa e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre as fases (Valente & Augusto, 2000). Tem como principais vantagens a simplicidade, a rapidez e livre de solvente (Lord & Pawliszyn, 2000).

Alguns parâmetros na MEFS estão diretamente ligados com a capacidade da fibra em capturar compostos voláteis: o volume da amostra e do *headspace*, tipo e espessura do revestimento polimérico, adição de sal, pH da solução, temperatura de extração, agitação, assim como a composição do produto fermentado (Begala et al., 2002; Franco & Janzantti, 2004; Howard et al, 2005; Antalick et al, 2010).

Outra técnica de headspace é a técnica de *Purge and Trap*, a qual consiste numa técnica cromatográfica de headspace dinâmico relativamente recente para o alcance comercial, embora a sua primeira descrição acontecesse em 1967 (Adlard & Devenport, 1983). Esta técnica é aplicada principalmente para determinação de compostos orgânicos de baixa concentração. O princípio desta técnica consiste na remoção dos compostos orgânicos voláteis da matriz pela purga da amostra através de um gás inerte, onde os compostos orgânicos são “capturados” na “armadilha”. Os compostos orgânicos são então desorvidos termicamente no gás “carregador” para o cromatógrafo, onde são separados e detectados pela forma usual.

O *trap* (armadilha) é o local onde os compostos voláteis são retidos e concentrados e o mesmo pode ser constituído por uma substância adsorvente (polímero poroso) ou um condensador (com ou sem solvente). A maioria dos sistemas prefere usar o *trap* de polímero poroso para concentração de compostos voláteis. Os principais polímeros utilizados são Porapaq Q (copolímero de etilvinilbenzeno divinilbenzeno) e o Tenax (polímero baseado no óxido de 2,6-difenil-fenileno). Williams *et al.*, (1978), concluíram que o Tenax apresenta melhores resultados do que o Porapaq Q, para os compostos orgânicos na forma geral. Outras vantagens do Tenax é a facilidade do emprego de temperaturas altas (260°C) de acondicionamento e manter os compostos voláteis do *headspace* sem que ocorram alterações. Gobato & Lanças (2001) ressaltam que *Purge e Trap* possui a vantagem de um maior volume de amostra, onde o *trap* age como um concentrador das amostras.

A literatura (Weurman, 1969; Jennings & Rapp, 1983; Silva & Neves, 1997; Lopes et al., 1999; Larráyoiz et al., 2001; Wilkes, et al., 2000; Lee et al., 2003; Sánchez-Palomo et al., 2009) ressalta a importância de investigação dos constituintes voláteis por técnicas diferenciadas, pois segundo os autores existem relação entre os compostos voláteis e sua matriz.

-Separação dos compostos voláteis

O isolado dos compostos voláteis é uma mistura muito complexa e requer para a sua melhor separação a aplicação de cromatografia gasosa de alta resolução. Skoog (2009) demonstra como a cromatografia é um método eficaz e bastante utilizado na separação e determinação de misturas complexas. A amostra é transportada por uma fase móvel, um gás, e passando por uma fase estacionária no interior de uma coluna. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes das amostras difundam-se nas fases móvel e estacionária de forma variada. Os componentes que possuem maior afinidade com a fase estacionária permanecem retidos nesta por mais tempo, diminuindo sua velocidade com relação ao fluxo da fase móvel. Contrariamente, os componentes que possuem menor afinidade com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. As diferentes velocidades de migração dos componentes da amostra permitem a separação destes em bandas ou zonas discretas.

A amostra é injetada manualmente ou por injetor automático no injetor aquecido e sofre volatilização e os voláteis são introduzidos na coluna cromatográfica. Os injetores para cromatografia gasosa, responsáveis pela introdução de uma banda estreita da amostra na coluna, compreendem os tipos "split-splitless", "on-column" e "programmed temperature vaporizer" (PTV). Os dois últimos injetores, além do tipo "split-splitless" usado na forma "splitless", são os mais indicados para análise de traços.

As colunas capilares de sílica fundida oferecem maior capacidade de resolução e alta eficiência, além disso, apresentam elevado número de pratos teóricos e com grande poder de resolução, possibilitando a separação de diversas classes de compostos químicos com largas faixas de polaridade, solubilidade e pontos de ebulição. As fases estacionárias podem ser quimicamente ligadas às paredes da coluna e, nesse caso, são chamadas de colunas quimicamente ligadas. Tais fases apresentam baixa volatilidade, estabilidade térmica e inatividade química, apresentando menor sangramento e maior tempo de vida útil da coluna. Os compostos da amostra, pertencentes a diferentes classes de substâncias, vão sendo arrastados por um gás inerte (fase móvel). Cada composto tem uma afinidade pela fase estacionária e é isto que possibilita a separação dos compostos (Pereira & Aquino Neto, 2000; Pereira et al., 2004).

- Identificação dos compostos voláteis

A identificação de compostos voláteis teve grande avanço com a associação de cromatógrafos gasosos a espectrômetros de massas. A união dessas duas poderosas técnicas de análise química introduziu uma ferramenta eficaz na separação e na identificação de compostos provenientes de misturas complexas, sendo muito útil na análise de aromas.

O espectrômetro de massas é acoplado ao final da coluna cromatográfica, de onde os componentes previamente separados emergem diretamente para a câmara de ionização, aonde

sofre uma fragmentação gerando íons que são analisados e representados pelo espectro de massas. As fontes de ionização mais comumente utilizadas são as de impacto de elétrons e de ionização química. As moléculas dos componentes são, então, fracionadas e seguem para o analisador de massas, onde são detectadas e identificadas. Geralmente, os detectores quadrupolos e íon trap (armadilhas de íons) são utilizados como analisadores de massas (Skoog, 2009)

O espectro de massas mostra as porcentagens de fragmentação característica de um composto. As características dos espectros de massas são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos, onde as relações massa/carga obtidas podem ser transformadas em informação estrutural a partir de estudos sobre mecanismos de fragmentação dos compostos (McLafferty, 1994). Sistemas modernos de biblioteca auxiliam na identificação dos compostos desconhecidos através de comparação com espectros padrões, armazenados na memória do computador na forma de bibliotecas eletrônicas (Franco & Janzantti, 2004). Os resultados obtidos são então confrontados com os dados da biblioteca inserida no sistema, informando rapidamente os possíveis resultados com certo grau de certeza. No entanto, o espectro de massas de um composto não é suficiente para determinar sua identidade, pois existem espectros de massas muito similares. Então, é necessário o conhecimento das características de retenção, quando compostos diferentes apresentam espectros de massas semelhantes.

O índice de retenção de um componente é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos eluídos antes e após o pico do composto de interesse (Inczedy et al., 1998). Os índices de retenção mais divulgados na literatura são o índice Kováts e o índice de retenção linear (IRL). O índice Kováts é aplicado para condições isotérmicas. Quando se utiliza gradiente de temperatura um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos. Este valor é chamado de índice de retenção linear. Devido à complexidade das matrizes e à ineficiência nas técnicas de extração é apropriado o uso do IRL na identificação de compostos (Inczedy et al., 1998, IUPAC, 2013).

Para a determinação dos índices de retenção geralmente uma mistura padrão de n-alcenos é injetada no sistema CG-EM operando nas condições cromatográficas idênticas das amostras e seus respectivos tempos de retenção são utilizados como padrões externos de referência para o cálculo do índice de Kováts (I) e do índice de retenção linear (LRI - Linear Retention Index) em conjunto com o tempo de retenção de cada substância de interesse (Jennings & Shibamoto, 1980).

- Análise sensorial

A análise instrumental quando combinada com a análise sensorial fornece resultados com aplicabilidade prática. Nesse sentido, é necessário correlacionar os resultados sensoriais com as técnicas de separação e identificação de compostos voláteis.

A análise sensorial de alimentos tornou-se uma ferramenta de grande valia, sobretudo para as indústrias de alimentos, ao longo dos anos, já que tem como principal objetivo procurar constantemente recursos para identificar e atender as necessidades dos consumidores em busca de novos produtos com qualidade superior (Minim, 2010). No século XXI, a análise sensorial tornou-se mais importante do que nunca, já que para um mercado afetado diretamente pelo consumidor, estudar os alimentos, a utilização de máquinas e reações químicas não basta mais. Desde então a indústria e a academia uniram-se e vem utilizando a análise sensorial como ferramenta para a criação de produtos de sucesso com o entendimento das propriedades sensoriais dos materiais utilizados na fabricação desses produtos (Otles, 2012).

O destino final de qualquer produto da indústria alimentícia é o consumidor, logo, a aceitação/preferência dos alimentos é melhor avaliada quando o mesmo faz parte desse processo. É nesta relação que temos a análise sensorial que permite esse elo entre o consumidor e o produto, fornecendo aos interessados informações preciosas que vai refletir a posição do mesmo no mercado, uma vez que não basta um produto ter características químicas, físicas e microbiológicas satisfatórias, se sensorialmente esse produto não é bem aceito pelo público (Minim, 2010).

A ciência sensorial é multidisciplinar englobando áreas como psicofísica, estatística e outras ciências relacionadas com o produto de interesse. A evolução sensorial é fruto da ciência sensorial e comprime um conjunto de métodos para estimular indivíduos, avaliar suas respostas, analisar os dados e interpretar os resultados com mínima ou nenhuma interferência de outros fatores além do produto de interesse (Otles, 2012).

A análise sensorial permite identificar as características ou propriedades de um alimento que lhe agradam. Na análise sensorial existem vários métodos que podem ser aplicados de acordo com o objetivo (Da Silva, 1992).

Na análise sensorial, as metodologias podem ser classificadas em três grandes grupos: testes discriminativos, testes descritivos e testes afetivos. Os testes discriminativos tem por objetivo medir atributos específicos pela diferenciação simples, indicando por comparações, se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras (IAL, 2008; Chaves, 2005). Os testes descritivos têm por objetivo identificar, descrever e quantificar atributos sensoriais específicos de produtos (Chaves, 1998). Os testes de aceitação têm por objetivo coletar informações subjetivas quanto ao grau de preferência ou o grau de aceitação entre um grupo de amostras em estudo por consumidores em potencial.

1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAM. Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos. Disponível em: <http://www.abiam.com.br> Acesso em: 15 de jul. 2013.

Abraham, B.G.; Berger, R.G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.10, p.2344-2348, 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. *Brazilian Journal of Food Technology*, 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.

Adams, T.B. The FEMA GRAS assessment of phenethyl alcohol, aldehyde, acid, and related acetals and esters used as flavor ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, v.43, p.1179-1206, 2005.

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.

Aggelopoulos, T.; Katsieris, K.; Bekatorou, A.; Pandey, A.; Banat, I.M.; Koutinas, A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, v.145, p.710–716, 2014.

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. Instituto FNP: São Paulo. 497p. 2009.

Aksu, Z.; Eren, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, v. 40, p.2985-2991. 2005.

Albertazzi E.; Cardillo R.; Servi S.; Zucchi G. Biogeneration of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. *Biotechnology Letters*, v.16, p. 491-496, 1994.

Alcarde, A.R.; Souza, P.A.; Belluco, A.E.S. Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p.355-360, 2011.

Amante, E.R.; Castilho Junior, A.B.; Kanzawa, A.; Ensslin, L.; Muraki, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos*, Campinas, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1999.

Annan, NT, Sefa-Dedeh, S, Plahar, WA; Jakobsen, M. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.462-474, 2003.

Antalick, G., Perello, M. C., & de Revel, G. (2010). Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121, 1236–1245.

Araújo, A.A., Pastore, G.M.; Berger, R.G. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, n.1-9, p.747-751. 2002.

Armstrong, D.W.; Brown, L.A. Aliphatic, aromatic and lactone compounds. In: Gabelman, A. *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients*. New York: John Wiley & Sons Inc., p.41-94. 1994.

Arthur, C. L.; Killam, L.M.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J.; Berg, J.R. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, v. 64, p. 1960-1966, 1992.

Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

Askar, A.; El-Nemr, I.; Bassiouny, S. S. La guayaba y otras frutas tropicales. *Alimentaria*, v. 25, p. 162-167, 1986.

Aumatell, M. R. Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta. 2005. 136p. Tese (Doctorat) - Universitat de Barcelona, Barcelona, 2005.

Ayala-Zavala, J. F.; Vega-Vega, V.; Rosa-Domínguez, C.; Palofax-Carlos, H.; Villa-Rodríguez, J.A.; Siddiqui, M.W.; Dávila-Aviña, J.E.; González-Aguilar, G.A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, v. 44, p. 1866-1874, 2011.

Azevêdo, J.A.G. ; Valadares Filho, Sebastião De Campos ; Pina, D. S. ; Detmann, E. ; Souza, N.K.P. ; Xavier, C.V. . Composição química e parâmetros da cinética de produção de gases in vitro de resíduos de fruta para alimentação de ruminantes. In: XVII Congresso Brasileiro de Zootecnia e IX Congresso Internacional de Zootecnia, 2007, Londrina. XVII Congresso Brasileiro de Zootecnia e IX Congresso Internacional de Zootecnia, 2007.

Begala, M., Corda, L., Podda, G., Fedrigo, M. A., & Traldi, P. (2002). Headspace solidphase microextraction gas chromatography/mass spectrometry in the analysis of the aroma constituents of ‘Cannonau of Jerzu’ wine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 1086–1091.

Berger, R.G. Aroma compounds from microbial De Novo synthesis. In: *Aroma Biotechnology*. p. 51-75, Ed. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 240p. 1995.

Berger, R.G.; Neuhaeuser, K.; Drawert, F. Biotechnological production of flavor compounds. III. High productivity fermentation of volatile flavours using a strain of *Ischnoderma benzoni*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, n.8, p.987-990, 1987.

Berlardi, R.; Pawliszyn, J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organic water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canadá*, v. 24, p. 179, 1989.

Besson, I.; Creuly, C.; Gros, J.B.; Larroche, C. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid state fermentation on soybeans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, p.489–495, 1997.

Bhatt, P.C.; Ahmad, M.; Panda, B.P. Enhanced bioaccumulation of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by utilising low-cost agro products as fermentation substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.2, p. 58–63, 2013.

Bicas, J.L.; Silva, J.C.; Dionísio, A.P.; Pastore, G.M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p.7-18, 2010.

Bidan, P. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotes en particulier en acides animés. *Bulletin de L'OIV*, v.536, p. 842-867, 1975.

Blank, I. In: Marsili, R. (Ed.) *Techniques for Analyzing Food Aroma*. Marcel Dekker: New York, 1996, chap. 10.

Bosch-Fustéa, J.; Riu-Aumatell, M.; Guadayol, J.M.; Caixach, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. *Food Chemistry*, v.105, p.428–435. 2007.

Bramorski, A.; Soccol, C. R.; Christen, P.; Revah, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 208-212, 1998.

Calasans, P.N. Produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Sergipe. 2012.

Carvalho, D.S.; Dionísio, A.P.; Santos, R; Boguzus Júnior, S.; Godoy, H.T.; Pastore, G.M. Production of 1-octen-3-ol by *Neurospora* species isolated from beiju in different culture medium. *Procedia Food Science*, v. 1, p. 1694-1699, 2011.

Carvalho, P. C. L.; Ritzinger, R.; Soares Filho, W. S.; Ledo, C. A. S. Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de população de umbu-cajazeira no Estado da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.1, p.140-147, 2008.

CEC. Council of the European Communities: Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988. Disponível em: http://europa.eu/legislation_summaries/other/l21072_pt.htm, acessado in outubro 2013

Chaves, J.B.P. *Análise sensorial – História e Desenvolvimento*. Viçosa: Ed. UFV, 1998.

Chaves, J.B.P. *Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas*. Viçosa: Ed. UFV, 2005.

Cheetham, P.S.J. The use biotransformation for the production of flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 11, p.478-488, 1993.

Chenyu, D.; Lin, S.K.C.; Koutinas, A.; Wang, R.; Dorado, P.; Webb, C. A wheat biorefining strategy base on solid-state fermentative production of succinic acid. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8310-8315, 2008.

Chiappini, C.C.J.; Barbosa, A.B.; Figueiredo, S.C.; Leite, S.G.F. Validação de um desempenho experimental para testes sensoriais comparativos com muitas amostras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 475-479. 2005.

Christen, P.; Bramorski, A.; Revah, S.; Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grow on agroindustrial solid wastes. *Bioresource Technology*, v. 8, 211-215, 2000.

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.

Córdova, K. V.; Gama, T. M. M. T. B.; Winter, C. M. G.; Neto, G. K.; Freitas, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos Curitiba*, v. 23, n. 2, p.221-230, 2005.

Cormier, F.; Raymond, Y.; Champagne, C.P.; Morin, A. Analysis of odor-active volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.159-161, 1991.

Corrêa, M.C.M.; Fernandes, G.C.; Prado, R.M.; Natale, W. Propriedades químicas de solo tratado com resíduo orgânico da indústria processadora de goiabas. *Revista Brasileira Agrociência*, v. 11, p. 241-243, 2005.

Correa, M.I.C.; Chaves, J.P.B.; Jham, G.N.; Ramos, A.M.; Minim, V.P.R.; Yokota, S.R.C. Changes in guava (*Psidium guajava* L. var. Paluma) nectar volatile compounds concentration due to thermal processing and storage. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, p.1061-1068, 2010.

Da Silva, M. A. A. P. Flavor Properties and Stability of a Corn Based Snack: Aroma Profiles by Gas Chromatography (GC), GC-Olfatometry, Mass Spectrometry and Descriptive Analysis (Tese de Doutorado). Oregon State University, 158p., 1992.

Da Silva, M. A. A. P; Lundhal, D. S.; McDaniel, M. R. The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique. In: Maarse, H.; Van Der Heij, D.G.(Eds). *Trends in Flavor Research*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 191-209, 1994.

Damasceno, F. C. Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas. 2007, 143 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

Damasceno, S. Cultivo de *Geotrichum fragrans* em Manipueira. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, 1999.

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.

Darriet P., Lavigne-Cruège V., Tominaga T. Un paradoxe: les composés soufrés volatils responsables de défauts et de qualités dans les vins. *Journal International des Sciences de la Vigne et Du Vin*, v.40, p.137-143. 1999.

Deetae, P.; Saint-Eve, A.; Spinnler, H.E.; Helinck, S.; Critical effect of oxygen on aroma compound production by *Proteus vulgaris*. *Food Chemistry*, v. 126, p. 134-139. 2011.

Dhillon, G.S.; Kaur, S.; Brar, S.K. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.27, p.789–805, 2013.

Dias, L.; Pereira Da Silva, S.; Tavares, M.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeasts *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, v. 20, 377-384, 2003.

Drawert, F.; Barton, H. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.26, n.3, p.765-766, 1978.

Dubal, S.A.; Tilkari, Y.P.; Momin, S.A.; Borkar, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced Biotech*, v.20, p.20-31, 2008.

Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, v.135, p.1893-1902. 2004.

Escamilla-Hurtado, M.L.; Valdes-Martinez, S.E.; Soriano-Santos, J.; Gomez-Pliego, R.; Verde-Calvo, J.R.; Reyes-Dorantes, A.; Tomasini-Campocoso, A. Effect of culture conditions on production of butter flavor compounds by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in semisolid maize--based cultures. *Int. J. Food Microbiology*, v.105, p.305–316, 2005.

Etiévant, P.X. 1991. Wine. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. H. Maarse (Ed.), pp. 483-546. Marcel Dekker, New York.

Etiévant, P.X.; Callement, G.; Langlois, D.; Issanchou, S.; Coquibus, N. Odor intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by finger span method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 1673-1680, 1999.

Etschmann, M.M.W.; Bluemke, W.; Sell, D.; Schrader, J. Biotechnology production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p.1-8, 2002.

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.

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

Fabre, C.E.; Condoret, J-S.; Marty, A. Extractive fermentation of aroma with supercritical CO₂. *Biotechnology and Bioengineering*, v.70, p.392-400, 1999.

Fabre, C.E.; Duviau, V.J.; Blanc, P.J.; Goma, G. Identification of volatile flavor compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biothechnology Letters*, v. 17, p. 1207-1212, 1995.

FAO – Tropical Fruits Compendium. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/218/en/partcomp_2005.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2010

FDA. US Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations Title 21 (CFR/1993, revisado em 1 de abril de 2013). Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.22>. Acessado em outubro de 2013.

Feron, G.; Bonnarne, P.; Durand, A. Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, p. 285-293, 1996.

Franco, M. R. B.; Janzanti, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: Franco, M. R. B. (Ed.). *Aroma e Sabor de Alimentos: Temas Atuais*. São Paulo: Varela, 2004. Cap. 1, p. 17-27.

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

Franco, M.R.B.; Rodriguez-Amaya, D. B. Trapping of soursop (*Annona muricata*) juice volatiles on porapak Q by suction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 34, n. 4, p. 293-299, 1983.

Frengova, G.; Simova, E.; Pavlova, K.; Beshkova, D.; Grigorova, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, v.44, p.888–894, 1994.

Galembeck, F. Synergy in food, fuels and materials production from biomass. *Energy Environ. Science*, v. 3, p. 393-399, 2010.

Gatfield I.L., Production of flavour and aroma compounds by biotechnology, *Food Technol.*, v.10, p.110–122, 1988.

Gatfield, I.L. Enzymatic and microbial generation of flavor. *Perfumer & Flavorist*, v. 20, p. 5-14, 1995.

Gobato, E.A.A.F.; Lanças, F.M. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. *Química Nova*, v. 24, p. 176-179. 2001.

GOIABRAS. Associação Brasileira dos Produtores de Goiaba. 2003. Disponível em: <http://www.goiabras.org.br> Acesso em: 2/4/2010.

Gómez, E.; Laencina, J.; Martinez, A. Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 2, 406-409, 1994

Gongatti Neto, A.; Garcia, A.E.; Ardito, E.F.G. Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: Embrapa. 1996. 35p. (Publicações técnicas Frupep: 20).

Griffin, S.G.; Wyllie, S.G.; Markham, J.L.; Leach, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, v.14, p.322-332. 1999.

Grosch, W. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour and Fragrance Journal*, 9, p. 147-158, 1994.

Hamilton-Kemper, T.R.; Archbold, D.D.; Loughrin, J.H.; Collins, R.W.; Byers, M.E. Metabolism of natural volatile compounds by strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, n. 9, p.2802, 1996.

Hang, Y. D.; Woodams, E. E.; Hang, L. E. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 305-307, 2003.

Hayasaka, Y., MaNamara, K., Baldock, G. A., Taylor, R. L., & Pollnitz, A. P. Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.375, p.948–955. 2003.

Heath, H.B.; Reineccius, G. Flavor chemistry and technology, biogenesis of flavor in fruits and vegetables. New York: Van Nostrand Reinhold Company, p. 43-54, 1986.

Henningsson, S.; Hyde, K.; Smith, A.; Campbell, M. The value of resource efficiency in food industry: a waste minimization project in East Anglia, UK. *Journal of Cleaner Production*, v. 12, n.5, p. 505-512, 2004.

Hernández-Orte, P.; Cacho, J.F.; Ferreira, V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2891-2899, 2002.

Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., Tamaki, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulose genes. *Journal of Biotechnology*, v. 130, p. 114–123, 2007.

Howard, K. L., Mike, J. H., & Riesen, R. (2005). Validation of a solid-phase microextraction method for headspace analysis of wine aroma components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 37–45.

Huang, C.-Jr; Lee, S.-L.; Chou, C.-C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Research International*, 34, n.4, p.277-282, 2001.

Ibáñez, E.; López-Sebastián, S.; Ramos, E.; Tabera, J.; Reglero, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, v. 63, p. 281-286, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados demográficos e produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2010. 387p.

IEA – SP. Instituto de Economia Agrícola. A cultura da goiaba em São Paulo. Disponível em <<http://www.iaa.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>> Acesso em 25/09/2013.

Imandi, S. B.; Bandaru, V.V.R.; Somalanka, S.R.; Bandaru, S.R.; Garapati, H.R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4445-4450, 2008.

Inczedy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M.; Compendium of Analytical Nomenclature: Definitive Rules 1997, “The Orange Book”, 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. 1. ed. Digital. São Paulo: IAL, 2008.

Ito, K.; Yoshida, K.; Ishikawa, T.; Kobayashi, S. Volatile compounds produced by fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70, p.169–172, 1990.

IUPAC Retention index, in column chromatography. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/R05360.html>>. Acesso em: 15 janeiro 2013.

Janssens, L. De Pooter, H.L.; Schamp, N.M.; Vandamme, E.J. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 195-215, 1992.

Janssens, L. De Pooter, H.L.; Vandamme, E.J.; Schamp, N.M. Biosynthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. In: Peter Schreier (Ed.) *Bioflavour 87. Analysis – Biochemistry – Biotechnology.*, p. 465-471. 1988.

Jennings, W. G.; Rapp, A. *Sample Preparation for Chromatographic Analysis*. German: Hüthig. 1983. 108p.

Jennings, W. G.; Shibamoto, T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Gas Chromatography*. Academic Press. 1980. 472p.

Jennings, W. G.; Wohleb, R. H.; Lewis, M. J. Gas chromatographic analysis on headspace volatiles of alcoholic beverages. *Journal of Food Science*, v. 37, n. 1, p. 69, 1972.

Jiang, J. Identification of flavor volatile compounds produced by *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology techniques*, v.7, p.863-866, 1993.

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

Jong, S.C.; Birmingham, J.M. *Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds*. Hong Kong: The Chinese University Press, 1993.

Jordan, M.J.; Margaría, C.A.; Shaw, P.E.; Goodner, K.L. Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 51, p. 1421-1426, 2003.

- Kaminski, E.; Libbey, L.M.; Stawicki, S.; Wasowicz, E. Identification of the predominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, v.24, n. 5, p. 721-726, 1972.
- Kaminski, E.; Stawicki, S.; Wasowicz, E. Volatile flavors compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium* and Fungi imperfect. *Applied and Environmental Microbiology*, v.27, n.6, p. 1001-1004, 1974.
- Kempler, G.M. Production of flavor compounds by microorganisms. *Advances in applied microbiology*, v. 29, p.29-51, 1983.
- Kobori, C.N.; Jorge, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.
- Kraidman, G.; Mukherjee, B. B.; Hill, J. D. Conversion of D-limonene into an optically active isomer of α -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriological Proceedings*, v. 69, p. 63, 1969.
- Krings, U.; Berger, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.49, p.1-8. 1998.
- Lane, M.M.; Morrissey, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, v. 24, p. 17–26, 2010.
- Lanza, E.; Ko, K.H.; Palmer, J.K. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.24, n.6, p.1247-1250, 1976.
- Larráyoz, P.; Addis, M.; Gauch, R.; Bosset, J.O. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, v.11, p.911-926. 2001.
- Larroche, C.; Besson, I.; Gros, J.B. High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soy-beans. *Process Biochemistry*, v.34, p.67–74, 1999.
- Latrasse, A.; Dameron, P. An ester producing microorganism: *Geotrichium candidum*. In: Peter Schreier (Ed.). *Bioflavour'87. Analysis – Biochemistry – Biotechnology*, p.465-471, 1988.
- Ledauphin, J.; Guichard, H.; Saint-Clair, J.-F.; Picoche, B.; Barillier, D.; Chemical and Sensorial Aroma Characterization of Freshly Distilled Calvados. 2. Identification of Volatile Compounds and Key Odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.433-442. 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.
- Lee, S.; Lin, D.; Chou, C. Growth of and production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odoratus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.80, n.2, p.195-199, 1995.

- Lee, S.N.; Kim, N.S.; Lee, D.S. Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.4, p.749-756, 2003.
- Leffingwell. The Flavor & Fragrance Market Disponível em < <http://www.leffingwell.com>>. Acesso em 15 jan. 2013.
- Li, Y.Y., Wang, G., Li, H.M., Zhong, J.J.; Tang, Y.J. Volatile organic compounds from a Tuber *melanosporum* fermentation system. *Food Chemistry*, v. 135, p.2628-2637, 2012.
- Lima, E.D.P.A.; Lima, C.A.A.L.; Aldrigue, M.L.; Gondim, P.J.S. Caracterização física e química dos frutos da umbu-cajazeira (*Spondias* spp.) em cinco estádios de maturação da polpa congelada e néctar. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, p. 338-343. 2002.
- Lin, D.; Lee, S.; Chou, C. Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of gamma-decalactone by *Sporobolomyces odorus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.82, n.1, p.42-45, 1996.
- Lira, R.C.; Rabello, C.B.V.; Silva, E.P.; Ferreira, P.V. ; Ludke, M.C. M.M.; Costa, E.V. Chemical composition and energy value of guava and tomato wastes for broilers chickens at different ages. *Rev. Bras. Zootec.*, v.40, p.1019-1024, 2011.
- Liu, Y.S.; Wu, J.Y.; Ho, K.P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p.331-335. 2006.
- Longo, M.A.; Sanromán, M.A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technological Biotechnological*, v.44, p. 335-353, 2006.
- Lopes, D.C.; Fraga, S.R.; Rezende, C.M. Principais substâncias responsáveis pelo aroma de mangas comerciais brasileiras identificadas por cromatografia gasosa de alta resolução/olfatometria/espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 22, p.31-36. 1999.
- Lord, H.; Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, v.885, p.153–193. 2000.
- 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.
- Lu, Z.-M.; Tao, W.-Y.; Xu, H.-Y.; Lim, J.; Zhang, X.-M.; Wang, L.-P.; Chen, J.-H.; Xu, Z.-H. Analysis of volatile compounds of *Antrodia camphorate* in submerged culture using headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, v.127, p.662–668. 2011.
- Macedo, G.A.; Matsuda, L.K.; Battestin, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciencia e Agrotecnologia*, v.29, p. 833-838. 2005.
- MacLeod, A.J.; Troconis, N.G. Volatiles flavor components of guava. *Phytochemistry*, v. 40, p.1339–1342. 1982.

Mantovani, J.R., Corrêa, M.C.M., Cruz, M.C.P., Ferreira, M.E. & Natale, W. Uso de fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, p.339-342. 2004.

Maróstica Júnior, M.R.; Pastore, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, 30, p. 382-387, 2007.

Marques, D.B. Produção e caracterização de aroma de fruta por *Pichia membranefaciens*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.

Marsili, R.; *Techniques for Analyzing Food Aroma*. New York, Marcel Dekker Inc., 1997.

Martí, M.P.; Mestres, M.; Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.7861–7865. 2003.

Mattiuz, B.H. Processamento mínimo de frutas tropicais: goiaba. In: Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças. Viçosa: MG. Palestras, resumos e oficinas, p.96-99. UFV, 2004.

McDaniel, M.R.; Mirand-Lopez, R.; Watson, B.T.; Micheals, N.J.; Libbey, L.M. Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. In: CHARAMLAMBOUS, G. (Ed.). *Flavors and off-flavors*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 23-36.

Mclafferty, F. W. *Interpretation of Mass Spectra*. Mill Valley, California: N. Turno, 1994. 293p.

Mdaini N., Gargouri M., Hammami M., Monser L., Hamdi M. Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.128, p. 227-235, 2006.

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*, 6, p.33-39, 2000.

Medeiros, A.B.P.; Christen, P.; Roussos, S.; Gern, J.C.; Socool, C.R. Coffe residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, p. 245-248. 2003.

Medeiros, A.B.P.; Pandey, A.; Christen, P.; Fontoura, P.S.G.; Freitas, R.J.S.; Soccol, C.R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.767–771, 2001.

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 Biotechnology*, v.44, p. 47–51, 2006.

Mestres, M.; Busto, O.; Guash, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, v.881, p. 569-581, 2000.

Minim, V.P.R. Análise sensorial – Estudo com consumidores. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2010.

Nickerson, G. B.; Likens, S. T. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatogr.*, 21: 1-5, 1966.

Nizamuddin, S.; Sridevi, A., Narasimha, G. Production of b-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v.7, p. 1096-1100, 2008.

Noble, A.C.; Flath, R.A.; Forrey, R.R. Wine headspace analysis. Reproducibility and application to varietal classification. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 28, 346-353, 1980.

Nogueira, P. C. L. Contribuição à química dos compostos voláteis e interações com os organismos receptores. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

Nykänen, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 37, p. 84-96, 1986.

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 Research*, v. 9, p.742-748, 2009.

Oliveira, J.G. Produção biotecnológica de metilcetonas por linhagens de *Aspergillus* sp. Dissertação. (Mestrado em Ciencia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.

Oliveira, L. F.; Nascimento, M. R. F.; Borges, S. V.; Ribeiro, P. C. N.; Ruback, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.

Omelianski, V.L. Aroma producing microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v. 8, p.393, 1923.

Onofre, S.B.; Groff, S.A.; Sartori, A., Bertolini, J.; Kagimura, F.Y.; Rotta, D.; Mazzali, L.; Steilmann, P. Production of α -amylase and amyloglucosidase by the fungus *Cylindrocladium* sp. in semi-solid state fermentation. *Journal of Microbiology Research*, v. 2, p. 123-126, 2012.

Orozco, A.L.; Pérez, M.I.; Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., Goonzález-Vila, F.J.; Polvillo, O., Arias, M.E. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with streptomycetes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.81, p.247-252, 2008.

Ortega, A.G.; Pino, J.A.; Chang, L.; Marbot, R.; Rosado, A.; González, G. Estudio de los componentes volatiles y perfil sensorial de cuatro cultivares de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Alimentaria*, p. 31-35, 1998.

Ortega, C.; López, R.; Cacho, C.; Ferreira, V. Fast analysis of important wine volatile compounds: development and validation of a new method based on gas chromatography-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, p. 205-214, 2001.

Otles, S. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. CRC Press – Taylor & Francis Group. USA. 2^o Edition. 2012.

Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D.A. New development in solid state fermentation: I – Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, p. 1153-1169, 2000.

Paraskevopoulou, A.; Mantzouridou, F. Exploitation of Orange Peel for the Production of Flavor-Active Compounds with the Use of a Commercial Wine Strain. *Flavour Science, Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, p.613-617, 2014.

Pastore, G.M.; Park, Y.K.; Mind, D.B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycological Research*, v.98, p.1300-1302, 1994a.

Pastore, G.M.; Sato, H.H.; Yang, T.S.; Park, Y.K.; Min, D.B. Production of fruit aroma by newly isolated yeast. *Biotechnology Letters*, v.16, n.4, p.389-392, 1994b.

Peinado, R.A.; Moreno, J.; Bueno, J.E.; Moreno, J.A.; Mauricio, J.C.; *Food Chemistry*, v. 84, p.585-590. 2004.

Pereira, A.S.; Aquino Neto, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. *Química Nova*, v. 23, p. 370-379. 2000.

Pereira, A.S.; Padilha, M.C.; Aquino Neto, F.R. Two decades of high temperature gas chromatography (1983–2003): what's next? *Microchemical Journal*, v. 77, p. 141-149. 2004.

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, 2007.

Pereira, J.N.; Morgan, M.E. Identity of esters produced in milk cultures of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Dairy Science*, v.41, p.1201-1205, 1958.

Piggott, J.R. Dynamism in flavor science and sensory methodology. *Food Research International*, 33, pp. 191-197. 2000.

Pinheiro, R., Belo, I., Mota, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, 438-442, 2003.

Pino, J.A.; Marbot, R.; Vasques, C. Characterization of volatiles in Costa Rican guava [*Psidium friedrichsithalianum* (Berg) Niedenzu] fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6023-6026, 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.

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.

Pommer, C.V.; Murakami, K.R.N.; Watlington, F. Goiaba no mundo. *O Agrônomo*, v.58, p.22-26, 2006.

Porat, R.; Tietel, Z.; Zippori, I.; Dag, A. Aroma volatile compositions of high-and low-aromatic guava varieties. *Journal of Agricultural and Food Science*, v.91, p.2794-2798, 2011.

Prasad N.B.L.; Azeemoddin, G. Characteristics and composition of guava (*Psidium guajava* L.) seed and oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.4, p.457-458, 1994.

Prasertsan, S., Prasertsan, P. Biomass residues from palm oil mills in Thailand: an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy*, v.11, p.387–395, 1996.

Quijano-Célis, C.E.; Suarez, M.; Beltran, C.D. Constituyentes volátiles das variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.): Palmira ICA-1 y Glum Sali. *Revista Colombiana de Química*, v. 28, 1999.

Ramos, A. S.; Fiaux, S. B.; Leite, S. G. F. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 712-717, 2008.

Raymond, Y.; Morin, A.; Cormier, F.; Champagne, C.P.; Dubeau, H. Physical factors influencing the production of strawberry aroma by *Pseudomonas fragi* grown in skim milk. *Biotechnology Letters*, v.12, n.12, p.931-936, 1990.

Reddy, M.C.; Bills, D.D.; Lindsay, R.D.; Libbey, L.M.; Miller, A.; Morgan, M.E. Ester production by *Pseudomonas fragi*. Identification and quantification of some esters produced in milk cultures. *Journal of Dairy Science*, v.51, n.5, p.656-659, 1968.

Reineccius, G. *Flavor Chemistry and Technology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

Rivera, F.M.; Barros, E.B.P.; Oliveira, A.; Rezende, C.M. Leite, S.G.F. Production of 6-Pentyl- α -Pyrone by *Trichoderma harzianum* using Brazilian Espresso Coffee Grounds. *Flavour Science, Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, p.619-622, 2014.

Rocha, C.P. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. Universidade Federal de Uberlândia (Mestrado em Engenharia Química), 2010. 161p.

Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Soares, I. B.; Maior, A.M.S.; Baudel, H.M.; Abreu, C.A.M.; Dilute Mixed-Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Biomass and Bioenergy* 35, p.663-670, 2011.

Rodríguez, R.; Mangas, J. Obtención de aguardiente de sidra mediante alambique com columna de rectificación. *Alimentaria*, v. 77, p. 89-93, 1996.

Rosa, C.A.R.; Campos, S.G.; Baroni, F.A.; Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. *Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica*, 2002.

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, 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.

Rungsardthong, V.; Noomhoom, A. Production of 2-acetyl-1-pyrroline by microbial cultures. *Flavour Fragrances Journal*, v.20, p.710–714, 2005.

Sales, P.J.P.; Furuya, W.M.; Santos, V.G. et al. Valor nutritivo dos farelos do subproduto industrial do tomate ("*Lycopersicon esculentum*") e da goiaba ("*Psidium guava*") para a telaria do nilo ("*Oreochromis niloticus*") In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. Anais... Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Embrapa Gado de Corte [2004] (CD-ROM).

Salinas, M.R.; Alonso, G.L.; Esteban-Infantes, F.J. Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1328-1331, 1994.

Sanchez, S.; Demain, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 895-906, 2002.

Sánchez-Palomo, E.; Alañón, M.E.; Díaz-Maroto, M.C.; González-Viñas, M.A.; Pérez-Coello, M.S. Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta*, v. 79, p. 871-876. 2009.

Santos, B.A.C. Compostos voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens varietal cabernet sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil. 2006, 155f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

Santos, E.L. Avaliação do farelo de coco e do farelo de resíduo da goiaba na alimentação da tilápia do Nilo. Recife. 2007. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

Santos, E.L.; Ludke, M.C.M.M.; Barbosa, J.M. et al. Digestibilidade aparente do farelo de coco e do resíduo de goiaba para tilápia do Nilo. *Caatinga*, v.22, n.2, p.175-180, 2009.

Santos, M. B. Conservação da polpa de umbu-cajá (*Spondias* spp.) por métodos combinados. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

Sarhy-Bagnon, V; Lozano, P; Saucedo-Castañeda, G; Roussos, S. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry*, v, 36, p.103–109, 2000.

Sariaslani, F.S.; Rosazza, J.P.N. Biocatalysis in natural products chemistry. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 6, p. 242-253. 1984.

Sarris, J.; Latrasse, A. Production of odoriferous γ lactones by *Fusarium poae*. *Agricultural Biological Chemistry*, v.49, n.11, p.3227-3220, 1985.

Saturnino, H. M. Recursos genéticos e melhoramento de Spondias no estado de Minas Gerais. In: Lederman, I. E.; Lira Junior, J. S.; Silva Junior, J. F. (Ed.). Spondias no Brasil: umbú, cajá e espécies afins. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária –IPA / UFRPE, 2008. p. 75-79.

Schade, F.; Thompson, J.; Legge, R.L. Use of a plant derived enzyme template for the production on the green note volatile hexanal. *Biotechnology and Bioengineering*, v.84, p.265-273. 2003.

Scharpf, L.G.; Seitz, E.W.; Morris, J.A.; Farbood, M.I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation process. In: Biogenesis of aromas. T.H. Parliament and Crouteau (Ed.). Washington: Symposium Series, 317, p. 323-346, 1986.

Schieber, A.; Stintzing, F. C.; Carle, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. *Trends Food Science Technology*, v. 12, p. 401-413, 2001.

Schrader, J.; Etschmann, M.M.W.; Sell, D.; Hilmer, J.M.; Rabenhorst, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – Current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters*, v.26, p.463-472, 2004.

Schultz, N., Chang, L. F., Hauck, A., Reuss, M., Sylđatk, C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, p. 515-520, 2005.

Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p. 426-435. 2002.

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.

Shibamoto, T.; Tang, C. S. ‘Minor’ tropical fruits – mango, papaya, passion fruit and guava. In: Morton, I. D; Macleod, A. J. (Eds.). Food flavours. Part C: the flavour of fruits. Chap. VI, p. 221-280. 1990.

Sigma, A. Flavors & Fragrances, Catalogue and Price list 2000 Milwaukee, WI, USA. 2000.

Sigma. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/faq.html>. Acessado em outubro de 2013.

Silva, C.A.B. Produção de polpa de fruta tratada termicamente e congelada. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1995.

Silva, C.A.B. Produção de polpa de fruta tratada termicamente e congelada. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1995.

- Silva, E.P.; Silva, D.A.T.; Rabello, C.B.V.; Lima, R.B.; Lima, M.B.; Ludke, J.V. Composição físico-química e valores energéticos dos resíduos de goiaba e tomate para frangos de corte de crescimento lento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n.6, p.1051-1058. 2009a.
- Silva, C.B.M.C.; Silva, C.B.C.; Nonato, J.V.; Corrêa, R.X.; Oliveira, A.C. Genetic dissimilarity of "yellow" and "sleep" passion fruit accessions based on the fruits physical-chemical characteristics. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, n.9, v.3, p.210-218, 2009b.
- Silva, D.S. Estabilidade do suco tropical de goiaba (*Psidium guajava* L.) não adoçado obtido pelos processos de enchimento à quente e asséptico. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 98f. 2007.
- Silva, J.D.A. Composição química e digestibilidade *in situ* da semente de goiaba (*Psidium guava* L.). Recife, UFRPE. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). 1999.
- Silva, L.M. Estudo da Potencialidade dos Resíduos de Umbu, Manga e Goiaba como Bioadsorventes. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). UESB, 2012. 67 p.
- Silva, M.D.R.G.; Neves, H.J.C. Differentiation of strawberry varieties through purge-and-trap HRGC-MS, HRGC-FTIR and principal component analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, v.20, p.275–283. 1997.
- Sinha, A.K.; Sharma, UK.; Sharma, N. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v. 59, p.299-326. 2008.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.. *Princípios de Análise Instrumental*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.
- Soares, F.D.; Pereira, T.; Marques, M.O.M.; Monteiro, A.R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chemistry*, v.100, p.15-21, 2007.
- 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.
- Souza, H.A.; Natale, W.; Rozane, D.E. Avaliação agronômica da aplicação do resíduo da indústria processadora de goiabas em pomar comercial de goiabeiras. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.35, p.969-979, 2011.
- Speziali, M.G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do "cheiro". *Química Nova*, v. 35, p. 861-964. 2012.
- Sponholz, W. R.; Dittrich, H. H.; Hass, F.; Wünsch, B. Die Bildung von flüchtigen Fettsäuren durch *Saccaromyces*-Hefen während der Vergärung von Traubenmost. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, v.173, p. 297-300, 1981.
- Stark, D., Kornmann, H.; Münch, T.; Sonnleitner, B.; Marison, I.W.; von Stockar, U. Novel type of In Situ extraction: use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-

phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.83, p.376-385, 2003b.

Stark, D.; Zala, D.; Munch, T.; Sonnleitner, B.; Marison, I.W.; von Stockar, U. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p.212-223, 2003a.

Tahara, S. Fujiwara, K.; Mizutani, J. Neutral constituents of volatiles in cultured broth of *Sporobolomyces odorus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.37, n.12, p.2855-2861, 1973.

Teixeira, M.F.S.; Matsuura, A.B.J.; Soares, S.S.S. *Micologia Médica: Manual de Laboratório*. Manaus: UFAM, 111p. 1999.

Teixeira, R.M.; Cavalheiro, D.; Ninow, J.L.; Furigo Júnior, A. Optimization of acetoin production by *hanseniaspora guilliermondii* using experimental design. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, p.181-186, 2002.

Torrea, D.; Fraile, D.; Garde, T.; Ancín, 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.

Torres, L. B. V.; Queiroz, A. J. M.; Figueirêdo, R. M. F. Viscosidade aparente da polpa de umbu- cajá concentrada a 10oC. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, v.5, n.2, p.161-168, 2003.

Tortora, G.J.; Funke, B.R. *Case, C.L. Microbiologia*. 8 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 894 p.

Tyrell, M. *Advances in natural flavor and materials*. *Perfumer & Flavorist*, v.20, p. 13-22, 1995.

Uchoa, A. M. A.; Costa, J.M.C.; Maia, G.A.; Silva, M.C.; Carvalho, A.F.F.U.; Meira, T.R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 15, p.58-65, 2008.

Uenojo, M.; Pastore, G.M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p. 509-515. 2006.

Uenojo, M.; Pastore, G.M. β -Carotene biotransformation to obtain aroma compounds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n.3, p. 822-827. 2010.

Ulrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, v.184, p.277-282, 1987.

Valduga, E.; Valerio, H.T.; Nascimento Filho, I.; Fúrigo Júnior, A.; Di Luccio, M. Head Space Solid Phase Micro-Extraction (HS - SPME) of volatile organic compounds produced by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 987-992. 2010.

Valente, A.L.P.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, 23, 2000.

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

Venema, A. The usefulness of the headspace analysis gas chromatography technique for the investigation of solid samples. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatographic Communications*, v. 13, p. 537-539, 1990.

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.

Virmond, E.; Rocha, J.D.; Moreira, R.F.P.M.; José, H.J. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p. 197 - 229, 2013.

Welsh, F.W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: Galbeman A. (Ed.) *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*. Wiley, New York, p. 1-16. 1994.

Weurman, C. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.17, p.370–384. 1969.

Wilkes, J.G.; Conte, E.D.; Kim, Y.; Holcomb, M.; Sutherland, J.B., Miller, D.W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 880, p. 3-33. 2000.

Wittmann, C.; Hans, M.; Bluemke, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*, *Yeast*, v.19, p.1351-1363, 2002.

Xia, Y.; Zhang, B.; Li, W.; Xu, G. Changes in volatile compound composition of *Antrodia camphorate* during solid state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, p. 2463-2470, 2011.

Xiao, Z.J.; Liu P.H.; Qin J.Y.; Xu, P. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.74, p.61-68, 2007.

Xie, J.; Sun, B.; Yu, M. Constituents of top fragrance from fresh flowers of *Robinia Pseudoacacia* L. occurring in China. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 21, p. 798-800, 2006.

Yamauchi, H.; Obata, T.; Amachi, T.; Hara, S. Aroma production by *Neurospora* sp affected by light irradiation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 60, n. 11, p. 1902-1904, 1996.

Yamuchi, H.; Obata, T.; Amachi, T.; Hara, S. Production of characteristics odors by *Neurospora* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.55, p.3115-3116, 1991.

Yang, X.; Peppard, T. Solid phase-microextraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 1925-1930, 1994.

Yoshikawa, K. Sake: production and flavor. *Food Reviews International*, v.5, p. 83-107. 1999.

Yoshizawa, K.; Yamauchi, H.; Hasuo, T.; Akita, O.; Hara, S. Production of a fruit odor by *Neurospora* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.52, n.8, p.2129-2139, 1988.

Zambão, C.L.; Bellintani Neto, A.M. *Cultura de goiaba*. Campinas: CATI, 1998, 23p.

Zea, L.; Moyano, M.; Moreno, J.; Cortes, B.; Medina, M. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, v.75, p.79-84. 2001.

Zelda, P. Varian Chromatography Systems, SPME, Varian Application Note, n.6, 1996.

Zhang, M., Xu, Q., Duan, C., Qu, W., & Wu, Y. Comparative study of aromatic compounds in young red wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, and Cabernet Gernischet varieties in China. *Journal of Food Science*, v.72, p.248–252. 2007.

Zhang, Z. M.; Zeng, D. D.; Li, G. K. The study of the aroma profile characteristics of durian pulp during storage by the combination sampling method coupled with GC-MS. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 22, p. 71-77, 2006.

CAPÍTULO 2

SCREENING DE MICRORGANISMOS E SELEÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA BIOPRODUÇÃO DE AROMA

Resumo

O aroma é o principal fator na determinação da qualidade do gosto e do sabor de um alimento. Pesquisas relatam a produção de aromas e fragrâncias através do metabolismo secundário de fungos, leveduras e bactérias, dependendo da cepa e das condições de cultivo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial de alguns resíduos (goiaba, maracujá e umbu) provenientes de indústria processadores de sucos do Estado de Sergipe para servirem como substratos em fermentações submersas utilizando microrganismos endófitos da goiaba, maracujá e umbu de cultura puras (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) em produzir compostos voláteis de aroma. Inicialmente a polpa e os resíduos de goiaba, maracujá e umbu foram caracterizados quimicamente (umidade, cinzas, fibras, proteínas, lipídeos, açúcares, acidez titulável, Aw, pH e sólidos solúveis). Foram realizadas fermentações com os diferentes microrganismos em meio sintético contendo 5% de frutose e 0,5% de extrato de levedura. Os produtos fermentados foram analisados sensorialmente quanto a produção de aromas para a seleção do microrganismo com maior potencial. Esse microrganismo foi utilizado para a fermentação em meio contendo os resíduos com a seguinte composição: 5g de resíduo, 0,5g de glicose, 0,25g de extrato de levedura, 45 mL de água e 5 mL do inóculo a 150 rpm. O resíduo com maior potencial para a produção de aromas frutais foi selecionado através de testes sensoriais nos produtos fermentados obtidos. Experimentos fermentativos foram realizados com o microrganismo e resíduo promissor para produção de aromas e os fermentados foram analisados quanto ao pH, sólidos solúveis e açúcar redutor para estabelecer a cinética do processo fermentativo a cada 24h durante 4 dias. Os compostos voláteis produzidos foram capturados por duas técnicas de headspace (MEFS e *Purge & Trap*) e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram isolados 62 microrganismos, dentre estes 15 obtiveram notas de aromas frutais (doce, frutal, floral, laranja, cítrico, maçã verde, abacaxi) e dentre esses, 6 foram selecionados para seus produtos fermentados foram analisados por cromatografia gasosa. A partir dos resultados obtidos da análise sensorial, o resíduo de goiaba e

a levedura *Kluyveromyces lactis* foram selecionados baseados na capacidade de produção de aromas. As principais descrições de aroma para o fermentado de resíduo de goiaba foram frutal, mel, fruta verde, ameixa, goiabada, banana, fermento e álcool. Foram detectados 43 compostos voláteis no produto fermentado usando o resíduo de goiaba. Dentre os compostos identificados podemos destacar: β -cariofileno, 2-feniletil acetato, γ -humuleno, bisaboleno, humuleno, 3-metil butanol, bergamoteno, γ -cadineno, óxido de cariofileno e 2-feniletanol. A produção dos compostos voláteis foi bastante rápida, e na maioria dos casos, essa produção aconteceu a partir do primeiro dia de fermentação e teve o seu máximo entre 24-48h de fermentação.

Palavras-chave: aroma, isolamento de microrganismos, goiaba, maracujá, resíduos agroindustriais, umbu

CHAPTER 2

SCREENING OF MICROORGANISMS AND SELECTION OF AGROINDUSTRIAL WASTE FOR AROMA BIOPRODUCTION

Abstract

The aroma is the main factor in determining the quality of the taste and flavor of a food. Several publications report the production of flavors and fragrances through the secondary metabolism of fungi, yeasts and bacteria which depends on the strain and culture conditions. The objective of this research was to evaluate the potential of utilizing some agroindustrial wastes resulting from the processing of guava, passion fruit and umbu pulps in the state of Sergipe, Brazil which could serve as substrates in submerged fermentation using endophytic microorganisms isolated from guava, passion fruit and umbu fruits as well as the use of pure cultures (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis*) to produce volatile aroma compounds. Initially the pulp and guava, passion fruit or umbu fruit processing wastes were chemically characterized (moisture, ash, fiber, proteins, lipids, sugars, titratable acidity, Aw, pH and soluble solids). Fermentations with different microorganisms on synthetic medium containing 5 % fructose and 0.5% yeast extract were performed. Fermented products were analyzed for the production of sensory aromas for the selection of the microorganism which presented the highest potential. This medium used for fermentation contained waste residues and had the following composition: 5 g of residue, 0.5 g of glucose, 0.25 g of yeast extract, 45 ml of water and 5 ml of inoculum at 150 rpm. The residue with the greatest potential for producing fruity aroma was selected through sensory testing in fermented products. Further fermentation experiments were performed using the microorganism and the promising residue for production of flavorings and fermented products were analyzed for pH, soluble solids and reducing sugar to monitor the fermentation process every 24 hours for 4 days. The volatile compounds produced were captured by two headspace techniques (SPME and Purge & Trap) and analyzed by gas chromatography- mass spectrometry. Sixty-two microorganisms, among these 15 had produced the notes of fruity flavors (sweet, fruity, floral, orange, citrus, green apple, pineapple), and among these, 6 were selected for finally obtaining the fermented products which were analyzed in gas chromatography system coupled with mass spectrometry. From the results of the

sensory analysis, the yeast *Kluyveromyces lactis* and guava processing residue were selected based on the capacity of aromas. The main flavor descriptors in the fermented products were fruity guava, honey, fruit green, plum, guava, banana, yeast and alcohol. Forty-three volatile compounds were detected in the fermented product obtained by using the guava processing residue. Among the identified compounds, the presence of β -caryophyllene, 2-phenylethyl acetate, γ -humulene, bisabolene, humulene, 3-methyl butanol, bergamoteno, γ -cadinene, caryophyllene oxide and 2-phenylethanol. The production of volatile compounds was quite rapid, and in most cases, this production occurred from the first day of fermentation and had its maximum between 24-48h of fermentation.

Key-words: agroindustrial wastes, isolation of microorganisms, flavor, guava, passion fruit, wastes, umbu

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção superior a 41 milhões de toneladas (IBRAF, 2011), sendo prioritariamente destinada a suprir o mercado interno. Desse total produzido 47% são consumidas *in natura* e 53% são processados. Dos 47% das frutas frescas apenas 2% são exportados e do total processado 29% é exportado (Brazilian Fruit, 2013). Estima-se que no processamento de frutas, na produção de polpas e sucos, sejam gerados 40% de resíduos industriais. Afirma-se ainda que as perdas pós-colheita de frutas frescas atinjam 50% (Azevedo et al., 2011; Siddiq, 2012).

Esses resíduos agroindustriais (cascas, sementes e bagaços) são de baixo custo e subutilizados, contendo substâncias bioativas de potencial, por vezes superior que na polpa, podendo ser utilizados como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de compostos de elevado valor comercial como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, celulose e compostos de aroma, agregando importância ao que antes era tratado como resíduo (Medeiros et al., 2000; Soccol & Vandenbergue, 2003; Laufenberg, *et al.*, 2003; Dhillon *et al.*, 2004; Ajila et al., 2007; Rocha et al., 2011). Porém, para agregar valor, são necessárias investigações científicas e tecnológicas dos mesmos.

A produção biotecnológica de compostos de aroma vem sendo impulsionada pela crescente tendência do mercado consumidor por produtos rotulados como “naturais” e “saudáveis”. Esses compostos classificados como naturais podem ser de origem enzimática ou fermentativa, a partir de material orgânico enquanto a produção convencional envolve processos químicos (Krings & Berger, 1998; Maróstica Júnior & Pastore, 2007).

Diante deste contexto, a biotecnologia se insere na busca de novos produtos e processos. Além da grande quantidade de rejeitos industriais que podem ser usados como substratos de fermentações, existem inúmeros microrganismos que podem ser isolados dos mais diferentes lugares principalmente num país como o Brasil, de grande extensão territorial, com diversos climas e florestas que ainda não foram estudadas com profundidade. Nesse sentido, o objetivo desse capítulo foi avaliar o potencial do uso de resíduos agroindustriais provenientes do processamento de polpas de frutas de goiaba, maracujá e umbu para a obtenção de compostos de aroma, através de fermentação submersa utilizando microrganismos endofíticos isolados dessas frutas como também microrganismos de culturas puras (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) com alto potencial aromático.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Local de execução

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas (LAF) pertencente ao 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) ambos da Universidade Federal de Sergipe, Campus de São Cristovão/SE.

2.2.2 Frutas

Os frutos de goiaba, maracujá e umbu foram adquiridos na CEASA (Central de Abastecimento de Sergipe), localizada em Aracaju. O estágio de maturação dos frutos foi selecionado “maduro” de acordo com cada fruta. Para a goiaba: coloração da casca amarela, firmeza reduzida e polpa vermelha (Figuras 6 e 7); para o maracujá: casca enrugada, polpa solta e odor característico (Figura 8); e para o umbu: coloração esverdeada clara, pouca firmeza (Figura 9). Os frutos foram inicialmente selecionados manualmente quanto a danos físicos, ataques de insetos ou fungos.

2.2.3 Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais (goiaba e umbu) foram cedidos pela empresa Pomar do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., localizada em Aracaju-SE. O resíduo de maracujá foi cedido pela empresa Maratá Sucos do Nordeste localizada em Estância-SE. Foram coletados cerca de 5kg de resíduo de cada fruta, onde foram imediatamente levados para o laboratório. Os mesmos foram pesados e armazenados a -18°C , em freezer, em embalagens plásticas para posterior análise. O resíduo de goiaba era composto de casca, semente com polpa aderida/prensada. Os resíduos de maracujá e umbu eram compostos basicamente de semente com polpa aderida/prensada. Os resíduos foram triturados em moinho de facas (Marca: Tecnal; Modelo: Willye TE-650) com peneira de 20 mesh. A operação uniforme de trituração foi 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 (Coda et al., 2013). Entretanto, o acompanhamento da produção de compostos voláteis, consumo de substrato (açúcares), sólidos solúveis e pH foi realizado apenas no resíduo que produziu aromas promissores.



Figura 6: Frutos de goiaba



Figura 7: Resíduo de goiaba antes e após moagem



Figura 8: Frutos e resíduo de maracujá



Figura 9: Frutos e resíduo (caroço) de umbu

2.2.4 Microrganismos

Foram utilizadas três cepas, sendo a primeiro fungo filamentoso e as demais, leveduras, conforme a Tabela 8:

Tabela 8: Listagem dos microrganismos utilizados no experimento

Microrganismo	Especificação	Ano fornecimento	Fornecedor
<i>Aspergillus niger</i>	IOC 3677	2010	Fiocruz
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IOC 4405	2010	UFPE
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBMAI 548	2008	CPQBA/CAMPINAS

2.2.5 Manutenção das cepas

O método utilizado para a conservação das cepas consistiu na repicagem em ágar dextrose batata (PDA), para o fungo filamentoso e ágar sabouraud (AS) para as leveduras. Os meios foram diluídos em água destilada, com ajuste de pH (5,8). Em seguida o meio foi autoclavado a 121°C durante 15 min. Após esterilização, os meios inoculados foram incubados a 30°C por cinco dias e posteriormente conservados a 4°C por no máximo três meses.

2.2.6 Equipamentos

Os principais equipamentos que foram utilizados nesta pesquisa foram os seguintes:

Autoclave (Marca: Primate; Modelo: autoclave vertical CS);
 Balança analítica (Marca: Shimadzu; Modelo: AY220);
 Capela de fluxo laminar (Marca: Pachane; Modelo: PCR T2);
 Centrífuga refrigerada (Marca: Eppendorf; Modelo: centrifuge 5810 R);
 Cromatógrafos a gás acoplados a espectrômetros de massa (Marca: Varian, GC 3800; MS400; Marca: Agilent, Modelo 7000);
 Destilador de proteína (Tecnal; Modelo: TE-0363);
 Digestor de proteína (Marca: Tecnal; Modelo: 06012);
 Estufa de secagem (Marca: Marconi; Modelo: MA-035/2);
 Estufa microbiológica (Marca: LS Logen scientific; Modelo: LS 800);
 Fermentador (Marca: INFORS- HT; Modelo: Minifors);
 Incubadora shaker (Marca Splabor; Modelo: SP-222);
 Mufla (Marca: EDG 1800; Modelo: EDGCOM IP);
 pHmetro (Marca: HANNA ; Modelo: pH 21);
Purge and Trap Concentrator (Marca Tekmar; Modelo ATOMX);
 Purificador de água (Marca: Purelab; Modelo: Ultra);
 Ultra freezer (Marca: Sanyo; Modelo: VIP Series -86°C).

2.2.7 Reagentes, padrões químicos e meios de culturas:

Todos os reagentes químicos (hexano, éter, acetona), meios de cultura e padrões orgânicos (n-alcanos, β -cariofileno, acetato de 2-feniletil, 2-feniletanol) foram da marca Sigma ou Merck.

2.2.8 Determinação físico-química das polpas e dos resíduos

As análises físico-químicas (umidade, cinzas, fibras, proteínas, lipídeos, açúcares, pH, sólidos solúveis, atividade de água e acidez titulável) foram realizadas nos resíduos *in natura* de goiaba, maracujá e umbu. Todas as análises foram realizadas em triplicata em três lotes.

2.2.8.1 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 alumínio 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 a 105°C foi expressa em g/100g.

2.2.8.2 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 (%).

2.2.8.3 Fibras

O teor de fibra bruta foi determinado segundo o método descrito por Ranganna (1986), baseado na digestão ácida seguida por uma digestão alcalina do material seco desengordurado, e o resultado expresso em porcentagem (%).

2.2.8.4 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 para a digestão até que o carbono e o hidrogênio fossem 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 (%).

2.2.8.5 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), segundo o método 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). O resultado final foi expresso em porcentagem (%).

2.2.8.6 Açúcares

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, sendo que a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (marca JenWay, modelo UV-VIS 6750). Este método baseia-se no fato de, na presença de açúcares redutores, o ácido 3,5-dinitrosalicílico ser reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, com formação de um complexo acastanhado que pode ser doseado colorimetricamente a 540 nm. Para o cálculo da concentração dos açúcares redutores foi utilizada uma curva padrão construída previamente a partir de uma solução de glicose.

2.2.8.7 pH

O pH foi medido em potenciômetro da marca Thermo Scientific, modelo Orion 3 Star, calibrado com as soluções tampão (pH 4,0 e 7,0) a 20°C, segundo o método 017-IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). A análise consistiu na homogeneizar usando 5g do resíduo com o auxílio de 50 mL de água até a completa suspensão homogênea, e realizar a leitura do pH, após a estabilização do valor.

2.2.8.8 Sólidos solúveis

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

2.2.8.9 Atividade de água

A atividade de água foi determinada por leitura direta no termo-higrômetro AQUA-LAB digital (Marca: Decagon Devices Inc.; Modelo CX-2), com temperatura controlada de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

2.2.8.10 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 Adolfo Lutz (2008).

2.2.9 Testes preliminares (seleção da fibra e otimização das condições de análises cromatográficas dos compostos voláteis)

Foram realizados testes preliminares a fim de determinar as melhores condições de análise dos compostos voláteis. Inicialmente, foi realizada a seleção do polímero das fibras utilizadas na técnica de captura por micro extração em fase sólida (MEFS). Foram testados 3 fibras contendo os revestimentos PDMS (polidimetilsiloxano), PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) e DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano).

Outro ponto avaliado foi a programação de temperatura do forno, conforme descrito abaixo:

Programação 1: (tempo total de 114 min)

30°C (3 min.) $\xrightarrow{2^\circ\text{C}/\text{min}}$ 120°C $\xrightarrow{2^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250°C

Programação 2: (tempo total de 59,5 min)

35°C (2 min.) $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 100°C (1min) $\xrightarrow{3^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250°C

2.2.10 Isolamento e seleção de microrganismos endófitos

2.2.10.1 Esterilização superficial das amostras:

Após seleção dos frutos injuriados, os mesmos foram submetidos ao tratamento prévio de esterilização, segundo método descrito por Petrini & Muller (1986) com modificações.

- a) Lavagem das amostras coletadas em água corrente e sabão neutro a fim de retirar fungos epífitos;
- b) Imersão em álcool 70% v/v por 1 min, provocando a quebra da tensão superficial existente;
- c) Imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 3 % por 3 min, promovendo a assepsia do material;
- d) Finalmente, foram lavadas em álcool a 70% v/v com a finalidade de retirar-se o excesso de hipoclorito de sódio.

Como controle negativo foi realizado plaqueamento da última água da assepsia das amostras.

2.2.10.2 Isolamento dos microrganismos

Após a esterilização as amostras foram submetidas a três métodos de isolamento. Foram retiradas amostras da casca, semente e polpa.

Método de isolamento 1 (Figura 10):

As frutas cortadas com cerca de 10x10mm, utilizando bisturi estéril. Um pedaço de cada foi colocado em água estéril ou em meio YM (1% glicose, 0,5% peptona, 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, pH não ajustado), em tubos de ensaio largos, e a suspensão foi agitada em vortex durante 1min. Cada suspensão foi colocada em BOD (23°C), por um período de 7 dias, após as quais se procedeu a observação de turvamento no líquido sobrenadante (Fernandes, 2008). Em caso de observação positiva para leveduras, a partir da suspensão de cada fruta em água foram realizadas diluições (10^{-2} a 10^{-6}). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas por espalhamento, em triplicata, em placa de Petri contendo meio YM Agar. As placas foram incubadas em BOD (23°C) e após três, cinco e sete dias registravam-se o número de colônias de leveduras. Em seguida foi realizada a técnica de esgotamento até confirmação que as colônias estavam puras. As culturas puras correspondentes a cada amostra de fruta foram mantidas em meio de cultura GYMP, a 4 °C.

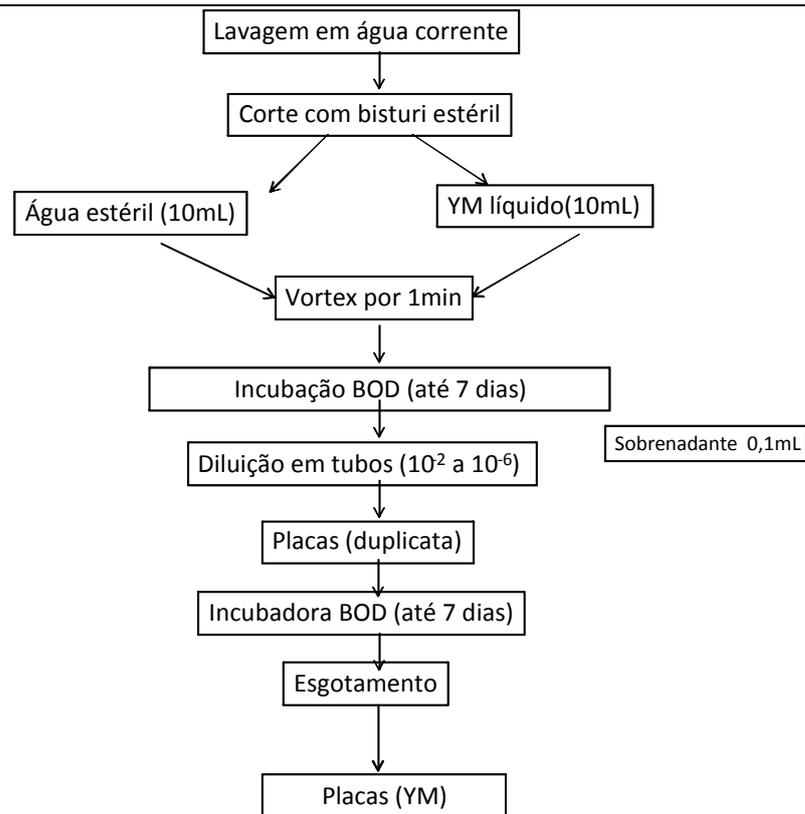


Figura 10: Esquema de isolamento de microrganismos
 Fonte: Adaptado de Fernandes (2008).

Método de isolamento 2 (Figura 11):

As frutas foram cortadas em pedaços de 5x5mm foram colocados em erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de YM (1% glicose, 0,5% peptona, 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, pH não ajustado) e etanol 0,1%. Os frascos foram mantidos em shaker por um período de 7 dias a 30°C/150rpm (Bicas & Pastore, 2007). Em caso de observação positiva para leveduras, a partir da suspensão de cada fruta em água foram realizadas diluições (10^{-2} a 10^{-5}), sendo alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas por espalhamento, em triplicata, em placa de Petri contendo meio YM Agar. As placas foram incubadas em BOD (23°C) e após três, cinco e sete dias registravam-se o número de colônias de leveduras. Em seguida, foi realizada a técnica de esgotamento até confirmação que as colônias estavam puras.

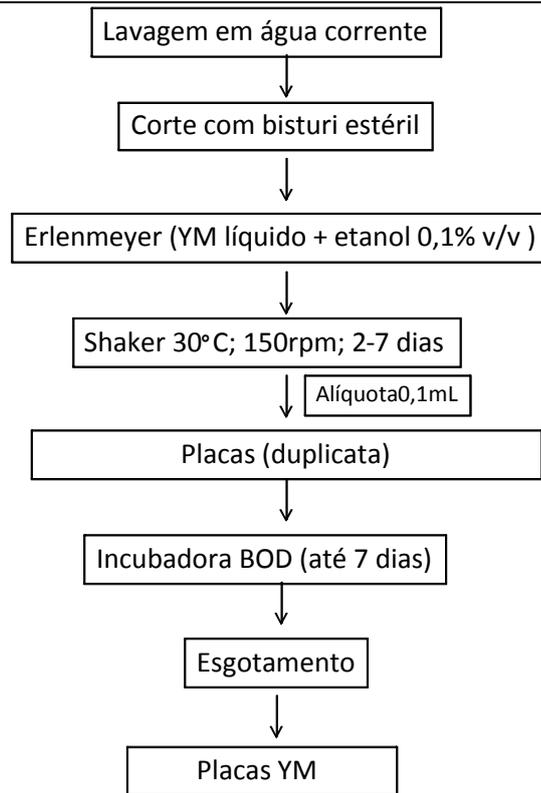


Figura 11: Esquema de isolamento de microrganismos
Fonte: Bicas & Pastore (2007).

Método de isolamento 3 (Figura 12):

Foi realizada a técnica de estriamento em placa contendo meio YM Agar. O plaqueamento foi realizado com o auxílio de uma alça de platina e em forma de estrias em várias partes do fruto, próximo a casca, sementes e polpa. Após a inoculação, as placas foram incubadas vertidas em BOD (23°C) por até 15 dias e após crescimento de leveduras foi realizada a técnica de esgotamento até confirmação que as colônias estavam puras.

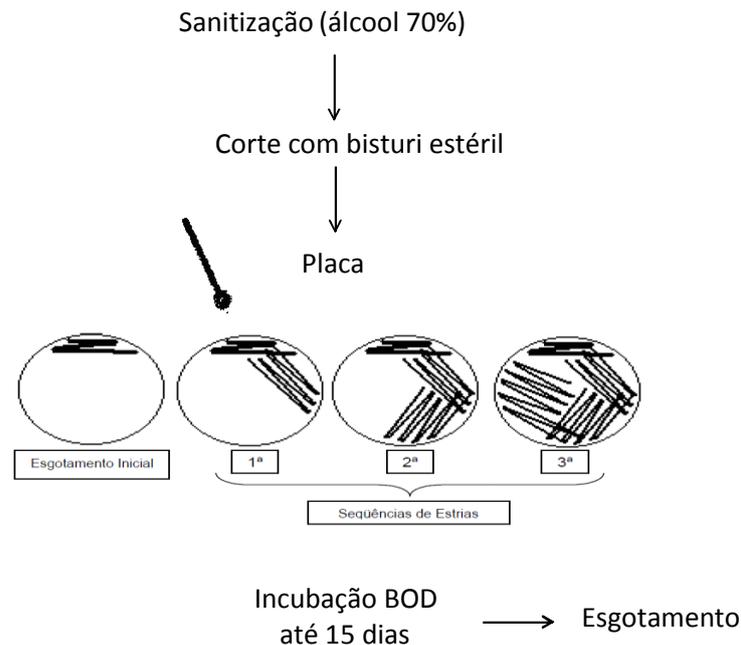


Figura 12: Esquema de isolamento de microrganismos

Fonte: Fernandes (2008).

2.2.10.3 Seleção dos microrganismos endófitos

Para a seleção dos microrganismos endófitos foram realizados dois testes sensoriais. O primeiro teste foi baseado em metodologia descrita por Chiappini et al. (2005), onde os microrganismos isolados foram cultivados em placa contendo ágar YEPD (extrato de levedura, peptona e glicose) a 25°C por 72h.

Um segundo teste, foi realizado em frascos erlenmeyers, adaptado de Uenojo & Pastore (2006). Inicialmente foi preparado um pré-inóculo para cada microrganismo isolado, onde três alçadas foram adicionadas em 100 mL de meio YM e incubados em shaker a 30°C por 48h a 150 rpm. Após esse período, foi preparado 50mL de um meio de fermentação contendo 5% de frutose e 0,5% de extrato de levedura. As linhagens foram inoculadas com 5mL e os frascos incubados em shaker rotatório a 30°C e 150 rpm por 72 horas para avaliar a capacidade do microrganismo em produzir aroma pelo mesmo painel sensorial.

Em ambos os testes, os aromas produzidos foram avaliados por uma equipe sensorial composta de 12 provadores (7 mulheres e 5 homens) familiarizados com aroma de frutas tropicais e com experiência prévia em análise descritiva quantitativa de aromas e sabores de frutas tropicais e produtos derivados. Inicialmente os julgadores descreveram as notas aromáticas percebidas nos meios fermentativos comparativamente a um controle não inoculado. Com as descrições utilizadas foi elaborada uma ficha de avaliação das amostras, associando a

cada termo uma escala não estruturada a qual os julgadores avaliaram as amostras utilizando a ficha desenvolvida (Apêndice 1). Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de média de Tukey.

2.2.10.4 Análise dos compostos voláteis

Após os microrganismos isolados serem selecionados pelo painel sensorial, os que apresentaram resultados promissores foram mais uma vez avaliados, sendo que desta vez foram utilizados em fermentação em meio contendo resíduo da fruta correspondente do seu isolamento e foram submetidos à análise cromatográfica.

Foram utilizadas duas técnicas de isolamento de compostos voláteis por headspace para monitorar os compostos voláteis produzidos durante a fermentação dos microrganismos isolados selecionados: técnica cromatográfica de MEFS, e a técnica de Purga e Armadilha (Marca Tekmar; Modelo ATOMX).

2.2.10.4.1 Análise dos compostos através da técnica MEFS

Foi utilizada a técnica de MEFS (Micro extração em Fase Sólida) para analisar os compostos voláteis produzidos durante a fermentação, como mostrado na Figura 13. Inicialmente, os produtos fermentados foram colocados no próprio frasco da fermentação sob agitação magnética em banho-maria (40°C) por 10 min (tempo de equilíbrio). Em seguida, a fibra de sílica fundida revestida com PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) foi exposta ao *headspace* da solução para adsorção dos analitos por 30min. Após a adsorção dos voláteis, a fibra foi diretamente inserida no injetor cromatógrafo para a análise dos voláteis por 7 min (Ramos et al., 2008; Díaz et al., 2009; Cheong et al., 2010). O experimento foi realizado em triplicata.



Figura 13: Etapa da extração de compostos voláteis com a técnica MEFS.

Os voláteis foram analisados por cromatografia a gás de alta resolução acoplada a espectrometria de massas. Foi utilizado um cromatográfico gasoso (marca Varian; modelo Saturn 3900) acoplado a um espectrômetro de massas (marca Varian; modelo 4000) com analisador de armadilha de íons. 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 0,25 μ m de espessura do filme. A temperatura da linha de transferência foi de 170°C com fonte de ionização por impacto de elétrons de 70 eV. A faixa de “*scanning*” de massa foi de 35 a 400 m/z.

2.2.10.4.2 Análise dos compostos através da técnica *Purge and Trap*

Os compostos voláteis produzidos foram analisados pelo sistema de purga e armadilha (Marca Tekmar; Modelo ATOMX), sendo os voláteis capturados pela armadilha Vocarb3000 e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS QQQ Agilent 7000) do tipo triplo quadrupolo. Foram utilizados 5 mL de fermentado diluídos em 15 mL de água. As condições de isolamento e concentração utilizadas no ATOMX para a análise cromatográfica foram baseadas em Narain et al. (2007), descritas abaixo:

- Temperatura da amostra 25°C;
- Tempo de purga: 15min;
- Fluxo de hélio: 40 ml/min;
- Temperatura de desorção: 180°C;

Tempo de desorção: 10 min.

A temperatura da linha de transferência: 180°C.

Os compostos foram separados em coluna capilar polar Carbowax (Marca Supelco; Modelo 20M; dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

2.2.10.4.3 Identificação e quantificação de compostos voláteis

A identificação dos compostos voláteis foi realizada pela comparação dos espectros de massas dos compostos das amostras com o padrão e com o banco de dados “NIST 2011” (*National Institute of Standards & Technology*) contendo aproximadamente um total de 243.000 espectros de referência e pela comparação do índice de retenção linear (IRL) dos compostos com os de artigos da literatura e *databases* LRI & Odour (2013), calculados com base nos tempos de retenção de uma série de n-alcenos (C8 – C40) sob condições analíticas idênticas.

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

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

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.

A curva de calibração externa foi obtida através da área do cromatograma e da concentração dos padrões β-cariofileno e 2-FEA (Sigma Aldrich). As soluções padrão foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25 e 2,50 µg/mL.

2.2.10.5 Análise dos compostos não voláteis

Os produtos fermentados foram inicialmente centrifugados à 10.000 rpm, à temperatura de 5°C durante 10min. Os sobrenadantes obtidos foram analisados quanto ao pH e teores de sólidos solúveis pelo método 017-IV e 010-IV do Instituto Adolf Lutz (2008), respectivamente.

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (Miller, 1959). Para esta análise, 5mL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaios e adicionou-se 5 mL de H₂SO₄ 1,5 N. A solução foi mantida em banho fervente por 20 min, 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 transferida para 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 medida 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 foi feita usando glicose como padrão.

2.2.11 Seleção do resíduo e microrganismo com potencial produtor de aromas

Foram utilizadas três cepas (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) disponíveis que eram potenciais produtores de aromas. A escolha foi baseada nos resultados da análise sensorial dos produtos fermentados obtidos a partir dos experimentos com cada microrganismo. Em seguida, verificou-se a potencialidade dos resíduos do processamento de polpa de goiaba, maracujá e umbu para produção de aroma através da fermentação dos mesmos utilizando a cepa selecionada anteriormente com posterior análise sensorial e cromatográfica dos aromas obtidos.

A produção de compostos voláteis, não-voláteis e análise sensorial foi monitorada a cada 24h durante 4 dias de fermentação apenas para a finalidade de seleção do resíduo e microrganismo promissor para produção de aromas.

2.2.11.1 Obtenção do pré-inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, o fungo filamentososo (*Aspergillus niger*) foi cultivado em Erlenmeyers de 250mL com 50 mL de meio PDA. O meio foi inoculado em superfície a partir da cultura retirada de um tubo inclinado até esporulação em estufa com temperatura controlada a 30°C por 48h.

No caso das leveduras (*K. marxianus* e *K. lactis*) os erlenmeyers de 250 mL com 50 mL do caldo sabouraud foram previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, três alçadas de células de cultura estoque foram transferidas para o caldo e incubadas em agitador orbital tipo “shaker” à 150 rpm em temperatura controlada a 30 °C pelo período de 48 horas.

2.2.11.2 *Screening* dos microrganismos potenciais produtores de aromas:

Para a seleção dos microrganismos foi preparado 50mL de um meio de fermentação para cada microrganismo contendo 5% de frutose e 0,5% de extrato de levedura (Uenojo & Pastore, 2006) e 10% do pré-inóculo. A concentração inicial de leveduras foi ajustada para 1×10^8 células por mL de meio utilizando a câmara de Neubauer, de acordo com a metodologia preconizada por Barga (2007). Foram preparados também controles abióticos, onde o meio não foi inoculado com a cepa do microrganismo, e nestes também foram realizadas as análises cromatográficas.

Os diferentes meios foram fermentados em frascos âmbar de 150 mL em agitador orbital tipo “shaker” a 75 rpm, conforme fluxograma na Figura 14. Foi realizada avaliação sensorial durante cinco dias para verificarmos dentre eles quais produziam aromas promissores.

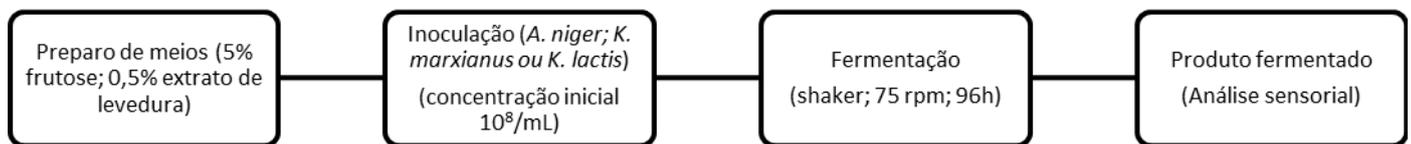


Figura 14: Fluxograma da seleção do microrganismo para a produção de aroma

2.2.11.3 Seleção dos resíduos potenciais produtores de aromas:

Após a seleção do microrganismo promissor para a produção de aromas frutais em meio sintético (conforme o item 2.2.11.2), este foi utilizado para os experimentos de seleção dos resíduos de frutas que apresentassem maior potencial para a produção de aromas. Os diferentes resíduos de frutas (goiaba, maracujá e umbu) foram fermentados conforme descrito no fluxograma apresentado na Figura 15. Os experimentos para a produção dos aromas foi realizada em frascos âmbar de 150 mL com a seguinte composição: 10% de resíduo, 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 10% do pré-inóculo em 45 mL de água destilada. Esses resíduos foram fermentados em agitador orbital tipo “shaker” a 75 rpm com concentração inicial de células de 1×10^8 /mL. O processo fermentativo foi acompanhado a cada 24h por 4 dias para avaliar a capacidade do meio em produzir aroma. Os experimentos foram realizados em triplicata. O pH foi ajustado para 5,0 utilizando-se as soluções de HCl ou NaOH, ambas na concentração de 1N. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.



Figura 15: Fluxograma da seleção do resíduo para a produção de aroma

2.2.11.4 Análise sensorial dos produtos fermentados

Os produtos fermentados foram analisados sensorialmente quanto à produção de aromas, com 0, 24, 48, 72 e 96h após sua inoculação da mesma forma como descrito no item 2.2.10.3.

2.2.11.5 Análise dos compostos voláteis e não voláteis

Após os resultados dos experimentos realizados nos itens 2.2.11.3 e 2.2.11.4, realizou-se fermentações com o resíduo e o microrganismo selecionado durante 4 dias e os produtos fermentados obtidos foram submetidos às análises de compostos voláteis e não voláteis a cada 24h da mesma forma que foi realizado nos produtos fermentados obtidos com cepas isoladas das frutas (itens 2.10.4 e 2.10.5). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.11.5.1 Análise de compostos não voláteis

Foi realizada da mesma forma que descrita no item 2.2.10.5.

2.2.11.5.2 Análise dos compostos voláteis

Foi utilizada a técnica de MEFS para analisar os compostos voláteis produzidos durante a fermentação da mesma forma descrita no item 2.9.4

2.2.12 Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), ao Teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Determinação físico química da polpa e dos resíduos obtidos após processamento de polpas de frutas

A produção de compostos de aroma durante a fermentação é induzida pela presença de nutrientes nos substratos. Portanto, a caracterização dos resíduos *in natura* de goiaba, maracujá e umbu utilizados nos experimentos (Tabela 9), visou identificar a composição destes com a finalidade de analisar a relação entre o conteúdo dos nutrientes e a produção de aromas.

Tabela 9: Composição físico-química de polpa e resíduo de goiaba, maracujá e umbu

Características físico-químicas	Polpa			Resíduo		
	Goiaba	Maracujá	Umbu	Goiaba	Maracujá	Umbu
Umidade (g/100g)	80,12 ^b ± 0,14	88,42 ^a ± 0,13	88,91 ^a ± 0,09	61,62 ^a ± 0,33	20,09 ^b ± 0,32	15,05 ^c ± 0,15
Cinzas (g/100g)	0,71 ^a ± 0,03	0,80 ^a ± 0,05	0,55 ^b ± 0,06	0,46 ^b ± 0,33	1,09 ^b ± 0,04	10,09 ^a ± 0,15
Lipídios (g/100g)	0,41 ^b ± 0,04	0,83 ^a ± 0,11	0,20 ^c ± 0,01	0,90 ^c ± 0,18	18,35 ^a ± 0,75	9,25 ^b ± 0,09
Proteínas (g/100g)	0,62 ^a ± 0,08	0,70 ^a ± 0,16	0,61 ^a ± 0,35	2,09 ^b ± 0,05	6,93 ^a ± 0,49	0,90 ^c ± 0,01
Açúcar redutor (% glicose)	5,06 ^a ± 0,25	3,78 ^b ± 0,41	3,11 ^b ± 0,18	11,20 ^a ± 0,52	1,08 ^b ± 0,35	1,25 ^b ± 0,09
Açúcares totais (g/100g)	6,16 ^c ± 0,15	8,15 ^a ± 0,07	7,21 ^b ± 0,22	13,02 ± 0,33	nd*	nd
Fibras (g/100g)	3,94 ^a ± 0,25	0,59 ^b ± 0,14	0,55 ^b ± 0,06	22,35 ^c ± 0,65	48,72 ^a ± 1,50	19,80 ^b ± 1,04
pH	3,71 ^a ± 0,01	2,98 ^b ± 0,06	2,80 ^c ± 0,00	4,80 ^a ± 0,27	4,45 ^a ± 0,06	3,21 ^b ± 0,01
Acidez (% ácido cítrico)	0,79 ^c ± 0,02	3,69 ^a ± 0,23	1,65 ^b ± 0,03	0,84 ^a ± 0,13	0,78 ^a ± 0,05	0,35 ^b ± 0,06
Sólidos solúveis (°Brix)	8,6 ^c ± 0,3	12,9 ^a ± 0,0	10,3 ^b ± 0,0	4,9 ^a ± 0,2	1,1 ^c ± 0,0	2,5 ^b ± 0,1
Aw				0,9920 ^a ± 0,0008	0,9654 ^b ± 0,0027	0,9515 ^c ± 0,0005

*nd. Não detectado

Letras diferentes, na mesma linha, para a mesma parte do fruto, diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Avaliando os resultados obtidos para a polpa de goiaba, maracujá e umbu verificou-se que houveram diferenças significativas para todos os parâmetros avaliados, exceto para a proteína. O teor de umidade da polpa de maracujá foi de 88,4% enquanto o de cinzas foi de 0,80%. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006), o teor de umidade e de cinzas do maracujá são de 82,9% (base úmida) e 0,8%, respectivamente, e de 85,72% e 0,77% segundo Tuma et al. (1980), estando os resultados encontrados nas análises do projeto bem próximos a estes valores.

O teor de umidade das polpas de goiaba foi 80,12%, apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparada com as polpas de maracujá e umbu, que obteve teores de umidade de 88,24 e 88,91%, respectivamente. Galvão (2002) analisando a polpa de umbu reportou teores de umidade de 89,22%, e TACO (2008) apresenta teores de umidade de 80,72%, dados que corroboram com os resultados reportados no presente estudo.

O conteúdo mineral foi quantificado a partir da determinação de cinzas, obtendo-se maiores teores para a polpa de maracujá e goiaba que apresentaram respectivamente 0,80 e 0,71%, sendo que, o teor de cinzas quantificado no presente estudo para a polpa de goiaba foi superior ao encontrado por Vasques (2003), que reportou 0,41% de cinzas na polpa. Menores teores de cinzas foram encontrados para a polpa de umbu (0,55%), sendo que Galvão (2002) trabalhando com o mesmo fruto obteve 0,70% de cinzas.

Os açúcares totais apresentaram maiores teores para a polpa de maracujá (8,15%), dado que corrobora com os obtidos por Ciabotti et al. (2000) que reportou 8,48% de açúcares totais para o mesmo fruto. Ainda para a polpa de maracujá Jazantti et al. (2012) relatou uma quantidade de açúcares totais para as polpas de maracujá cultivadas de modo orgânico e tradicional de 5,26 e 3,63%, respectivamente, valores esses menores do que o encontrado neste trabalho. Para a polpa de umbu foram encontrados os valores de 3,11 e 7,21% para açúcares redutores e totais respectivamente. Lima et al. (2003) encontrou para a polpa de umbu valores de açúcares redutores de 4,51% e 7,74% para açúcares totais, valores estes próximos ao encontrado neste estudo. Vila et al. (2007) avaliando revestimento de polpa de goiaba reportou um valor de açúcares redutores de 5,93% e para açúcares totais um valor de 4,94%, valores próximos ao encontrado neste trabalho para a polpa de goiaba. O teor de açúcar de um fruto pode variar conforme os nutrientes do solo, como também seu estágio de maturação.

Para o conteúdo de fibras as polpas de maracujá e umbu não apresentaram altos valores e não diferiram entre si significativamente. O destaque se deve a presença em quantidade de fibras na polpa de goiaba. Estudos recentes revelaram que uma quantidade de 3 a 6% de fibras em um alimento torna-o fonte deste nutriente, fazendo assim que a goiaba se destaque como fonte deste nutriente. Martinez et al. (2012) reportou em seu estudo sobre a composição de fibras em diferentes frutas tropicais valores para a polpa de goiaba de 11,1g/100g de polpa, sendo este valor muito mais alto que o encontrado neste trabalho. O autor ainda salienta que a presença em grande quantidade de fibras pode estar associada com a presença de compostos antioxidantes naturais.

Os valores de pH, °Brix e acidez encontram-se em concordância com os valores citados por Brunini et al. (2003) que avaliou influência do tempo de armazenamento para polpa de goiaba, sendo esses valores de pH 3,76-3,86, acidez de 0,362-0,408 g de ácido cítrico/100g de polpa e teor de sólidos solúveis de 8,5-9,09 °Brix ao longo de 24 dias de armazenamento. Para as polpas de maracujá e umbu os valores encontrados também encontram-se em conformidade com a literatura. Monteiro et al. (2005) encontrou para a polpa de maracujá amarelo pH de 2,9, sólidos solúveis em torno de 14°Brix e acidez de 3,8 em média, sendo esses resultados coerentes com o encontrado para esta polpa neste trabalho. Para a polpa de umbu Lima et al. (2003) encontrou para o pH de polpa de umbu um valor de 2,16, sólidos solúveis por volta de 10°Brix e acidez de 1,45 g de ácido cítrico/100g de polpa. A polpa de umbu estudada neste trabalho apresentou comportamento semelhante nestes constituintes como reportado por Lima et al. (2003).

Com base nos valores obtidos verificou-se que os resíduos apresentam grandes diferenças significativas ($p < 0,05$) entre eles, principalmente, nos teores de umidade, lipídeos, proteínas, fibras, sólidos solúveis e atividade de água. Houve semelhança apenas nos teores de cinzas, pH e acidez entre os resíduos de goiaba e maracujá.

O teor de umidade do resíduo de goiaba foi bastante elevado (61,62%), quando comparado com os de maracujá (20,09%) e umbu (15,05%). O elevado teor de umidade em conjunto com o valor de atividade de água (0,9920) é um fator limitante e indica que esse resíduo é bastante propício a deterioração microbiológica.

De maneira geral, verifica-se que, quanto aos minerais, os resíduos se destacam pela grande variação nos conteúdos de cinzas, com valor mínimo de 0,96% (goiaba) e máximo de 10,09% (umbu) que foi próximo ao valor citado por Abud & Narain (2009) de 12,5% para resíduo de umbu. Os resíduos de goiaba e maracujá apresentaram valores próximos a 1%, inferior aos valores encontrados na literatura para farelos para goiaba e maracujá são próximos de 2 e 4%, respectivamente (Azevedo et al., 2007; Abud & Narain, 2009; Lira et al., 2011).

Observando-se os resultados dos lipídeos constatou-se que todos os resíduos apresentaram quantidades significativas desse nutriente, com exceção do resíduo de goiaba, que apresentou apenas 0,90%. Verificou-se uma alta concentração no resíduo de maracujá e umbu, sendo 18,35 e 9,25%, respectivamente. Esses valores foram próximos aos encontrados por Abud & Narain (2009) em resíduos de maracujá e umbu. Matias et al. (2005), ao avaliarem os resíduos de goiaba, obtiveram valores inferiores (0,13%) ao encontrados neste estudo. Entretanto, Sousa et al. (2011), ao analisarem resíduos de goiaba, reportaram teores bem superiores (2,94%) de lipídeos.

A composição de proteína dos resíduos variou de 0,90 (umbu) a 6,93 g/100g (maracujá). As frutas de uma maneira geral não são fontes potenciais de proteínas, entretanto parece que esse macronutriente se encontra predominantemente nas cascas e sementes. O valor de proteína encontrado para o resíduo de goiaba (2,09%) foi inferior aos valores citados na literatura para farelo de goiaba. No entanto, foi similar aos valores citados por Matias et al. (2005) de 1,65% e Sousa et al. (2011) de 2,82% para resíduo de goiaba "*in natura*". O teor de proteínas no resíduo de umbu (0,90 g/100g) foi similar ao reportado por Santos et al. (2011) e Galvão (2002). O resíduo de maracujá apresentou valor inferior ao citado pela literatura (Butolo, 1993; Korndorfer et al 1998; Ferrari et al., 2004). Esse fato é devido que os resíduos de maracujá usados nas referências são oriundos da casca do fruto enquanto que nessa pesquisa são constituídos de semente/caroço.

De maneira geral, resíduos agroindustriais contêm quantidades significativas de fibras alimentares, conforme os resultados obtidos de 22,35%; 48,72% e 19,80% de fibra total para resíduo de goiaba, maracujá e umbu, respectivamente, estando em concordância com os dados de goiaba (Matias et al., 2005), maracujá (Butolo, 1993; Korndorfer et al., 1998; Lousada Júnior 2006; Azevedo et al., 2007; Abud & Narain, 2009) e umbu (Abud & Narain, 2009). O teor de fibras é um importante constituinte químico, que atuam como fonte de carbono e energia durante a fermentação, e todos os resíduos apresentaram elevado teor.

A acidez é um importante parâmetro na avaliação do estado de conservação. Os valores de acidez encontrados (0,35 a 0,84%) e pH (3,21 a 4,80) refletem resíduos ácidos, que proporcionam uma maior estabilidade, dificultando o crescimento de microrganismos, apesar de não evitar totalmente a deterioração de por fungos ou bactérias. Uchoa et al. (2008) analisando pó de resíduo de goiaba, encontraram o teor de acidez de 1,21% e o pH de 4,60, enquanto Abud & Narain (2009) encontraram valores de 0,08%, 0,27% e 0,15% para acidez e pH de 4,88, 3,12 e 4,21 em resíduo de goiaba, umbu e maracujá, respectivamente. Este fato deve-se provavelmente que o presente estudo e o realizado por Abud & Narain (2009) utilizaram resíduos provenientes da região dos tabuleiros costeiros.

Os valores de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) encontrados nos resíduos de goiaba, maracujá e umbu foram 4,9; 1,1 e 2,5 $^{\circ}$ Brix, respectivamente. Valores maiores de sólidos solúveis eram esperados, uma vez que grande parte dos teores de sólidos solúveis totais presentes nas frutas, também estão presentes em seus resíduos. No entanto, os resíduos apresentavam em sua composição uma predominância de sementes/caroço. Uchoa et al. (2008) justificaram que esses teores podem variar com o processamento aplicado na extração da polpa, fatores climáticos, variedade do fruto, tipos de solo e diversos outros fatores agronômicos.

Essas variações na composição química são condicionadas por diversos fatores como: variedade do fruto, incluindo a proporção de sementes e cascas no resíduo; estado de maturação dos frutos, pois, por exemplo, em estágio avançado de maturação, possuem maior percentual de umidade e carboidratos. Outro fator, é o solo da região dos tabuleiros costeiros, considerados como profundos e de baixa fertilidade. Em virtude dessas variações e do baixo teor de nutrientes, para favorecer o crescimento microbiano necessitou-se que o meio de cultivo fosse suplementado com glicose e extrato de levedura. Além disso, o pH do meio também foi ajustado para 5,0, sendo considerado favorável para o crescimento dos microrganismos.

2.3.2 Seleção da fibra

Os compostos voláteis produzidos no processo biotecnológico de obtenção de aroma a partir de resíduos de goiaba utilizando *Kluyveromyces lactis* foram analisados utilizando a técnica de MEFS. A literatura (Antalick et al., 2010; Begala et al., 2002; Howard et al., 2005) relata que a eficácia depende da composição da fibra. E nesse sentido, inicialmente, foram testadas algumas fibras (PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e PDMS) visando uma melhor captura dos compostos voláteis.

A fim de se comparar os perfis de voláteis obtidos, as análises de MEFS ocorreram nas mesmas condições: tempo de equilíbrio (10min), tempo de extração (30min) e temperatura de extração (40°C) baseado nos dados da literatura (Ramos et al., 2008; Díaz et al., 2009; Cheong et al., 2010). Os experimentos foram realizados em triplicata e o melhor resultado de cada análise

foi possível separar 42, 36 e 22 componentes voláteis para as fibras PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e PDMS, respectivamente.

A Figura 16 apresenta o cromatograma dos íons totais (TIC) do HS-MEFS do produto fermentado de resíduo de goiaba obtido com revestimentos diferentes (PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e PDMS). Como pode ser visto o revestimento PDMS/DVB extraiu os compostos voláteis em maior intensidade, onde, por exemplo, obteve-se o pico de β -cariofileno com intensidade de $8,2 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$ e $1,1 \times 10^6$ counts, utilizando os revestimentos PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e PDMS, respectivamente.

Considerando a polaridade dos materiais dessas fibras, o revestimento de PDMS é o mais apolar seguido pela mistura DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB (Bogusz Júnior et al., 2011). Foi possível verificar que a fibra PDMS/DVB foi a que apresentou melhor capacidade de captura dos compostos voláteis presentes no produto fermentado de resíduo de goiaba, sendo a mais adequada para esse tipo de analito provavelmente devido a sua baixa pressão de vapor (Pawliszyn, 1999; Lord & Pawliszyn, 2000). Esse mesmo comportamento foi observado por Stoppacher et al. (2010), os quais utilizaram 5 fibras (PA, PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS) para verificar o perfil dos metabólitos primários produzidos pelo fungo *Trichoderma atroviride*. Bonino et al. (2003) avaliaram o aroma de vinhos utilizando a técnica de MEFS e compararam 3 revestimentos (PDMS/DVB; CAR/DVB e PDMS), sendo a PDMS/DVB a fibra mais eficiente.

Outro fator é a questão da espessura do filme, a qual variou de $30\mu\text{m}$ (PDMS e DVB/CAR/PDMS) a $65\mu\text{m}$ (PDMS/DVB), quanto mais espesso o filme favorece os compostos mais voláteis e filmes mais finos são ideais para moléculas grandes (Sigma, 2013). Baseado nisto, a fibra contendo o revestimento PDMS/DVB foi escolhida para todos os futuros experimentos posteriores. Esse tipo de revestimento é considerado bipolar e é indicado para extração de compostos altamente voláteis e polares. Além disso, fibras com fases adsorventes adicionais, como a DVB, são consideradas fibras mais eficazes (Díaz et al., 2009).

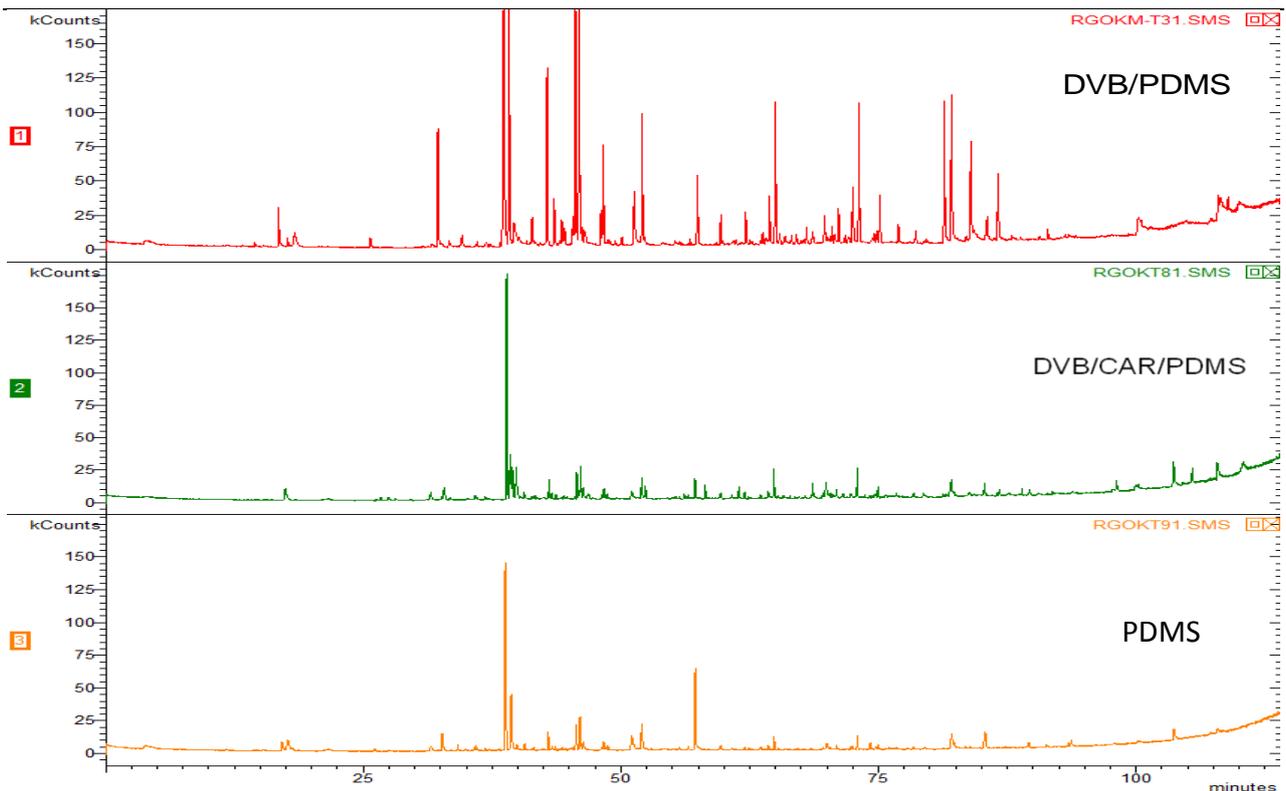


Figura 16: Comparação dos cromatogramas dos íons totais do produto fermentado obtido pelo uso de resíduo de goiaba extraídos por MEFS utilizando fibras de diferentes revestimentos.

2.3.3 Otimização das condições de análises cromatográficas dos compostos voláteis

Após a seleção da fibra para captura dos compostos voláteis foi realizada uma otimização do tempo de análise da corrida cromatográfica, visto que os compostos voláteis eluíam até 90min de corrida, e no início da corrida somente após 15 min. Desta forma, para os experimentos posteriores foi utilizada uma nova programação com apenas 59,5min de análise, conforme pode ser observado na Figura 17, a qual demonstra os cromatogramas obtidos nas 2 programações de temperatura de forno usada no CG. É possível verificar que com essa nova programação os compostos voláteis de aroma saíram em menor tempo de análise sem prejudicar a separação dos mesmos.

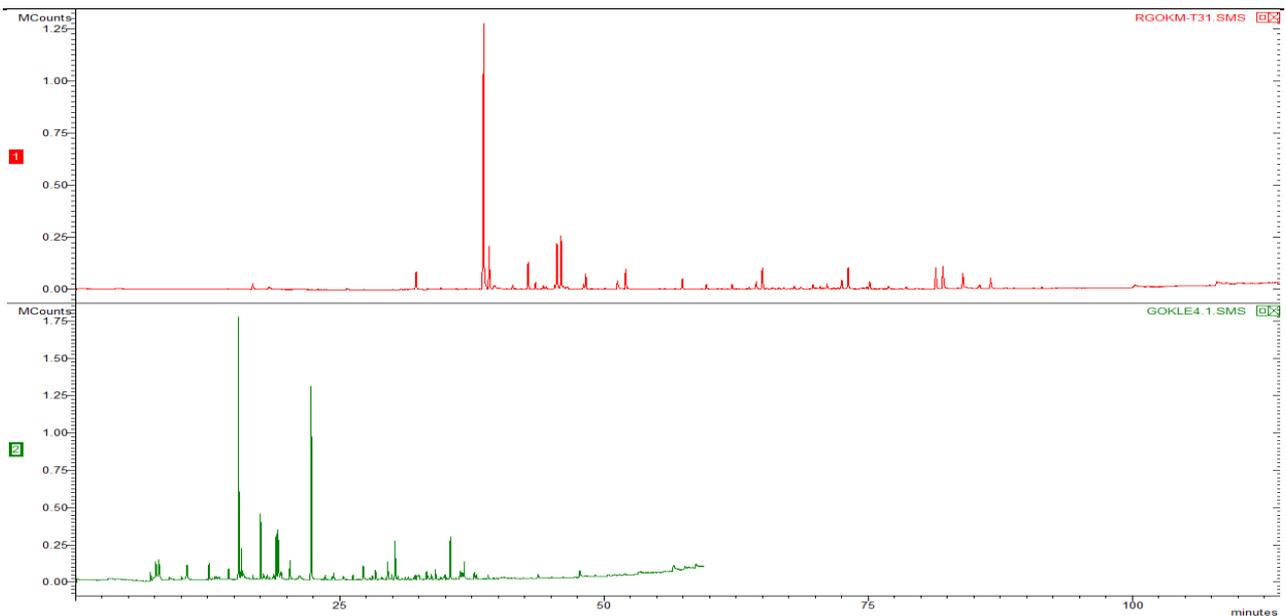


Figura 17: Cromatogramas de resíduo de goiaba com programações de temperatura do forno 1 e 2.

2.3.4 Isolamento dos microrganismos a partir das diversas frutas (goiaba, maracujá e umbu)

2.3.4.1 Seleção do microrganismo

De acordo com a metodologia descrita no item 2.2.10.2 foram isolados, dentre todos os métodos de isolamento utilizados, 62 microrganismos, sendo que 23 da goiaba, 24 do maracujá e 15 do umbu (Tabela 10). O método de isolamento 1, foi o método que possibilitou uma maior quantidade de microrganismos isolados utilizando o meio YM. Todos os microrganismos foram submetidos a dois testes sensoriais. O primeiro deles realizado em placas (ágar YEPD) e o segundo em meio sintético. Dentre esses 62 microrganismos, em apenas 4 foi registrada a presença de aroma na placa pelos membros da equipe sensorial, sendo 3 isolados do fruto da goiaba (LAF9, LAF13 E LAF18), 1 do maracujá (LAF5) e nenhum para o umbu.

Tabela 10: Total de microrganismos isolados e produtores de aromas

Atributos	Goiaba	Maracujá	Umbu	Total
Isolados	23	24	15	62
Método 1	3	1	0	4
Método 2	11	13	5	29
Aroma frutal	5	10	0	15

No segundo teste sensorial realizado em erlenmeyer, dentre os 62 produtos fermentados, 29 produziram aromas que foram percebidos pela análise sensorial, dos quais 11 da goiaba, 13 no maracujá e 5 do umbu.

Dos 29 microrganismos produtores de aromas isolados, as cepas isoladas de umbu apresentaram apenas notas indesejáveis (pútrido, terra, esgoto, fermentado), e as demais produziram aromas agradáveis de intensidades variadas. Estes aromas produzidos indesejáveis pelos microrganismos isolados de umbu tem sua importância, no entanto os aromas alvo desse estudo foram os frutais e dessa forma não foram utilizados nesse trabalho, mas são potenciais para trabalhos futuros. Dentre os 29 isolados, 15 (52%) produziram aromas frutais segundo a percepção dos julgadores, sendo 10 provenientes do maracujá e 5 da goiaba. Das leveduras que produziram aromas desejáveis, 8 (53%) geraram aromas frutais segundo a equipe sensorial. Algumas das descrições de aromas citadas além de frutal foram: floral, doce, chiclete, fermento e cítrico.

Na Tabela 11 e na Figura 18 pode-se observar a intensidade média do aroma percebido durante a fermentação dos microrganismos isolados de goiaba. Observa-se que o aroma frutal estava presente em todos os microrganismos isolados da goiaba, com maiores notas para as linhagens LAF9, LAF14 e LAF45, não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$). As linhagens LAF9, LAF14 e LAF45 foram as que apresentaram maiores intensidades de aroma frutal, recebendo notas superiores a 6. A nota sensorial floral mereceu destaque para o microrganismo LAF9, obtendo nota 8. As maiores notas de aroma obtidas para os isolados de goiaba foram laranja (LAF45) e floral (LAF9), sendo bem mais intenso que dos outros aromas descritos.

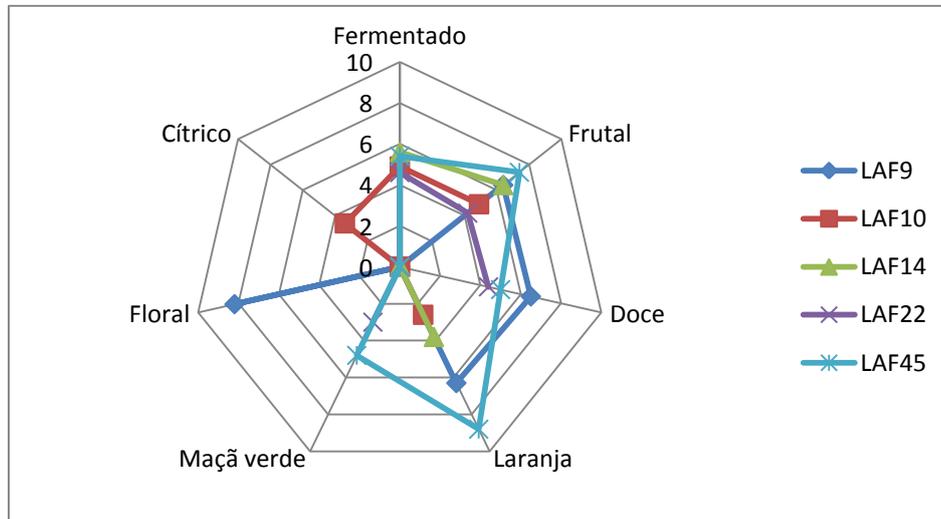


Figura 18: Notas de diversos aromas observados nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético

Tabela 11: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético

Atributos	LAF9	LAF10	LAF14	LAF22	LAF45
Cítrico	0,0 ^b	3,4 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Doce	6,5 ^a	0,0 ^d	0,0 ^d	4,4 ^c	5,0 ^b
Fermentado	0,0 ^b	4,93 ^a	5,6 ^a	4,6 ^a	5,4 ^a
Floral	8,2 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Frutal	6,4 ^a	4,9 ^b	6,4 ^a	4,2 ^b	7,4 ^a
Laranja	6,3 ^b	2,6 ^c	3,8 ^c	0,0 ^d	8,8 ^a
Maçã verde	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	3,0 ^b	4,8 ^a

* Em uma mesma linha, médias com letras em comum, não diferem entre si em nível de 5% de significância

Com relação aos microrganismos isolados do maracujá verifica-se na Figura 19 e Tabela 12 que os atributos frutal e doce foram descritos para todos os isolados. As descrições “abacaxi” e “fermentado” não foram percebidas apenas para LAF3 e LAF12, respectivamente. As maiores notas para o atributo doce foram obtidas apenas para as linhagens LAF3, LAF5, LAF33 e LAF35. As notas maçã verde e chocolate foram dadas apenas para o LAF3.

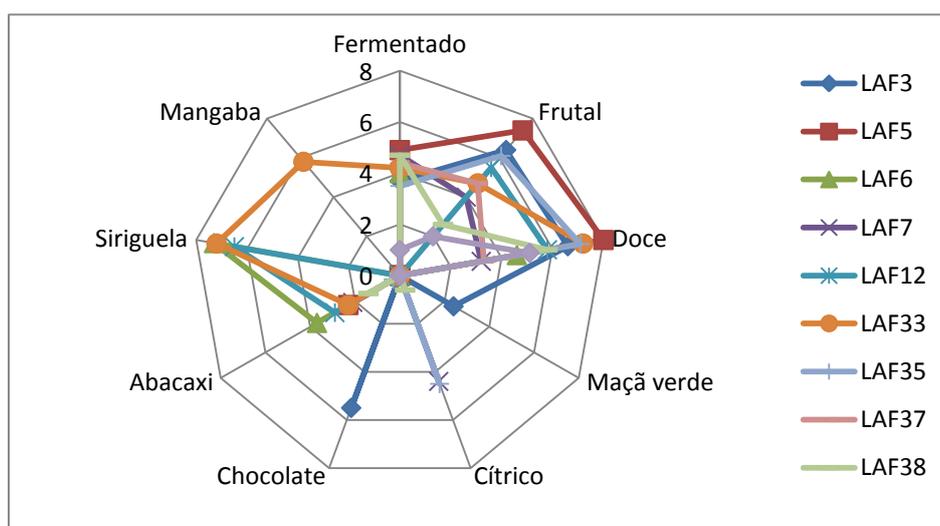


Figura 19: Notas de diversos aromas observados nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio sintético

Deetae et al. (2011) avaliaram a produção de compostos de aroma por *Proteus vulgaris*. Os autores realizaram análise sensorial do fermentado com 33 painelistas não treinados que detectaram aroma frutal ao longo do processo fermentativo. Uenojo & Pastore (2010) a partir de 80 microrganismos isolados de flores de margarida selecionaram 7, os quais produziram aromas intensos após 72h de fermentação.

Tabela 12: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético

Atributos	LAF3	LAF5	LAF6	LAF7	LAF12	LAF33	LAF35	LAF37	LAF38	LAF39
Abacaxi	0,0 ^d	2,3 ^{abc}	3,7 ^a	2,1 ^{bc}	2,9 ^{ab}	2,3 ^{abc}	0,31 ^d	0,21 ^d	1,4 ^{cd}	0,0 ^d
Chocolate	5,5 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Cítrico	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	4,4 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	4,5 ^a	0,0 ^b	0,6 ^b	0,0 ^b
Doce	6,6 ^{ab}	8,0 ^a	4,6 ^d	3,2 ^d	5,8 ^{bc}	7,2 ^a	7,1 ^a	3,3 ^d	5,8 ^{bc}	5,1 ^{cd}
Fermentado	3,7 ^a	4,9 ^a	4,0 ^a	4,7 ^a	0,0 ^b	4,2 ^a	3,5 ^a	4,4 ^a	4,7 ^a	1,0 ^a
Frutal	6,4 ^a	7,4 ^a	6,4 ^a	4,0 ^{bc}	5,5 ^a	4,7 ^{ab}	6,1 ^a	4,7 ^{abc}	2,6 ^{cd}	2,0 ^d
Maçã verde	2,4 ^a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mangaba	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8 ^a	0,0	0,0	0,0	0,0
Siriguela	0,0	0,0	7,3 ^a	0,0	6,5 ^a	7,2 ^a	0,0	0,0	0,0	0,0

* Em uma mesma linha, médias com letras em comum, não diferem entre si em nível de 5% de significância.

2.3.4.2 Fermentação por microrganismos selecionados no meio contendo resíduos agroindustriais

Após os resultados obtidos no item 2.3.4.1, foram selecionados 3 cepas do isolados de goiaba, LAF9, LAF14 e LAF45, e 3 de maracujá, LAF3, LAF5 e LAF35, para novas fermentações em meio de cultura contendo resíduo agroindustrial das respectivas frutas. As Figuras 20 e 21 demonstram os microrganismos selecionados a partir do isolamento das frutas de goiaba e maracujá, respectivamente. Os mesmos apresentaram as seguintes características morfológicas quando visualizadas em microscópio:

LAF9: esféricas, pequenas, brancas e aspecto leitoso;

LAF14: bastonetes, transparentes e diversos tamanhos;

LAF 45: transparente, com bordas escuras e finas.

LAF3: aspecto leitoso bem claro, esféricas e pequenas;

LAF5: aspecto leitoso, esféricas, pequenas e médias;

LAF35: esféricas, amarelas e opacas;

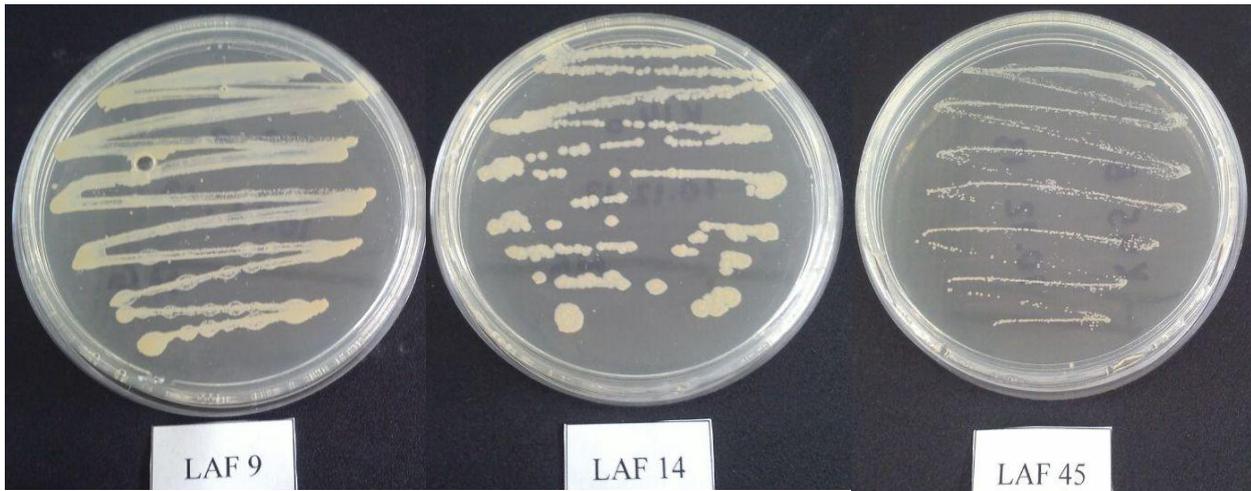


Figura 20: Fotografias das placas das cepas selecionadas de goiaba



Figura 21: Fotografias das placas das cepas selecionadas de maracujá

De acordo com a Tabela 13 foi possível verificar as descrições pelo painel sensorial dos produtos fermentados com meio contendo resíduos de goiaba e maracujá. A percepção de aroma de goiaba nos produtos fermentados com meio contendo resíduo de goiaba foi unanime. No meio contendo resíduo de maracujá a intensidade e as descrições foram muito similares entre as cepas desse grupo. Além disso, a intensidade do aroma percebido foi sensivelmente superior nos meio contendo resíduo de goiaba ou maracujá quando comparado com o meio contendo apenas glicose e extrato de levedura, onde podemos afirmar que a composição dos resíduos (Tabela 9) influenciou nesse aspecto, podendo ser atribuído ao maior teor de glicose e a presença de alguns aminoácidos desses resíduos. Esse mesmo comportamento foi percebido por Uenojo (2003), que fermentou microrganismos isolados de frutas em meio contendo resíduo agroindustrial (casca de café seco, bagaço de uva) com e sem a adição de glicose, e o meio contendo maior quantidade de glicose apresentou uma maior intensidade e melhor descrição

dos aromas percebidos. Esse resultado demonstra que as cepas utilizam a glicose do meio como fonte de carbono para seu crescimento.

Tabela 13: Descrição dos aromas percebidos pelos provadores em meio sintético e meios com resíduo de maracujá (LAF3, LAF5 e LAF35) e goiaba (LAF9, LAF14 e LAF45).

Microorganismo	Aroma do produto fermentado	
	Meio usando resíduo	Meio sintético
LAF9	Goiaba, goiaba queimada, doce, goiabada, hortelã, frutal, caramelo	Frutal, doce, laranja, floral
LAF14	Frutal, rosa, hortelã, goiaba, mel, doce, fumaça	Frutal, laranja, fermento
LAF45	Goiaba, doce	Frutal, floral
LAF3	Doce, frutal, ácido	Frutal, doce, maçã verde, chocolate, fermento
LAF5	Rosas, frutal, ácido, doce	Frutal, doce, abacaxi, fermento
LAF35	Frutal, maracujá, doce	Frutal, doce, abacaxi, fermento, cítrico

As notas da análise sensorial das cepas dos isolados de goiaba fermentados em meio sintético (MS) e em meio contendo resíduo de goiaba (RES) estão apresentadas na Figura 22 e na Tabela 14. Além dos aromas anteriormente descritos em meio sintético, os avaliadores perceberam no meio contendo resíduo aroma de hortelã, fumaça e goiaba, sendo o aroma de goiaba perceptível por todos os provadores nas 3 cepas testadas. Entretanto, o aroma de laranja e maçã verde foi percebido apenas em meio sintético.

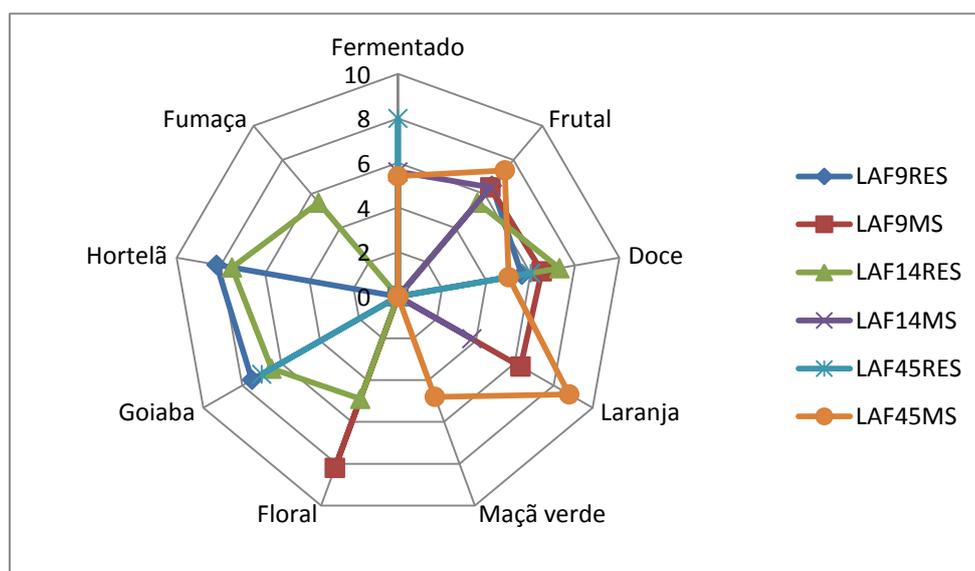


Figura 22: Notas de diversos aromas percebidos nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético e meio de resíduo de goiaba.

Tabela 14: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de goiaba em meio sintético e meio de resíduo de goiaba

Atributos	LAF9MS	LAF9RES	LAF14MS	LAF14RES	LAF45MS	LAF45RES
Doce	6,5 ^a	5,6 ^a	0,0 ^b	7,3 ^a	5,0 ^a	6,0 ^a
Fermentado	0,0 ^c	0,0 ^c	5,6 ^b	0,0 ^c	5,4 ^b	8,0 ^a
Floral	8,2 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	4,9 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c
Frutal	6,4 ^b	6,5 ^b	6,4 ^b	5,5 ^b	7,4 ^a	0,0 ^c
Fumaça	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	5,5 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
Goiaba	0,0 ^b	7,5 ^a	0,0 ^b	6,5 ^a	0,0 ^b	7,0 ^a
Hortelã	0,0 ^b	8,2 ^a	0,0 ^b	7,5 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
Laranja	6,3 ^b	0,0 ^d	3,8 ^c	0,0 ^d	8,8 ^a	0,0 ^d
Maçã verde	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	4,8 ^a	0,0 ^b

* Em uma mesma linha, médias com letras em comum, não diferem entre si em nível de 5% de significância.

A Figura 23 e Tabela 15 apresentam as notas dos diversos aromas percebidos durante a análise sensorial das cepas dos isolados de maracujá fermentados em meio sintético (MS) e em meio contendo resíduo de maracujá (RES). Os avaliadores descreveram apenas 3 aromas no produto fermentado sendo cítrico, doce e frutal. Apenas o LAF5 apresentou nota superior no atributo doce quando utilizamos meio com resíduo de maracujá.

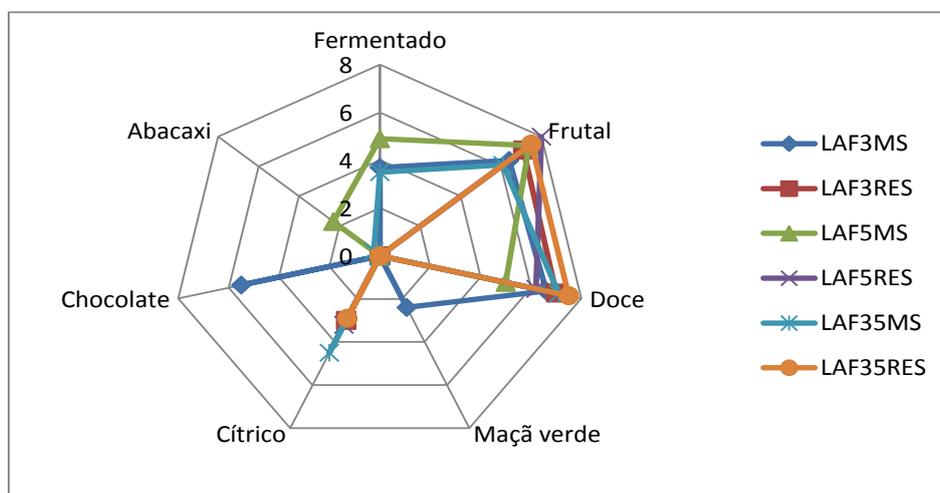


Figura 23: Notas de diversos aromas percebidos nos produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio de resíduo de maracujá.

Tabela 15: Média* dos atributos para os produtos fermentados pelo uso de microrganismos isolados de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá

Atributos	LAF3MS	LAF3RES	LAF5MS	LAF5RES	LAF35MS	LAF35RES
Abacaxi	0,0 ^b	0,0 ^b	2,3 ^a	0,0 ^b	0,31 ^b	0,0 ^b
Chocolate	5,5 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Cítrico	0,0 ^b	3,0 ^a	0,0 ^b	3,2 ^a	4,5 ^a	2,9 ^a
Doce	6,6 ^a	7,0 ^a	5,0 ^b	6,2 ^a	7,1 ^a	7,5 ^a
Fermentado	3,7 ^a	0,0 ^b	4,9 ^a	0,0 ^b	3,5 ^a	0,0 ^b
Frutal	6,4 ^a	7,1 ^a	7,4 ^a	8,0 ^a	6,1 ^a	7,5 ^a
Maçã verde	2,4 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

* Em uma mesma linha, médias com letras em comum, não diferem entre si em nível de 5% de significância.

2.3.4.3 Análise dos compostos voláteis

As Tabelas 15, 16 e 17 apresentam os compostos voláteis obtidos pelo uso das cepas LAF9, LAF14 e LAF45, respectivamente, enquanto as Tabelas 18, 19 e 20 pelo uso das cepas LAF3, LAF5 e LAF35, respectivamente, utilizando as técnicas de MEFS e *Purge and Trap*, em meio sintético e com resíduo, com o uso de coluna polar e apolar.

Os compostos voláteis presentes nos controles abióticos referem-se aos resultados obtidos em todas as condições dos experimentos (técnicas de extração –MEFS e *Purge and Trap*; meio sintético ou meio com resíduo agroindustrial; coluna cromatográfica apolar e polar). Esses resultados foram obtidos em quantidade muito inferiores aos obtidos nos produtos fermentados com as cepas isoladas das frutas e dessa forma não foi quantificado.

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos para a cepa LAF9, onde foram identificados 30 compostos. As principais classes foram dos ésteres, alcoóis e terpenos, onde podemos destacar os compostos acetato de etila, pentanol e o β -cariofileno que foram presentes em todos os experimentos. Ao se avaliar os resultados obtidos em meio sintético e em meio contendo resíduo, verifica-se que os terpenos foram presentes apenas nos produtos fermentados que utilizaram resíduo agroindustrial de goiaba, incluindo o controle abiótico, exceto para o β -cariofileno, que foi presente em todas as condições analisadas. Os compostos terpênicos identificados são naturalmente presentes do resíduo e na fruta e sua presença no produto fermentado em meio sintético, contendo apenas extrato de levedura e glicose reforça que esta cepa foi capaz de produzir este composto.

Tabela 16: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF9 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo de goiaba)	Cepa LAF9			
			Técnica de Captura de Voláteis/coluna			
			MEFS/ apolar	PT/ apolar	PT/ apolar	PT/ polar
			Meio			
			Sintético	Resíduo		
			Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)			
Ácido	Ácido acético					30,7
	Ácido octanóico		45,5			
	2-FE	x	441,2	2605,2	1190,9	
Álcool	2-metil propanol			5647,8	4553,3	116,3
	Etanol			13706,1	105536,1	190,7
	Pentanol		1006,5	61148,5	40861,9	126,7
Aldeído	Benzaldeido		64,8			
	2-FEA	x	96,7			
	Acetato de amila			1159,5	1283,9	
	Acetato de butila			163,6		
	Acetato de etila	x	4227,5	20918,7	1481,4	3054,9
	Acetato de isoamila	x	117,6	957,7		929,7
Éster	Decanoato de etila		239,2			
	Dodecanoato de etila		116,4			
	Hexanoato de etila	x	183,8			
	Octanoato de etila		1961,2			
	Octanoato de isoamila		68,6			
	Propanoato de etila		302,5	1762,8	13751,6	
	2-careno	x			1250,5	54,7
	3-careno	x			4631,8	48,9
	α -copaeno	x			4046,5	42,7
	α -guaieno	x				
	Alloaromadendreno	x			3523,0	43,8
Terpeno	β -ocimeno	x			1289,9	146,0
	Cariofileno	x	85,2	188,1	23004,1	352,5
	Eucaliptol	x			1529,0	
	Humuleno	x			4278,0	67,9
	Limoneno	x			2366,7	
	α -Selineno	x			2652,6	34,0
	β -Selineno	x			2658,9	28,6
TOTAL		17	14	10	18	15

A extração dos compostos voláteis nos produtos fermentados utilizando a cepa LAF9 foi mais eficiente quando utilizou-se a técnica de MEFS (constituindo 14 compostos) quando comparada com a técnica de *Purge and Trap*, o que continha apenas 10 compostos. Além disso, a classe dos ésteres apresentou melhor resultado quando os voláteis foram capturados pela técnica de MEFS, sendo 9 compostos, enquanto pela técnica de *Purge and Trap* o qual revelou a

presença de apenas 5. No entanto, a concentração dos compostos foi superior utilizando a técnica de *Purge and Trap*. Vale salientar que a técnica de MEFS demonstrou não ser eficiente para a captura de alcoóis, comportamento já descrito na literatura (Povolo & Cantarini, 2003).

Os resultados obtidos com o uso da cepa LAF9 em meio contendo resíduo agroindustrial de goiaba utilizando coluna apolar apresentou relativamente maior número de compostos (18) quando comparado com os resultados em coluna polar (15).

Os compostos voláteis dos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF14 estão apresentados na Tabela 17. Foram identificados 38 compostos voláteis e dentre eles destacam-se o 2-FE, o acetato de etila, acetato de isoamila e β -cariofileno, que foram detectados em todas as condições avaliadas. Maiores concentrações foram obtidas para todos os compostos voláteis nos experimentos que utilizaram a técnica de *Purge and Trap*, como método de extração, em coluna apolar utilizando meio com resíduo agroindustrial.

Avaliando os resultados dos produtos fermentados utilizando a cepa LAF14 verifica-se que a técnica de MEFS capturou 10 compostos voláteis enquanto a técnica de *Purge and Trap* capturou 13. A técnica de MEFS conseguiu detectar apenas um álcool (2-FE), enquanto a técnica de *Purge and Trap* detectou 4 alcoóis, o que era esperado uma vez que a técnica de MEFS é reconhecida como não ideal para analisar alcoóis, pois a fibra é rapidamente saturada (Povolo & Cantarini, 2003).

Os produtos fermentados em meio contendo resíduo obtiveram maior número (29) como também maior concentração dos compostos quando comparados com os produtos fermentados em meio sintético. Os compostos que apresentaram maior incremento na sua concentração com cerca de 30, 190 e 1000 vezes foram 2-metil propanol, propanoato de isoamila e β -cariofileno, respectivamente.

Tabela 17: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF14 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo)	Cepa LAF14			
			Técnica de Captura de Voláteis/coluna			
			MEFS/ apolar	PT/ apolar	PT/ apolar	PT/ polar
		Meio				
		Sintético	Resíduo			
		Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)				
Ácido	Ácido acético					14,6
	Ácido octanóico		21,6			
	2-etil butanol				3668,2	
Álcool	2-FE	x	218,2	68,4	1017,1	3,6
	2-metil propanol			123,2	2997,6	34,6
	Etanol			476,3	2888,2	39,6

	Hexanol	x			6,2
	Pentanol		501,8	2524,1	4,0
Aldeído	2-metil butanal		31,5	780,4	
	3-metil hexanal			13209,2	
	2-FEA	x	742,0	148,9	1,6
	Acetato de butila		197,3	365,4	
	Acetato de etila	x	17,6	1525,1	5,5
	Acetato de hexila				5,0
Éster	Acetato de isoamila	x	1436,7	766,3	2687,5
	Decanoato de etila		467,8		
	Dodecanoato de etila		478,5		
	Hexanoato de etila	x	53,2	133,9	1136,2
	Octanoato de etila		196,8	28,6	
	Propanoato de etila				3034,0
	Propanoato de isoamila			23,7	4539,8
	2-careno	x			427,6
	3-careno	x			3859,0
	α -copaeno	x			3089,6
Terpeno	Alloaromadendreno	x			3197,4
	allo-ocimeno	x			63,2
	α -ocimeno	x			10,7
	Aromandendreno	x			440,0
	β -ocimeno	x			1012,6
	Cadineno	x			414,3
	Cariofileno	x	107,8	19,1	19761,5
	δ -selineno	x			389,5
	Eucaliptol	x			1598,4
	Humuleno	x			3848,4
	Limoneno	x			1849,9
	α -Selineno	x			2156,8
	β -Selineno	x			2129,2
Outros	Dimetilamina		55,9	268,8	
TOTAL		22	10	13	29

Foram identificados 39 compostos voláteis (Tabela 18) nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF45 e as principais classes foram a dos ésteres, alcoóis e terpenos. Os compostos voláteis comuns a todos os experimentos foram: 2-FE, acetato de etila e β -cariofileno.

Tabela 18: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF45 isoladas de goiaba em meio sintético e meio contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo de goiaba)	Cepa LAF45				
			Técnica de Captura de Voláteis/coluna				
			MEFS/ apolar	PT/ apolar	PT/ apolar	PT/ polar	
			Meio				
			Sintético		Resíduo		
			Concentração (µMol/L)				
Ácido	Acido acético					156,0	
	Ácido octanóico		2,5				
	2-butenol					1,5	
Álcool	2-FE	x	205,4	1,1	2233,9	1,7	
	2-metil propanol		5,9	155,2		177,3	
	Etanol			279,2	10214,1	82,1	
	Pentanol		380,1	1543,5		515,0	
Aldeído	2-butenal					1,0	
	2-metil butanal			260,3			
	Acetaldeído	x				387,6	
	Benzaldeido					1,2	
	2-FEA	x	1,8	1,9		1,1	
	Acetato de amila			544,8			
	Acetato de butila			221,6			
	Acetato de etila	x	13,5	4361,2	366,5	472,1	
	Acetato de isoamila	x	13,3	122,8		48,2	
	Éster	Dodecanoato de etila		2,3			
Hexanoato de etila		x	2,2			2,7	
Octanoato de etila			54,3				
Propanoato de etila			63,7	301,5			
Propanoato de isoamila			4,4				
2-careno		x			9,7		
3-careno		x			4585,6		
α-copaeno		x			4414,2		
α-guaieno		x			271,9		
Alloaromadendreno		x			4443,6		
Aromandendreno		x			661,7		
Terpeno		β-ocimeno	x			1339,6	
		Cadineno	x			550,7	
	Cariofileno	x	1,8	4,3	25671,8	3,1	
	δ-selineno	x			622,2		
	Eucaliptol	x			2028,3		
	Humuleno	x			5335,4		
	Limoneno	x			10604,4		

	α -Selineno	x		3193,3	
	β -Selineno	x		3222,5	
	Acetoína				3,9
Outros	Dimetilamina	x	217,4	57,4	
	Naftaleno		12,5		
TOTAL		22	12	14	19

Os experimentos realizados utilizando a cepa LAF45 apresentaram mais compostos voláteis (19) quando utilizou a técnica de *Purge and Trap* para o produto fermentado obtido no meio contendo resíduo em coluna apolar. Essa técnica capturou mais compostos (14) quando comparada com a técnica de MEFS, que capturou apenas 12 compostos. No entanto, vale salientar que a técnica de MEFS foi mais eficiente para detecção de ésteres capturando 8 compostos contra 6 capturados pela técnica de *Purge and Trap*.

Os produtos fermentados obtidos pelo uso do meio sintético apresentou menor concentração dos compostos quando comparados com os resultados obtidos dos produtos fermentados obtido pelo uso do resíduo de goiaba, exceto o acetato de etila que teve 4,3 Mol/L enquanto o produto fermentado obtido no meio contendo resíduo apresentou 0,3 Mol/L desse composto.

Os resultados obtidos dos produtos fermentados contendo resíduo de goiaba utilizando a técnica de *Purge and Trap* separados em coluna apolar apresentou os melhores resultados em termos de concentração dos compostos como também na quantidade dos mesmos.

Os compostos voláteis obtidos dos produtos fermentados obtido pelo uso da cepa LAF3 estão descritos na Tabela 19. Foram identificados 14 compostos voláteis totais em todos os experimentos, sendo o acetato de etila foi o único composto comum, com a maior concentração (21,9 Mol/L) obtida para essa cepa. Este composto apresenta aroma de maçã, estando de acordo com o aroma percebido na análise sensorial apenas para essa cepa.

Avaliando as duas técnicas de captura de voláteis utilizadas (MEFS e *Purge and Trap*) percebe-se que a técnica de MEFS conseguiu capturar mais compostos e com concentração superior, e a maioria deles foi da classe dos ésteres. Este comportamento foi percebido apenas para essa cepa e para cepa LAF9.

O produto fermentado obtido pelo uso do resíduo agroindustrial de maracujá apresentou 7 compostos voláteis enquanto em meio sintético o número total de compostos foi apenas 5. A principal diferença consistiu na presença do ácido acético no meio contendo resíduo de maracujá, o que justifica o aroma cítrico percebido pelo painel sensorial apenas no meio contendo resíduo.

Os resultados obtidos pelo uso da cepa LAF3 em meio contendo resíduo agroindustrial de goiaba utilizando coluna apolar e polar não apresentaram diferença no número de compostos

voláteis (7) separados. No entanto, os compostos separados utilizando a coluna polar apresentaram maior concentração.

Tabela 19: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF3 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo de maracujá)	Cepa LAF3 Técnica de Captura de Voláteis/coluna			
			MEFS/ apolar	PT/ apolar	PT/ apolar	PT/ polar
		Meio Sintético		Meio Resíduo		
		Concentração (µMol/L)				
Ácido	Ácido acético	x			141,1	
	1-pentanol				3,4	6572,8
Álcool	2-FE		4,5			
	2-metil 1-propanol				4,4	528,6
	3-metil butanol		337,3	8,5		
	Butanol					4377,5
Aldeído	Etanol	x	5424,3	13,2	277,1	
	Acetaldeido			878,1	90,0	
	2-FEA		8,8			
Éster	Acetato de etila	x	6588,3	19,8	2,2	21966,2
	Acetato de isoamila		129,6			
	Butanoato de etila		217,5		11,2	8785,1
	Hexanoato de etila	x				1315,9
	Propanoato de etila		437,2	23,5		2194,6
TOTAL		4	8	5	7	7

Na Tabela 20 estão apresentados os 21 compostos voláteis identificados dos produtos fermentados obtidos da cepa isolada de maracujá LAF5. As principais classes de compostos obtidas foram os alcoóis e ésteres. O único composto comum a todos os experimentos foi o 2-FE, um álcool que possui aroma agradável.

Os compostos voláteis dos produtos fermentados obtido pelo uso da cepa LAF5 foi mais eficiente quando utilizou-se a técnica de *Purge and Trap*, detectando 9 compostos quando comparada com a técnica de MEFS, com apenas 7 compostos. Além disso, as concentrações dos compostos foram maiores utilizando a técnica de *Purge and Trap*. Outro aspecto foi que a técnica de MEFS demonstrou não ser eficiente para a captura de alcoóis, da mesma forma que foi percebido anteriormente nos outros produtos fermentados.

Contrariamente aos resultados obtidos pelas outras cepas, os produtos fermentados obtidos utilizando a cepa LAF5 apresentou maior concentração em meio sintético do que em meio contendo resíduo de maracujá. Ao se comparar os resultados obtidos em colunas cromatográficas diferentes não verifica-se diferenças quantitativas dos compostos separados. No entanto as maiores concentrações obtidas foram maiores na coluna apolar.

Tabela 20: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF5 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo de maracujá)	Cepa LAF5			
			Técnica de MEFS/ apolar	Captura de Voláteis/cóluna PT/ apolar		PT/ polar
			Meio			
			Sintético	Resíduo		
			Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)			
Ácido	Ácido acético	x				29,9
	1-pentanol		4,1	8785,1	437,2	
	2-FE		49,4	63,7	77,1	13,3
Álcool	2-metil 1-propanol				417,5	
	3-metil butanol			1315,9		
	Butanol			1535,6		
	Etanol	x	41,7	4391,5		29,4
	Hexanol	x				33,6
Aldeído	Benzaldeido	x			28,9	
Aromático	Naftaleno			41,7		
	2-FEA		55,8	437,2		44,9
	Acetato de etila	x	107,3		656,9	25,4
Éster	Acetato de isoamila			437,2	19,8	
	Butanoato de etila			217,5	4,4	
	Hexanoato de etila	x	61,8			
	Hexanoato de metila				41,7	
	Propanoato de etila		88,1			
Terpeno	α -pineno					12,9
	β -ocimeno					4,7
	δ -limoneno				22,8	28,0
TOTAL		7	7	9	9	9

A Tabela 21 apresenta os compostos voláteis dos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF35. Foram identificados 21 compostos voláteis, onde os ésteres e os alcoóis foram as principais classes, destacando-se o 2-metil propanol e o acetato de etila.

Os resultados obtidos utilizando a técnica de *Purge and Trap* demonstrou ser mais eficiente apresentando maior concentração e número dos compostos voláteis quando comparada com a técnica de MEFS.

Os produtos fermentados utilizando meio sintético apresentaram menor número de compostos voláteis. No entanto, a concentração dos mesmos foi superior aos produtos fermentados utilizando resíduo de maracujá.

Os produtos fermentados separados em coluna apolar apresentaram 15 compostos voláteis enquanto em coluna polar apenas 11. No entanto, a concentração dos compostos obtidos foi superior na coluna polar.

Tabela 21: Compostos voláteis presente nos produtos fermentados obtidos pelo uso da cepa LAF35 isoladas de maracujá em meio sintético e meio contendo resíduo de maracujá utilizando a técnica de MEFS e *Purge and Trap*

Classe	Composto	Controle abiótico (glicose + extrato de levedura + resíduo de maracujá)	Cepa LAF35			
			Técnica de MEFS/ apolar	Captura de Voláteis/coluna		
			Meio			
			Sintético	Resíduo		
			Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)			
	1-pentanol		437,2	6588,3		129,6
	2-FE		42,2	63,7	5,0	
	2-metil 1-propanol			4391,5	195,5	
	3-metil butanol				4,4	107,6
Álcool	4-penten-1-ol				1,1	
	Butanol			437,2	2,2	41,7
	Etanol	x	63,7			4389,1
	Hexanol				1,5	
	Linalool				2,0	
Aldeído	Acetaldeido		4,4		173,6	
	Benzaldeido	x				2,2
Aromático	Naftaleno			63,7	22,0	20,7
	2-FEA			13,2	11,8	60,2
	Acetato de etila	x		2194,6	217,5	211,8
Éster	Acetato de isoamila			41,7	15,4	61,6
	Hexanoato de etila	x	107,6		19,0	
	Hexanoato de metila			19,8		
	Propanoato de etila			217,5		
Terpeno	3-careno				32,3	
	α -pineno					22,4
	δ -limoneno			19,8	47,1	11,5
TOTAL		4	5	11	15	11

Os produtos fermentados com microrganismos isolados dos frutos de goiaba apresentaram mais compostos voláteis (48) quando comparado com os produtos fermentados obtidos com os microrganismos isolados de maracujá (26). Dentre todos os experimentos, aquele que utilizou a técnica de *Purge and Trap*, com a coluna apolar foi o que mais apresentou compostos voláteis (LAF9: 18; LAF14: 29 e LAF45: 19; LAF3: 7; LAF5:9; LAF35: 15). Ademais, os produtos fermentados analisados em coluna apolar utilizando a técnica de *Purge and Trap* em meio contendo resíduo apresentaram mais compostos voláteis do que quando utilizou o meio sintético. É possível observar que para esses mesmos experimentos a intensidade de alguns

compostos voláteis (etanol, 2-FE e β -cariofileno) foi maior para os produtos fermentados que utilizaram meio contendo resíduo de goiaba, onde o etanol em meio sintético teve concentração de 13,7; 0,48 e 0,28 Mol/L, pela utilização cepas isoladas de goiaba LAF 9, LAF14 e LAF45, respectivamente enquanto em meio com resíduo de goiaba os valores foram 105,5; 2,8 e 10,2 Mol/L, respectivamente. O 2-FE em meio sintético teve concentração de 2,6; 0,07 0,001 e enquanto em meio com resíduo de goiaba 1,2; 1,0 e 2,2 Mol/L, β -cariofileno em meio sintético teve concentração de 0,2; 0,01 e 0,004 Mol/L, respectivamente, enquanto em meio com resíduo de goiaba os valores foram 23,0; 19,7 e 25,7 Mol/L, respectivamente. Para os compostos pentanol, 2-FEA e acetato de etila esse aumento ocorreu apenas no meio utilizando a cepa LAF14. Esse comportamento reforça que a presença do meio contendo resíduo de goiaba contribui na maior formação de compostos voláteis de aroma de interesse. Entretanto, no meio contendo resíduo de maracujá esse comportamento foi detectado apenas para o etanol na cepa LAF3.

A intensidade dos álcoois etanol e pentanol foi maior utilizando a técnica de *Purge and Trap* quando comparada com os resultados obtidos utilizando a MEFS para todos os produtos fermentados, independente da cepa. Isto pode ser explicado pela limitação que a técnica de MEFS caracteriza na análise de alguns álcoois, como por exemplo, o etanol, como apresentado por Povolo & Cantarini (2003) em estudo comparativo entre essas técnicas para compostos voláteis de manteiga. É possível observar que os produtos fermentados a partir das cepas LAF35, LAF14, LAF, 5, LAF45 apresentaram maior número de picos, utilizando a técnica de *Purge and Trap*, independente da coluna ou meio utilizado.

Um dos principais compostos identificados nas cepas isoladas de goiaba foi o β -cariofileno com as concentrações de 23,0; 19,7 e 25,7 Mol/L para as cepas LAF9, LAF14 e LAF45, respectivamente. No entanto, o etanol, para a cepa LAF9, apresentou uma concentração superior a 105,5 Mol/L. Uma maior presença de ésteres pode ser verificada nos produtos fermentados obtidos pelo uso das cepas LAF9 e LAF14, quando comparado com o produto obtido pelo uso da cepa LAF45. Este comportamento pode ser correlacionado com os resultados da análise sensorial, quando estas cepas obtiveram maiores médias no atributo floral, quando comparado com a cepa LAF45, uma vez que os ésteres são reconhecidos por possuírem notas aromáticas de característica floral.

Para as cepas isoladas de maracujá o composto volátil com maior concentração foi o 1-pentanol, com as concentrações de 6,6; 8,8 e 6,6 Mol/L, para as cepas LAF3, LAF5 e LAF35, respectivamente. Vale resaltar a presença significativa do acetato de etila na cepa LAF3 em uma concentração de 21,9 Mol/L. A presença significativa desses compostos pode ser correlacionada com a análise sensorial dessas cepas isoladas de maracujá que apresentaram notas elevadas para os atributos doce e frutal.

É importante destacar que nos produtos fermentados obtidos pelo uso do meio sintético com as cepas isoladas de goiaba (LAF9, LAF14 e LAF45), o único composto volátil terpênico presente foi o β -cariofileno, sendo detectada sua presença em todos os produtos fermentados utilizando microrganismos isolados de frutos de goiaba, inclusive no meio com resíduo de goiaba. A cepa LAF9 em meio sintético foi a que apresentou maior concentração desse composto comparado com as outras cepas isoladas de goiaba (LAF14 e LAF45). Pode-se salientar que β -cariofileno é um composto naturalmente presente na polpa de goiaba, como também no resíduo. Sua presença no produto fermentado com meio sintético, que contém no meio apenas glicose e extrato de levedura, reflete que esse terpeno foi produzido pelo próprio microrganismo.

2.3.4.4 Acompanhamento de pH e °Brix

Os processos fermentativos dos microrganismos isolados selecionados foram acompanhados durante 4 dias. As Figuras 24 e 25 demonstram a variação de pH das linhagens selecionadas isoladas de maracujá (LAF3RES, LAF3MS, LAF5RES, LAF5MS, LAF35RES e LAF35MS) e goiaba (LAF9RES, LAF9MS, LAF14RES, LAF14MS, LAF45RES E LAF45MS) nos produtos fermentados em meio contendo resíduo da fruta correspondente e no meio sintético, respectivamente. Os pHs inicial dos produtos fermentados das cepas isoladas de goiaba (4,7 a 5,3) foram superiores ao pH dos produtos fermentados das cepas isoladas de maracujá (4,2 a 5). É possível perceber também que, para o pH da maioria dos microrganismos isolados e fermentados tem comportamento similar sendo um declínio do pH durante a fermentação. Esse fato pode ser explicado pela relação entre a formação de compostos ácidos e de íons de hidrogênio associados ao crescimento microbiano (Starzack et al.,1994).

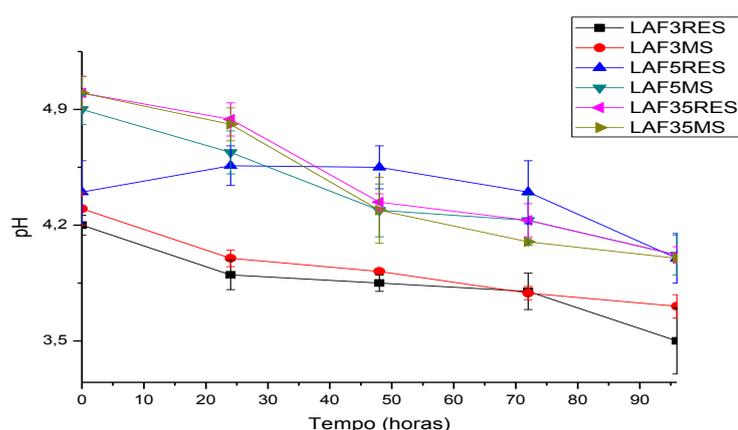


Figura 24: Acompanhamento do pH durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de maracujá

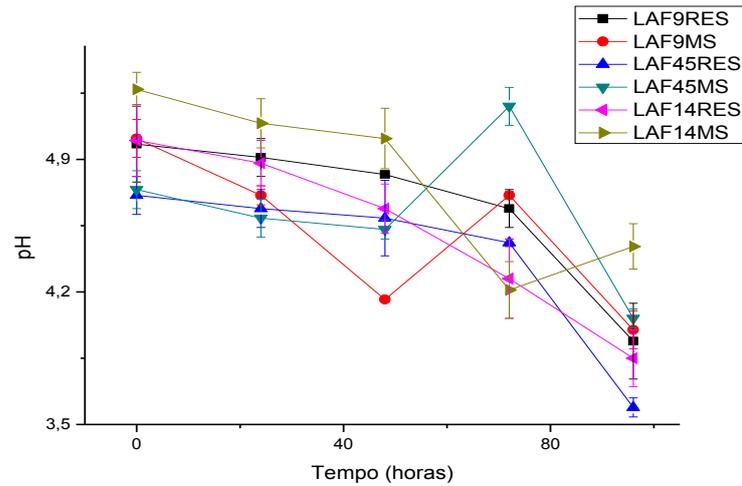


Figura 25: Acompanhamento do pH durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de goiaba

As Figuras 26 e 27 apresentam os valores de sólidos solúveis obtidos nos produtos fermentados obtidos dos microrganismos isolados de maracujá e goiaba. Os valores para os produtos fermentados de cepas isoladas de maracujá tiveram valor máximo de 2°Brix e reduziram cerca de 50% seu valor durante a fermentação enquanto nos produtos fermentados de cepas isoladas de goiaba o valor inicial foi 5.3°Brix reduziram cerca de 20%.

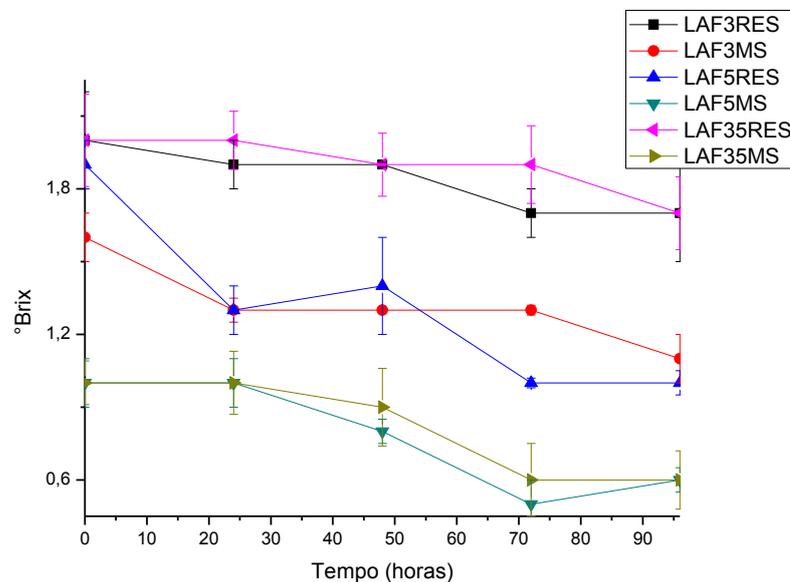


Figura 26: Acompanhamento do °Brix durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de maracujá

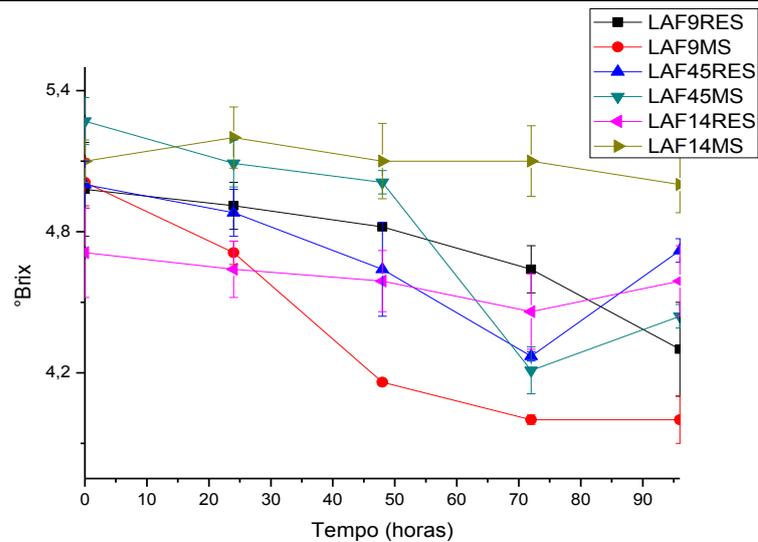


Figura 27: Acompanhamento do °Brix durante as 96h de fermentação das cepas isoladas de goiaba

O uso de microrganismos como produtores de substâncias químicas de elevado valor agregado pode contribuir imensamente para o desenvolvimento da área de aromas. O estudo de leveduras produtoras de aroma consiste numa alternativa promissora e viável no desenvolvimento de novas rotas de baixo custo. Aromas são substâncias extremamente importantes na indústria de alimentos. Assim sendo, as pesquisas devem continuar no sentido de elucidar quais as condições que possibilitem a máxima produção desses compostos, além de métodos que permitam a separação e purificação desses compostos.

2.3.5 Seleção do microrganismo promissor produtor de aromas frutais

Além das cepas isoladas a partir de diversas frutas (goiaba, maracujá e umbu), discutido no item anterior (2.3.4), foram realizados experimentos para avaliar o uso das cepas de *Aspergillus niger*, *K. marxianus* e *K. lactis* com base na capacidade de produção de aromas frutais/floral/agradáveis. Os mesmos foram fermentados em meio sintético (1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura) e analisados sensorialmente quanto ao aroma característico e a intensidade de produção a cada 24h, durante 96 horas de crescimento.

A Figura 28 mostra a associação entre as estirpes e a intensidade dos aromas sensorialmente encontrados. Os três microrganismos avaliados são reconhecidos como produtores de aromas (Jiang, 1995; Medeiros et al., 2000; Longo & Sanromán, 2006). No entanto, pretendia-se verificar dentre eles algum que tivesse destaque como produtor de aroma frutal/agradável e nesse aspecto a *Kluyveromyces lactis* foi a que apresentou o aroma mais intenso, atingindo seu máximo em 48h de fermentação, com decréscimo após esse tempo. Os

demais microrganismos também demonstraram comportamento similar, porém a intensidade do aroma foi menos pronunciada.

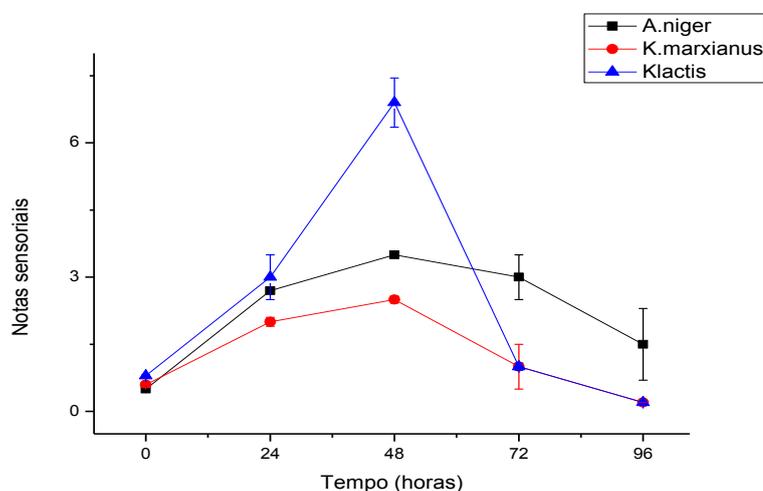


Figura 28: Intensidade do aroma frutal ao longo da fermentação utilizando diversos microrganismos

2.3.6 Seleção do resíduo agroindustrial com potencial para a bioprodução de aroma frutal/floral

Em virtude da composição dos resíduos terem contido baixo teor de açúcares redutores e de proteínas, o meio de cultivo foi suplementado com adição de glicose e extrato de levedura para favorecer o crescimento microbiano.

Para a seleção do resíduo promissor realizou-se a fermentação submersa utilizando a *Kluyveromyces lactis* em diversos resíduos (goiaba, maracujá e umbu) como substrato. Os produtos fermentados foram analisados sensorialmente quanto à produção de aromas a cada 24h durante 4 dias. Os resultados obtidos pela análise sensorial mostraram que os resíduos de goiaba e maracujá produziram aroma frutal/floral/agradável mais intenso quando comparado com o uso do resíduo de umbu (Figura 29). De uma maneira geral, verificou-se que as maiores notas foram obtidas entre 24-48h de fermentação e após esse tempo os provadores perceberam o odor de fermentado para todos os experimentos. As principais descrições de aroma para os produtos fermentados foram:

- a) Resíduo de goiaba: frutal, mel, fruta verde, ameixa, goiabada, banana, fermento e álcool;
- b) Resíduo de maracujá: doce, agradável, verde, fermentado;
- c) Resíduo de umbu: verde, suave, seco, fermentado.

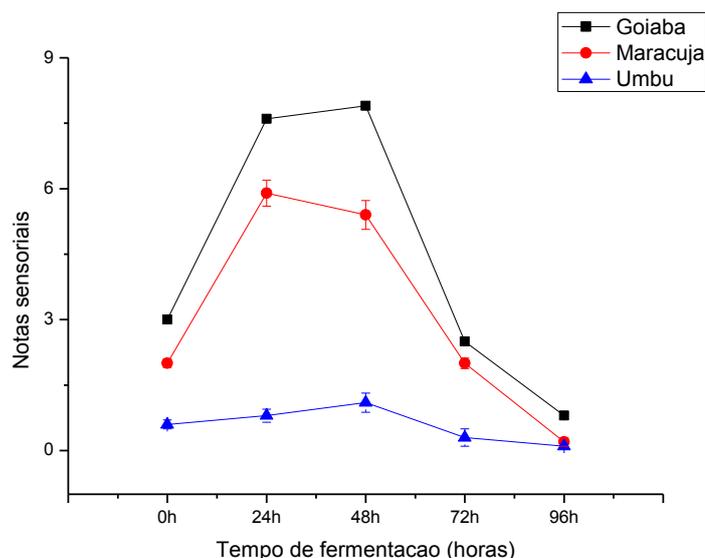


Figura 29: Intensidade do aroma frutal nos diferentes resíduos durante 96h

Em virtude dos resultados obtidos na análise sensorial e no qual o produto fermentado com resíduo de goiaba obtido com a *K. lactis* apresentou maior intensidade de aroma frutal/floral/agradável, este foi selecionado para a realização dos experimentos finais pela análise de cromatografia gasosa como também o acompanhamento da produção de compostos voláteis, consumo de substrato (açúcares), sólidos solúveis e pH.

2.3.6.1 Análise dos compostos voláteis

O aroma de produtos fermentados é geralmente obtido a partir da ação dos microrganismos sobre o substrato (Sumbly et al., 2010). Zhang et al. (2011) afirmam que alcoóis, ésteres e ácidos são compostos aromáticos primários formados durante o processo de fermentação alcoólica.

Utilizando a técnica de MEFS com o revestimento PDMS/DVB foi possível separar 43 compostos voláteis no produto fermentado de resíduo de goiaba com a *Kluyveromyces lactis*, dentre eles 21 foram identificados. Na Tabela 22 e Figura 30 estão apresentadas os compostos voláteis identificados com as suas áreas médias encontradas no produto fermentado com 48h de fermentação.

Tabela 22: Compostos voláteis identificados nos produtos fermentados pelo uso de resíduo de goiaba

#	Composto	TR ^a	IR ^a	IR liter.	Área (%)	Descrição do aroma ^{b,c,d}	Preço estimado (US\$) ^e
1	Limoneno	7.138	1104	1188	0,69	Cítrico, ácido	252/L
2	β -pineno	7.645	1115	1073	0,97	Pinho, herval	1158/L
3	3-Metil butanol	7.905	1129	1169	3,31	Frutal, malte, queimado	191/kg
4	3-Metilbenzil álcool	10.068	1379		0,27	Agradável, doce, rosas	312/Kg
5	α -Cubebeno	12.609	1425	1433	1,30	Erva	
6	β-Cariofileno	15.423	1542	1550	22,86	Amadeirado-picante, seco	482/kg
7	Bergamoteno	15.688	1549	1556	3,27	Madeira, erva	
8	β -Elemeno	15.912	1560	1573	1,11	Floral, herval	
9	α -Guaieno	16.789	1588	1600	0,34	Molhada, apimentado, balsâmico	773/kg
10	γ -Humuleno	17.519	1602	1617	5,77	Madeira, terra, erva	258,5/kg
12	γ -Elemeno	18.140	1611	1619	0,45	Floral	
13	Aromandendreno	18.780	1620	1627	0,43	Madeira	194/ml
14	Humuleno	19.000	1649	1640	4,63	Madeira, terra, erva	1292/kg
15	Bisaboleno	19.178	1669	1680	5,19	Agradável, quente, doce-picante	7000/kg
16	α -Muuroleno	19.252	1681	1688	0,42	Verde, madeira	
17	β -bisaboleno	19.454	1694	1715	0,51	Agradável, quente, doce-picante	776/kg
18	γ -Cadineno	20.303	1727	1716	1,96	Leve, madeira-molhada, ligeiramente alcatrão	800/kg
19	Acetato de 2-fenetil	22.321	1753	1760	16,40	rosas, mel, maçã, doce	5582/kg
21	2-Feniletanol	25.383	1859	1856	1,37	rosas, doce, perfume	4725/kg
23	Óxido de cariofileno	27.230	1891	1884	1,75	Doce, fresco, amadeirado, seco, picante	427/kg
24	Globulol	28.418	2021	1993	1,07	Doce, rosas	100/kg

^aÍndice de retenção; ^bMeilgaard (1975); ^cAcree & Arn (2013); ^dArctander (1969)

^eFonte: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1465701.html>

^fNão identificado

Dentre os compostos identificados destacou-se a presença de β -cariofileno, 2-feniletil acetato, γ -humuleno, bisaboleno, humuleno, 3-metil butanol, bergamoteno, γ -cadineno, óxido de cariofileno, 2-feniletanol, β -pineno, limoneno. Dentre esses compostos, o β -cariofileno, bisaboleno, humuleno e o limoneno são encontrados naturalmente nos frutos de goiaba (Soares et al., 2007), enquanto os demais compostos foram obtidos a partir do processo biotecnológico.

Os acetatos e etil ésteres são os maiores responsáveis pelo aroma frutais e florais (Lee et al., 2010), e o composto acetato de 2-feniletil foi um dos compostos majoritários dessa pesquisa. Os autores afirmam ainda que baixos níveis de 2-feniletanol (em conjunto com a acetil-CoA) sintetizam o acetato de 2-feniletil em conjunto com acetiltransferase. Uma vez que, as leveduras convertem álcoois em seus acetatos correspondentes, com um alto rendimento (mais de 90 % para 3-metil-butilacetato) (Gatfield, 1988; Welsh, 1995).

Os alcoóis identificados produzidos na fermentação foram 3-metil butanol (3,3%), 3-metil benzilálcool (0,3%), 2-feniletanol (1,4%) e globulol (1,1%). O 3-metil-butanol e o 2-feniletanol (álcool isoamílico), são da família dos chamados álcoois superiores, que são oriundos do metabolismo de aminoácidos ou açúcares durante a fermentação alcoólica (Zhang et al., 2011).

De maneira geral, os compostos β -cariofileno e γ -humuleno foram encontrados em quantidades significativas no produto fermentado de resíduo de goiaba. Esses compostos são reconhecidos por terem propriedades antibacterianas (Oliveira et al., 2010).

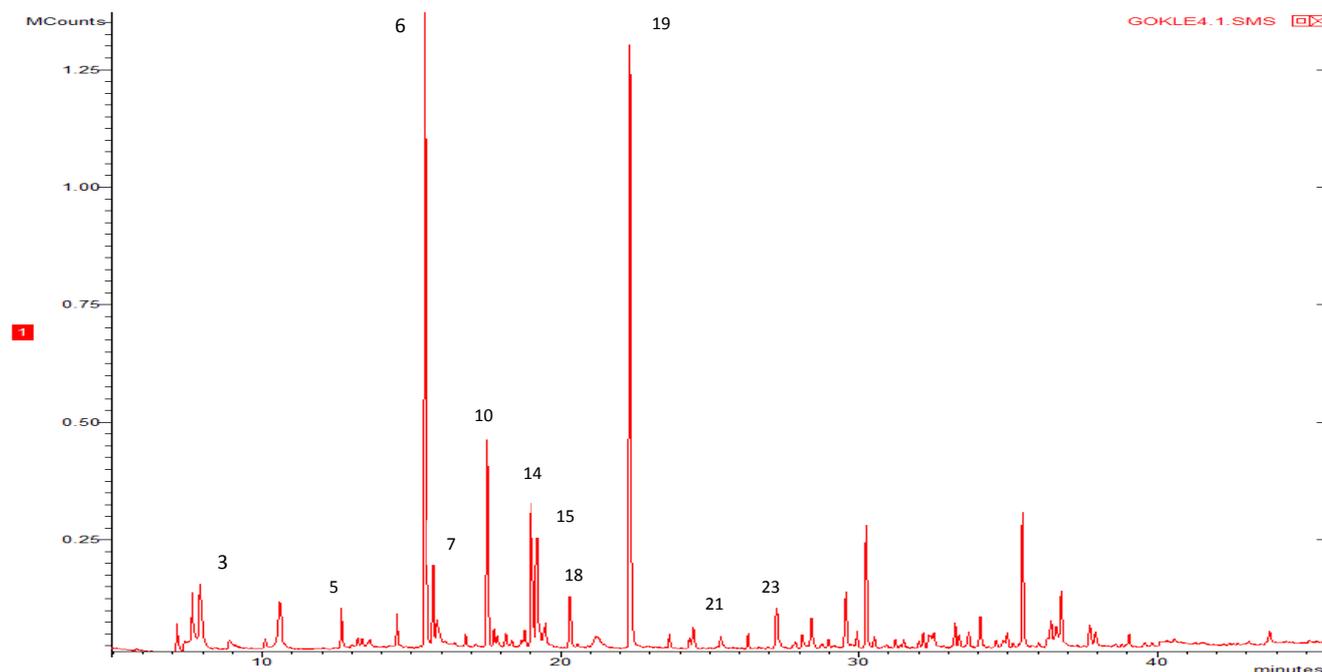


Figura 30: Cromatograma dos íons totais do produto fermentado do resíduo de goiaba obtido após 48h de fermentação (os números representam o composto correspondente da Tabela 21)

Na literatura consultada há poucos relatos sobre a utilização de resíduos de frutas para a produção de aromas. Alguns trabalhos reportados na literatura citam o uso de bagaço de maçã (Bramorski et al., 1998; Christen et al., 2000; Medeiros et al., 2000); casca de coco verde (Ramos

et al., 2008), resíduo de citrus (Rossi et al., 2009; Aggelopoulos et al., 2014; Paraskevopoulou & Mantzouridou, 2014), resíduo de acerola, graviola e mangaba (Leal, 2012). Estudos que realizam análise sensorial de produtos fermentados também são quase inexistentes. Uenojo & Pastore (2006) realizaram análise sensorial de microrganismos isolados de frutas e os provadores descreveram os aromas dos produtos fermentados como de frutal, doce, floral, fermento, ácido, solvente, semelhantes às descrições observadas neste estudo. Os autores relataram que estão realizando pesquisas preliminares com esses microrganismos isolados em meios contendo resíduos agroindustriais (casca de café, bagaço de uva, laranja e limão), no entanto, ainda não foram divulgados os resultados citando apenas que os mesmos foram capazes de produzir aromas frutais.

Pinotti *et al.* (2006) verificaram por análise sensorial a produção de aroma frutal por *Geotrichum candidum* em meio sintético. Deetae et al. (2011) verificaram a produção de compostos de aroma por *Proteus vulgaris* através de análise cromatográfica e análise sensorial realizada com 33 painelistas não treinados quanto à diferença de intensidade de compostos produzidos com e sem agitação. Neste trabalho foi relatado pelos painelistas que no processo sob agitação foi detectado aroma frutal, compostos sulfurados e nota de galinha grelhada. Medeiros *et al.* (2000) utilizaram cinco resíduos agroindustriais para a produção de compostos de aroma. Os resíduos que apresentaram aroma frutal mais intenso foram o de palma e de mandioca, enquanto a semente de girassol produziu aroma suave. Os resíduos de maçã e cana-de-açúcar não produziram nenhum aroma notável.

2.3.6.2 Monitoramento da produção dos compostos voláteis de aroma durante a fermentação

O acompanhamento da produção dos compostos voláteis (representada pela área de pico cromatográfico) foi realizado retirando-se alíquotas a cada 24 h de fermentação durante o período total de 96h (Figura 31). A produção dos compostos voláteis foi bastante rápida, e na maioria dos casos, essa produção aconteceu a partir do primeiro dia de fermentação e teve o seu máximo entre 24-72h de fermentação.

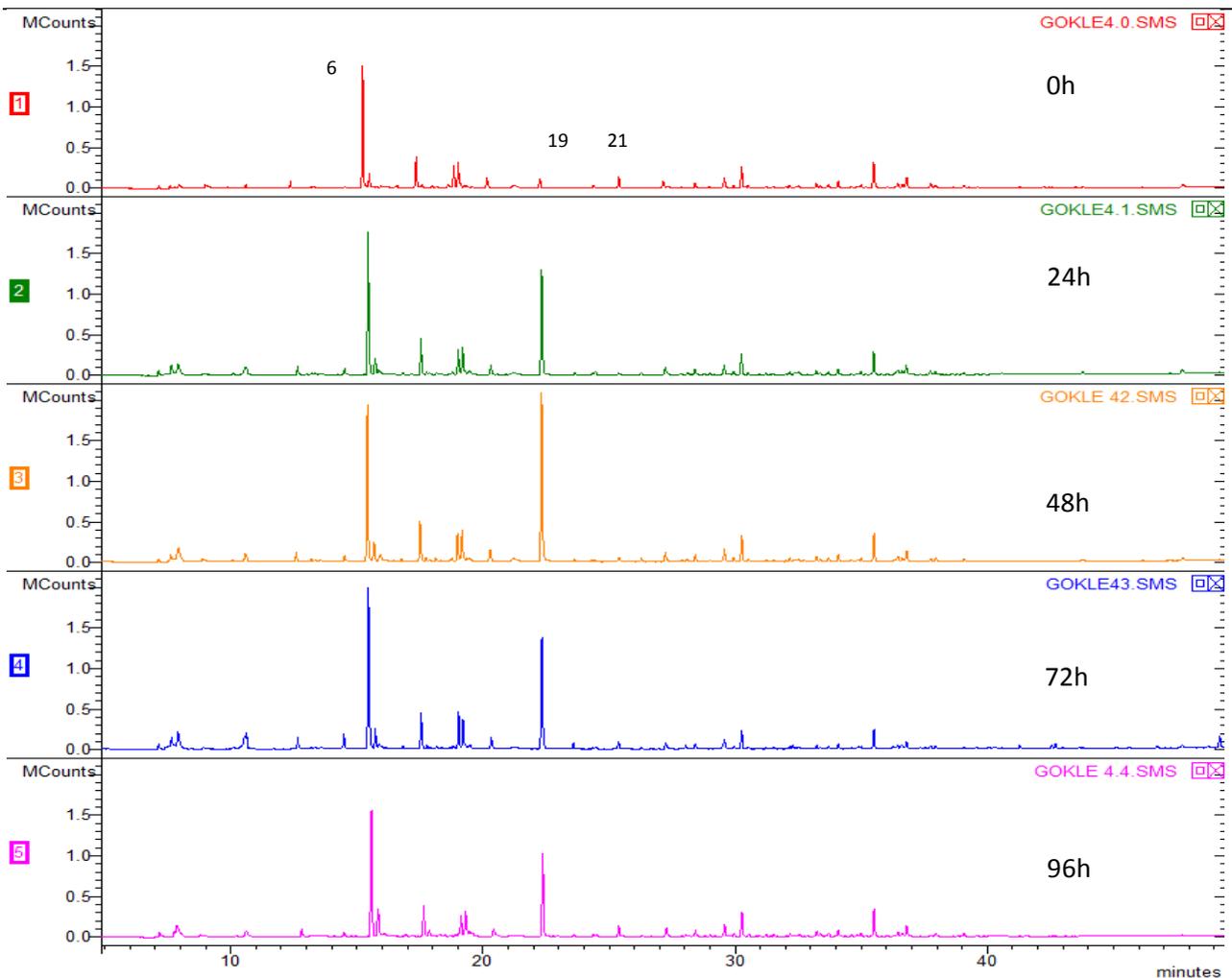


Figura 31: Cromatograma dos íons totais na análise de compostos voláteis dos produtos fermentados do resíduo de goiaba até 4 dias de fermentação (os números representam o composto correspondente da Tabela 21).

Os compostos, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletil, os quais são caracterizados por aromas de rosas e maçã, respectivamente, são de grande valor comercial (US\$4.725/kg e US\$5.582/kg, respectivamente). Estes são de enorme importância na indústria de alimentos e são considerados status GRAS (*Generally Regarded As Safe*). O acetato de 2-feniletil foi o composto que apresentou o aumento mais significativo durante a fermentação. Os outros compostos tiveram comportamento semelhante. A maior produção deste composto (maior área de pico cromatográfico) foi obtida a partir 24 h de fermentação sendo a produção máxima obtida em 48 h de fermentação como demonstrado na Figura 36. Esse mesmo comportamento foi relatado por Christen et al. (2000) avaliando a produção de compostos voláteis produzidas por *Rhizopus* utilizando bagaço de mandioca e maçã. Não há registros na literatura da produção destes compostos de aroma por *Kluyveromyces lactis* utilizando meio de cultivo contendo resíduo de goiaba. O único registro encontrado foi a pesquisa de Damasceno et al. (2003), os

quais identificaram o composto 2-feniletanol produzido por *Geotrichum fragrans* usando manipueira como substrato.

O acompanhamento dos compostos voláteis durante a fermentação é investigada pelos diversos pesquisadores. Malloucos et al. (2002) investigaram a evolução dos compostos voláteis durante a fermentação alcoólica de mosto de uva utilizando MEFS. Lee et al. (2010) acompanharam os compostos voláteis formados durante a fermentação de suco de mamão.

A produção de 2-FEA (Figura 32) aumentou rapidamente após a inoculação, tendo seu máximo em 48h de fermentação, seguido por um decréscimo até 96h. Já a produção de 2-FE diminuiu nas primeiras 24h de fermentação, provavelmente devido a formação do seu éster correspondente (2-FEA), o qual é produto do metabolismo das leveduras pela via de Erlich (Lee et al., 2010; Zhang et al., 2011). Em seguida, houve o aumento da produção do composto sendo o máximo em 72h de fermentação.

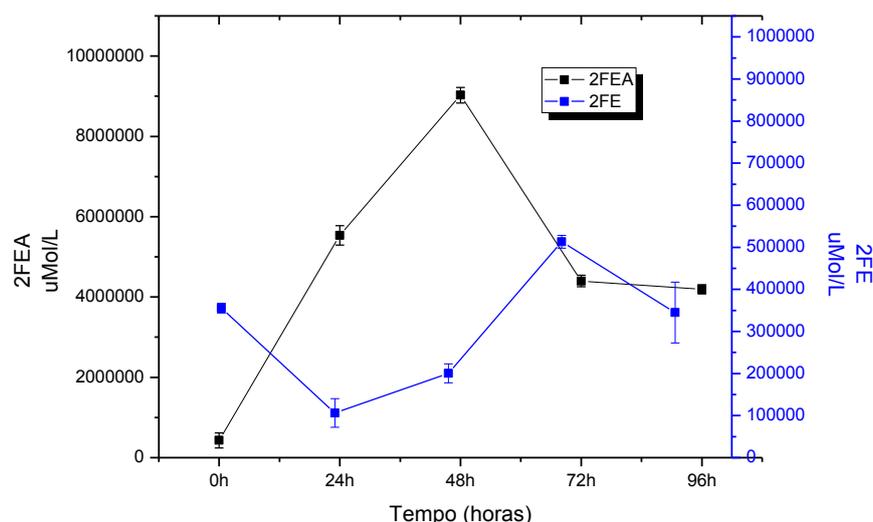


Figura 32: Quantificação dos compostos 2-FEA e 2-FE produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.

A formação e a diminuição de vários alcoóis provavelmente é resultado da sua origem. Os alcoóis são sintetizados de cetoácidos resultantes da desaminação oxidativa de um aminoácido ou ácido graxo (Zhang et al., 2011). Os alcoóis (Figura 33) 3-metilbutanol e feniletanol são sintetizados a partir da leucina e fenilalanina, via seus cetoácidos, isovalerato e fenilpiruvato, onde sua produção depende do crescimento celular (Zhang et al., 2011). Entretanto, o nerolidol e globulol apresentaram uma produção lenta no início do período fermentativo, o 3-metilbutanol teve um aumento bastante elevado após a inoculação. Esses resultados foram de acordo com os reportados anteriormente (Mauricio et al., 1997; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2011).

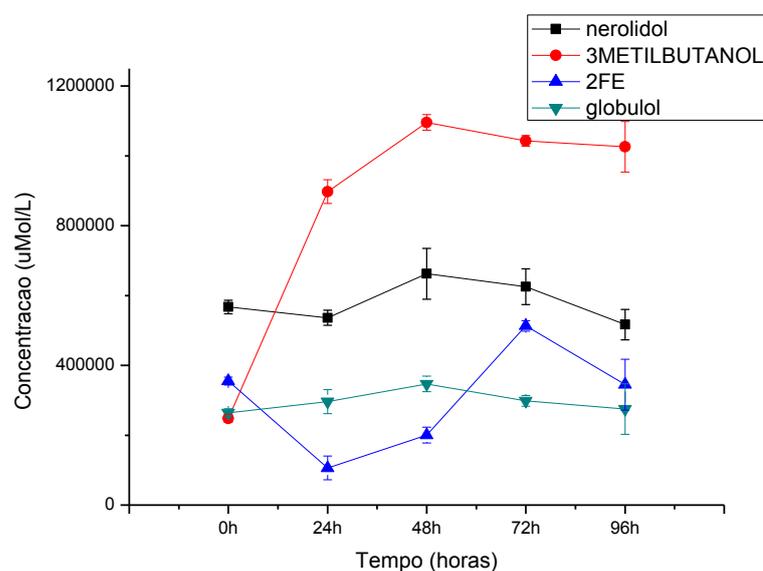


Figura 33: Quantificação dos alcoóis produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.

Durante o processo de fermentação alcoólica, não apenas alcoóis e ésteres são sintetizados, mas algumas mudanças ocorrem com os terpenos, os quais naturalmente estão presentes no resíduo da goiaba. Como mostrado na Figura 34, durante a fermentação os níveis de 7 terpenos seguiram um padrão semelhante de produção, aumentando após a inoculação, subindo até sua maior concentração com 48h de fermentação, seguido de um decréscimo (72h) e um novo aumento. Esse comportamento pode ser provavelmente porque a maioria dos monoterpenos encontra-se ligada a porções de açúcar e eles poderiam ser liberados por ácidos ou glicosidases encontrados no meio e levedura, o que eventualmente leva a um aumento na concentração destes compostos (Rapp, 1998). Dentre os terpenos, o β -cariofileno foi encontrado em maior concentração, seguido pelo γ -humuleno. Os compostos α -cubebeno, óxido de cariofileno e γ -cadineno também estavam presentes em menores concentrações.

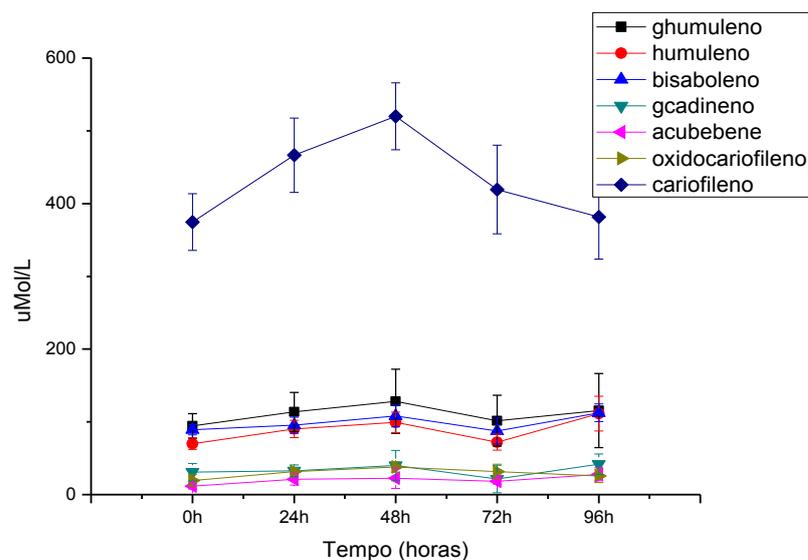


Figura 34: Quantificação dos principais terpenos produzidos nos produtos fermentados do resíduo de goiaba durante o decorrer de fermentação até 4 dias.

2.3.6.3 Análises de compostos não voláteis

Os dados sobre o consumo de substrato e as variações no pH e °Brix ao longo do processo fermentativo estão demonstrados na Figura 35. O consumo de ART pelo microrganismo (fonte de carbono) reduziu drasticamente a partir do primeiro dia de fermentação. Em apenas 48h o consumo de substrato atingiu cerca de 90%. Com relação ao teor de sólidos solúveis verificou-se um decréscimo nas primeiras 24h, o qual se estabilizou no valor de 1,5 °Brix, correspondendo ao rápido consumo de açúcar no meio. Apesar do consumo quase total de açúcares ter sido em 24 h, a produção máxima da maioria dos compostos voláteis foi obtida em 48h de fermentação, provavelmente para a formação destes compostos a levedura utilizou outros nutrientes do meio, como aminoácidos.

Starzak et al. (1994) afirmam que à medida que os açúcares vão sendo consumidos, os níveis de pH diminui, devido a formação de íons hidrogênio que está associada ao crescimento microbiano. Os valores de pH oscilaram entre 5 a 4. O pH inicial foi 5,0, diminuindo para 4,0 nas primeiras 24h, mantendo-se constante até o final da fermentação.

A redução nos teores de açúcares totais, ilustrada na Figura 35, ocorreu, de forma mais considerável, no terceiro dia da fermentação, o que é explicável, já que é durante as primeiras horas do processo que ocorre um rápido consumo dos açúcares pelas leveduras. Apesar do consumo quase total de açúcares ter sido em 24 h, a produção máxima da maioria dos compostos voláteis foi obtida em 48 h de fermentação.

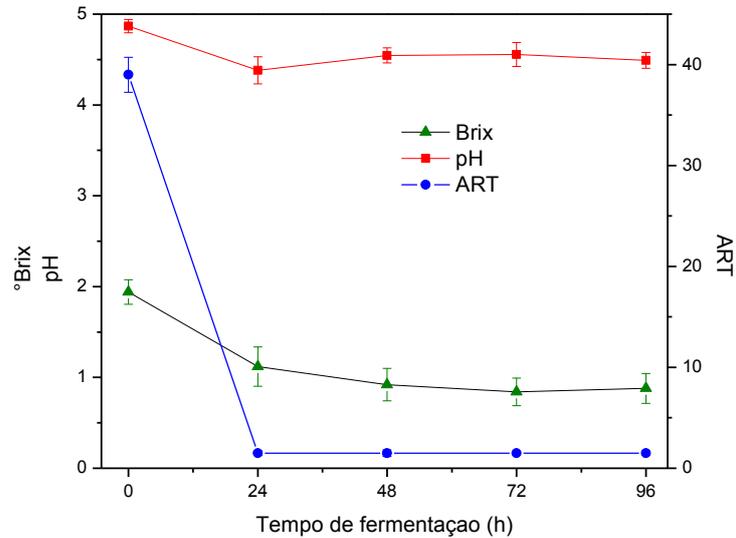


Figura 35: Teores de pH, Brix e ART nos produtos fermentados obtidos durante 4 dias de fermentação do meio contendo resíduo de goiaba.

Após a realização dessas análises foi possível verificar que dentre os produtos fermentados, aquele que utilizou resíduo de goiaba como substrato com *Kluyveromyces lactis* foi capaz de produzir compostos de aromas promissores, dentre os quais podemos destacar os compostos: β -cariofileno, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletil. Com os resultados apresentados nesse capítulo foi possível traçar uma otimização da produção de cada composto de interesse, planejando experimentos com a variação nas condições dos parâmetros tais como: composição do meio de cultura, temperatura, agitação, entre outros.

2.4 CONCLUSÕES

- Utilizando-se a técnica de MEFS a fibra extratora que apresentou melhor capacidade de captura dos compostos voláteis presentes no produto fermentado de resíduo de goiaba foi a recoberta com o polímero PDMS/DVB;
- Em relação ao isolamento de microrganismos a partir das frutas (goiaba, maracujá e umbu), 62 microrganismos foram isolados, sendo que 23 da goiaba, 24 do maracujá e 15 do umbu. Dentre esses, 29 produziram aromas agradáveis, 15 (52%) produziram aromas frutais segundo a percepção dos julgadores, sendo 10 provenientes do maracujá e 5 da goiaba e nenhum no umbu;
- Ao comparar os meios contendo resíduo de goiaba ou de maracujá com o meio contendo apenas glicose e extrato de levedura, a intensidade do aroma percebido no produto fermentado foi superior;
- Os produtos fermentados com microrganismos isolados dos frutos de goiaba apresentaram o número maior (48) de compostos voláteis quando comparado com os produtos fermentados obtidos com os microrganismos isolados de maracujá (26);
- A técnica de *Purge and Trap* utilizando coluna apolar foi o que mais apresentou compostos voláteis;
- A intensidade de alguns compostos voláteis (etanol, 2- feniletanol e β -cariofileno) foi maior nos produtos fermentados que utilizaram meio contendo resíduo de goiaba;
- Avaliando sensorialmente os produtos fermentados obtidos a partir de uso das culturas puras de *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* verificou-se que as mesmas produziram aromas e a máxima produção ocorreu em 48h de fermentação, com decréscimo após esse tempo;
- A levedura *Kluyveromyces lactis* apresentou na análise sensorial de produtos fermentados uma maior intensidade de aroma frutal/floral/agradável quando comparada com outras culturas puras (*Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus*);
- Dentre os resíduos agroindustriais (goiaba, maracujá e umbu) estudados, o resíduo de goiaba foi o que apresentou maior potencial para a produção de aroma frutal por fermentação submersa utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis*;
- Foram separados 43 compostos voláteis no produto fermentado obtido no meio contendo resíduo de goiaba utilizando a *Kluyveromyces lactis*;
- Dentre os compostos identificados destacou-se a presença de β -cariofileno, 2-feniletil acetato, γ -humuleno, bisaboleno, humuleno, 3-metil butanol, bergamoteno, γ -cadineno, óxido de cariofileno, 2-feniletanol, β -pineno, limoneno.

2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, p. 257-265, 2009.

Acree, T.; Arn, H. F. <http://www.flavornet.org/flavornet.html>. Acesso dia 26 de junho de 2013.

Aggelopoulos, T.; Katsieris, K.; Bekatorou, A.; Pandey, A.; Banat, I.M.; Koutinas, A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, v.145, p.710–716, 2014.

Ajila, C.M., Bhat, S.G., Rao, U.J.S.P. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, v. 102, p. 1006–1011. 2007.

Antalick, G.; Perello, M. C.; de Revel, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121, 1236–1245. 2010.

Arctander S. *Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals)*. Montclair: Steffen Arctander. 1969.

Azevêdo, J.A.G.; Valadares Filho, S.C.; Pina, D.S.; Detmann, E.; Souza, N.K.P.; Xavier, C.V. Composição química e parâmetros da cinética de produção de gases in vitro de resíduos de fruta para alimentação de ruminantes. In: XVII Congresso Brasileiro de Zootecnia e IX Congresso Internacional de Zootecnia, 2007, Londrina. XVII Congresso Brasileiro de Zootecnia e IX Congresso Internacional de Zootecnia, 2007.

Azevêdo, J.A.G.; Valadares Filho, S.C.; Pina, D.S.; Detmann, E.; Valadares, R.FD.; Pereira, L.G.R.; Souza, N.K.P.; Silva, L.F.C. Consumo, digestibilidade total, produção de proteína microbiana e balanço de nitrogênio em dietas com subprodutos de frutas para ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p. 1052-1060. 2011.

Barga, M. C. Modelo de inferência para a determinação da umidade do leite de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade de Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

Begala, M., Corda, L., Podda, G., Fedrigo, M. A., & Traldi, P. Headspace solidphase microextraction gas chromatography/mass spectrometry in the analysis of the aroma constituents of 'Cannonau of Jerzu' wine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.16, p. 1086–1091. 2002.

Bicas, J.L.; Pastore, G.M. Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 563-567, 2007.

Bogus Júnior, S.; Melo, A.M.T.; Zini, C.A.; Godoy, H.T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p.3345-3350. 2011.

Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chemistry*, v. 80, p.125-133. 2003.

Bramorski, A.; Soccol, C.R.; Christen, P.; Revah, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 208-212, 1998.

Brazilian Fruit. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

Brunini, M.A.; Oliveira, A.L.; Varanda, D.B.; Avaliação da qualidade de polpa de goiaba 'Paluma' armazenada a -20°C. *Revista Brasileira Fruticultura*, v. 25, p. 394-396, 2003.

Butolo, J.E. Aproveitamento de produtos não usuais na alimentação do gado leiteiro. *Nutrição de Bovinos. Conceitos básicos aplicados*. São Paulo: Fealq. p.387-405. 1993.

Cheong, K.W.; Tan, C.P; Mirhosseini H.; Sheikh A.N.; 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.

Chiappini, C.C.J.; Barbosa, A.B.; Figueiredo, S.C.; Leite, S.G.F. Validação de um desempenho experimental para testes sensoriais comparativos com muitas amostras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 475-479. 2005.

Christen, P.; Bramorski, A.; Revah, S.; Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grow on agroindustrial solid wastes. *Bioresource Technology*, v. 8, p.211-215, 2000.

Ciabotti, E. D., Braga, M. E. D., Mata, M. Alterações das características físico-químicas da polpa de maracujá amarelo submetido a diferentes técnicas de congelamento inicial. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 2, p.51-60, 2000.

Coda, R.; Kärki, I.; Nordlund, E.; Heiniö, R.-L.; Poutanen, K.; Katina, K. Influence of particle size on bioprocess induced changes on technological functionality of wheat bran. *Food Microbiology*, v. 37, p. 69-77. 2014.

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.

Deetae, P.; Saint-Eve, A.; Spinnler, H.E.; Helinck, S.; Critical effect of oxygen on aroma compound production by *Proteus vulgaris*. *Food Chemistry*, v. 126, p. 134-139. 2011.

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*. International Journal of Environmental Studies, v. 61, p.199-210, 2004.

Díaz, P.; Ibáñez, El.; Reglero, G.; Señoráns, F.J. Optimization of summer truffle aroma analysis by SPME: Comparison of extraction with different polarity fibres. LWT - Food Science and Technology, v.42, p. 1253-1259, 2009.

Fernandes, A.P.F.V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudo sobre a H-ATPase da membrana plasmática. Doutorado em Biologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. 2008.

Ferrari, R.A.; Colussi, F.; Ayub, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - Aproveitamento das Sementes. Revista Brasileira de Fruticultura, v.26, p.101-102, 2004.

Galvão, M.S. Estudo sobre a pós-colheita de umbu (*Spondias tuberosa*) e umbu-cajá (*Spondias* spp.) com ênfase em compostos voláteis. 2002. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

Gatfield I.L., Production of flavour and aroma compounds by biotechnology, Food Technol., v.10, p.110–122, 1988.

Howard, K. L.; Mike, J. H.; Riesen, R. Validation of a solid-phase microextraction method for headspace analysis of wine aroma components. American Journal of Enology and Viticulture, v.56, p.37–45. 2005.

IBRAF.InstitutoBrasileirodeFrutas.PerspectivadaFruticulturaBrasileira. 2008. Disponível em: http://www.ibraf.or.br/news_item.asp? Acesso em:15 de janeiro 2011.

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. 1. ed. Digital. São Paulo: IAL, 2008.

Jazantti, S.N.; Macoris, M.S.; Garruti, D.S.; Monteiro, M. Influence of the cultivation system in the aroma of the volatile compounds and total antioxidant activity of passion fruit. LWT - Food Science and Technology, v. 46, p.511-518. 2012.

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

Krings, U.; Berger, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. Applied Microbiology Biotechnology, v.49, p.1-8. 1998.

Korndorfer, C.M.; Bueno, I.C.S.; Crossara, E.; Peçanha, M.R.S.R.; Abdalla, A. Armazenamento e composição química do resíduo da indústria de suco de maracujá. Anais da 35ª Reunião da SBZ. v.1, p. 317-319. 1998.

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

Leal, A.L.J. Produção de Compostos de Aroma por *Kluyveromyces marxianus* utilizando resíduo de Graviola (*Annona muricata* L.). Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Sergipe. 2012.

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.

Lima, I.J.E.; Queiroz, A.J.M.; Figueirêdo, R.M.F.; Propriedades termofísicas da polpa de umbu, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.1, p.31-42, 2003.

Lira, R.C.; Rabello, C.B.V.; Silva, E.P.; Ferreira, P.V.; Ludke, M.C.M.M.; Costa, E.V. Chemical composition and energy value of guava and tomato wastes for broilers chickens at different ages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.1019-1024, 2011.

Longo, M.A.; Sanromán, M.A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technological Biotechnological*, v.44, p. 335-353, 2006.

Lord, H.; Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, v.885, p.153–193. 2000.

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.

LRI & Odour Database. Disponível em: <http://www.odour.org.uk/index.html>. Acessado em 26 de dezembro de 2013.

Mallouchos, A.; Komaitts, M.; Koutinas, A.; Kanellaki, M. Investigation of volatiles evolution during the alcoholic fermentation of grape must using free and immobilized cells with the help of solid phase microextraction (SPME) headspace sampling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3840–3848. 2002.

Maróstica Júnior, M.R.; Pastore, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, 30, p. 382-387, 2007.

Martinez, R.; Torres, P.; Meneses, M.A.; Figueroa, J.G.; Pérez-Alvarez, J.A.; Viuda-Martos, M.; Caracterização química e bioquímica de goiabas armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada. *Food Chemistry*, v.135, p.1520–1526. 2012.

Matias, M.F.O.; Oliveira, E.L.; Gertrudes, E.; Magalhães, M.M.A. Use of fibres obtained from cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 143-150, 2005.

Mauricio, J.C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J.M., Medina, M. The Effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.75, p.155–160. 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*, 6, p.33-39, 2000.

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 reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428, 1959.

Monteiro, M.; Amaro, A.P.; Bonilha, P.R.M.; Avaliação físico-química e microbiológica da polpa de maracujá processada e armazenada sob refrigeração. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, p. 71-76. 2005.

Narain, N.; Galvão, M.S.; Madruga, M.S. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. *Food Chemistry*, v.102, p. 726-731. 2007.

Oliveira, A.P.; Silva, L.R.; Pinho, P.G.; Gil-Izquierdo, A.; Valentão, P.; Silva, B.M.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-IT-MS. *Food Chemistry*, v.123, p548-557. 2010.

Paraskevopoulou, A.; Mantzouridou, F. Exploitation of Orange Peel for the Production of Flavor-Active Compounds with the Use of a Commercial Wine Strain. *Flavour Science, Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, p.613-617, 2014.

Pawliszyn, J. Applications of solid phase microextraction. Hertfordshire: Royal Society of Chemistry. 1999. 655p.

Petrini, O.; Muller, E. Haupt und nebenfruchtformen europaischer pilze. *Mycologia Helvética*, v. 1, p. 501-627, 1986.

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.

Ramos, A.S.; Fiaux, S.B.; Leite, S.G.F. Production of 6-pentyl- α -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, 1986.

Rapp, A. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, v.42, p.351-363. 1998.

Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Soares, I. B.; Maior, A.M.S.; Baudel, H.M.; Abreu, C.A.M.; Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p.663-670, 2011.

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.

Siddiq, M. Tropical and Subtropical Fruits: Postharvest Physiology, Processing and Packaging. Oxford: Wiley-Blackwell. 2012. 648p.

Sigma. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/faq.html>. Acessado em outubro de 2013.

Soares, F.D.; Pereira, T.; Marques, M.O.M.; Monteiro, A.R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. Food Chemistry, v.100, p.15-21, 2007.

Soccol, C.R.; Vandenbergue, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, v.13, p.205-218. 2003.

Sousa, M.S.B.; Vieira, L.M.; Silva, A.O.; Mancini-Filho, J.; Lima, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. Ciência e Agrotecnologia, v.35, p.554-559, 2011.

Starzack, M.; Krzystek, L.; Nowicki, L.; Michalski, H. Macro-approach kinetics of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: experimental studies and mathematical modelling. The Chemical Engineering Journal, v. 54, p. 221-240, 1994.

Stoppacher, N.; Kluger, B.; Zeilinger, S.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. Journal of Microbiological Methods, v. 81, p. 187-193, 2010.

TACO. Tabela brasileira de composição de Alimentos: projeto integrado de composição de alimentos. Versão 4.1. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: 27 set. 2013, 2008.

Sumby, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. Food Chemistry, v.121, p.1-16. 2010.

Uchôa, A.M.A.; Costa, J.M.C.; Maia, G.A.; Silva, M.C.; Carvalho, A.F.F.U.; Meira, T.R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 15, p.58-65, 2008.

Uenojo, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 2003, 134f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos de Campinas, 2003.

Uenojo, M.; Pastore, G.M. β -carotene biotransformation to obtain aroma compounds. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, p.822-827, 2010.

Uenojo, M.; Pastore, G.M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, n.3, p. 509-515. 2006.

Vasques, C. T. Reologia do suco de goiaba: efeito da diluição e do tamanho de partícula. 64f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

Vila, M.T.R.; Lima, L.C.O.; Vilas Boas, E.V.B.; Doll Hojo, E.T.; Rodrigues, L.J.; Paula, N.R.F.; Caracterização Química e Bioquímica de Goiabas Armazenadas sob Refrigeração e Atmosfera Modificada. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, p. 1435-1442, 2007.

Welsh, F.W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: Galbeman A. (Ed.) *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*. Wiley, New York, p. 1-16. 1994.

Zhang, M.; Pan, Q.; Yan, G.; Duan, C. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chemistry*, v.125, p. 743-749. 2011.

Zhang, M., Xu, Q., Duan, C., Qu, W., & Wu, Y. Comparative study of aromatic compounds in young red wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, and Cabernet Gernischet varieties in China. *Journal of Food Science*, v.72, p.248–252. 2007.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA O MELHOR RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA

Resumo

Dentre os diversos processos fermentativos realizados para a obtenção dos compostos 2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno descritos e os resultados apresentados no capítulo 2, o uso do resíduo de goiaba utilizando a cepa de *Kluyveromyces lactis* foram selecionados para otimizar todas as condições do processo biotecnológico. Dessa forma, o principal objetivo deste capítulo foi padronizar as condições do processo biotecnológico, incluindo a composição do meio, agitação e temperatura para obtenção de compostos de aroma, principalmente 2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno utilizando fermentação submersa por *Kluyveromyces lactis*. Inicialmente, avaliou-se a produção dos compostos citados por meio da realização de um planejamento fatorial fracionado. Foram testadas 5 variáveis dependentes: concentração de açúcar (de 0 a 50g/L), de extrato de levedura (de 0 a 10g/L), agitação (de 75 a 150 rpm), massa de resíduo (de 10 a 100g/L), e temperatura de fermentação (de 30°C a 50°C). Após a verificação dos efeitos principais para 2-feniletanol (extrato de levedura e agitação), acetato de 2-feniletil (extrato de levedura e glicose) e β -cariofileno (quantidade de resíduo e agitação) foi realizado um planejamento completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para cada composto de interesse. Segundo a análise da superfície de resposta, o processo de produção foi otimizado, onde a maior produção do acetato de 2-feniletil pode ser obtida em concentrações entre 25 a 35g/L de extrato de levedura, entre 40 a 60 g/L de glicose; do β -cariofileno pode ser obtido em concentrações entre 120 a 140g/L de resíduo de goiaba, e agitação entre 160 e 180 rpm. A partir dessas condições otimizadas foi possível realizar um escalonamento da produção desses compostos no biorreator e foi possível obter 9,7 g/L de 2-feniletanol, 65,6 g/L de acetato de 2-feniletil e 9,6 g/L de β -cariofileno.

Palavras-chave: aroma, cariofileno, goiaba, resíduos agroindustriais

CHAPTER 3

OPTIMIZATION OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS CONDITIONS FOR BETTER YIELD IN VOLATILE AROMA PRODUCTION

Abstract

Among the various fermentation processes performed to obtain the compounds such as 2-phenylethanol, 2-phenylethyl acetate and β -caryophyllene described and the results presented in Chapter 2, the use of guava processing residue using strain *Kluyveromyces lactis* were selected to optimize the conditions of the biotechnological process. Thus, the main objective of this chapter was to optimize the conditions of the biotechnological process, including the medium composition, agitation and temperature to obtain aroma compounds, especially 2-phenylethanol, 2-phenylethyl acetate and β -caryophyllene using submerged fermentation with *Kluyveromyces lactis*. Initially, the production of these compounds was evaluated by performing a fractional factorial design. Five dependent variables were tested: sugar concentration (0 to 50 g/L), yeast extract (0 to 10 g/L), agitation (75 to 150 rpm), the the fruit processing residue (10 to 100g/L), and fermentation temperature (30 to 50°C). After the verification of data obtained for the production of 2-phenylethanol which was effected by the parameters such as yeast extract and stirring, 2-phenylethyl acetate effected by parameters of yeast extract and glucose and β -caryophyllene effected by the parameters of residue concentration and stirring, a thorough planning of Central Composite Rotational Design (CCRD) type for each compound of interest was conducted. According to the analysis of the response surface, the manufacturing process conditions were optimized, where increased production of 2-phenylethyl acetate was obtained at concentrations of yeast extract varying from 25 and 35g/L, by using 40 to 60 g/L glucose, the β -caryophyllene concentration was obtained at concentrations of guava processing residue varying from 120 to 140g/L, and agitation between 160 and 180 rpm. Using these optimized conditions, the fermentation was performed wherein it was possible to obtain 9,7 g/L from 2-phenylethanol, 65,6 g/L from 2-phenylethyl acetate and 9,6 g/L from β - caryophyllene.

Key-words: agroindustrial wastes, caryophyllene, flavor, guava

3.1. INTRODUÇÃO

De acordo com os resultados apresentados no Capítulo 2, utilizando os diversos resíduos agroindustriais (goiaba, maracujá e umbu) e cepas isoladas dos frutos de goiaba, maracujá e umbu e puras (*Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*) foi possível padronizar o processo biotecnológico para obter as substâncias voláteis (2-FE, 2-FEA e CAR) pela seleção da cepa *Kluyveromyces lactis* e o uso de resíduo de goiaba como substrato parcial.

A utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos tem tido grandes avanços e interesse da comunidade acadêmica. A utilização racional desses resíduos contribui para minimizar problemas ambientais e energéticos, como também na obtenção de compostos de elevado valor comercial como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, celulose e compostos de aroma, agregando importância ao que antes era tratado como resíduo (Medeiros et al., 2000; Soccol & Vandenberghe, 2003).

Várias leveduras do gênero *Kluyveromyces* produzem compostos voláteis a partir de glicose ou de etanol. O gênero *Kluyveromyces* tem sido amplamente usado em propostas industriais devido as suas características fisiológicas e a síntese de bioprodutos (enzimas, biomassa, ribonucleotídeos, oligossacarídeos, oligopeptídeos) (Louvel et al., 1996; Souza et al., 2001). Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem diversos aromas de flores e frutas, como também conferem aroma a alimentos fermentados.

Os compostos voláteis selecionados (2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno) são de alta importância e valor para a indústria de aromas, fragrâncias e cosmética (Etschmann et al., 2003; Etschmann et al., 2005; Reinsvold et al., 2011). Dessa forma, justifica-se a otimização para uma maior produção destes compostos com menor custo do processo biotecnológico.

A partir desses aspectos, sabendo que os substratos agroindustriais oferecem várias vantagens como fácil manuseio, baixo custo, alta produtividade além de minimizar os problemas ambientais e amparado pelos resultados obtidos no capítulo anterior da seleção da levedura (*Kluyveromyces lactis*) e do resíduo agroindustrial (resíduo de goiaba), objetivou-se nesse capítulo realizar experimentos via planejamento experimental com o intuito de otimizar a produção de compostos voláteis (2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno) utilizando resíduo de goiaba como substrato em fermentação submersa com *Kluyveromyces lactis*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Local de execução

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas (LAF) pertencente ao 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) ambos da Universidade Federal de Sergipe, Campus de São Cristovão/SE.

3.2.2 Resíduos agroindustriais:

O resíduo de goiaba foi cedido pela empresa Pomar do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, localizada em Aracaju-SE e o mesmo foi armazenado a -18°C , em freezer, em embalagens plásticas. A seguir, o resíduo foi triturado em moinho de facas (marca Tecnal, modelo Willye TE-650) em peneira de 20 mesh.

3.2.3 Microrganismo

Foi utilizada a levedura *Kluyveromyces lactis* (CBMAI 548) procedente do Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Trimestralmente a cepa 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 .

3.2.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram os mesmos listados no capítulo 2.

3.2.5 Metodologia experimental

3.2.5.1 Obtenção do inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do caldo sabouraud foram previamente autoclavados a 121°C por 15 min. Em seguida, três alçadas

de células de cultura estoque foram transferidas para o meio e incubou-se em agitador orbital tipo “shaker” à 150 rpm em temperatura de 30 °C pelo período de 48 h. Para padronizar a concentração inicial de células no inóculo, após o período de incubação fez-se a contagem em câmara de Neubauer, de acordo com a metodologia descrita por Barga (2007), ajustando-se a concentração para 1×10^8 células/mL.

3.2.5.2 Otimização das condições de fermentação para a produção de aroma frutal utilizando o resíduo de goiaba e a levedura *Kluyveromyces lactis*

Inicialmente foi avaliada a influência dos parâmetros glicose (entre 0 e 50g/L), extrato de levedura (entre 0 e 10g/L), agitação (entre 75 e 150 rpm), massa de resíduo (entre 10 e 100g/L), e temperatura (entre 30 e 50°C) na produção de compostos de aroma (2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno), utilizando o delineamento experimental do tipo fatorial fracionado 2^{5-1} , com 3 repetições no ponto central. Os níveis dos parâmetros e o planejamento fatorial estão apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente, e foram baseados nos trabalhos de Huang et al. (2000) e Fonseca et al. (2007). Os valores de pH (5,0) e concentração inicial de células (10^8 células/mL) foram mantidos fixos.

Os experimentos fermentativos utilizando o resíduo de goiaba foram fermentados em frascos âmbar de 150 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e 10% de volume de inóculo. A cada 24 horas de fermentação, durante 4 dias, foi retirado um frasco de produto fermentado para a realização das análises de aroma através de análise cromatográfica e espectrometria de massa conforme descrito no item 3.2.5.6. A variável resposta dos experimentos deste planejamento foi a intensidade em área, dos compostos β -cariofileno, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletil.

Tabela 23: Variáveis e níveis codificados para os experimentos do planejamento fatorial fracionado

Variáveis independentes	Níveis codificados das variáveis		
	-1	0	+1
Glicose (g/L)	0	25	50
Extrato de levedura (g/L)	0	5	10
Velocidade de agitação (rpm)	75	112,5	150
Temperatura (°C)	30	40	50
Concentração do resíduo (g/L)	10	55	100

Tabela 24: Variáveis codificadas do planejamento fracionado

Ensaio	Glicose (1)	Extrato Levedura (2)	Agitação (3)	Temp. (4)	Resíduo (5)
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

3.2.5.3 Planejamento do tipo Composto Central Rotacional (DCCR)

De acordo com os resultados obtidos dos experimentos no planejamento fatorial fracionado (item 3.2.5.2), foi possível verificar os parâmetros significativos para a produção de cada composto de interesse. A partir disto foi realizado o delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização do processo biotecnológico.

Para a otimização da produção do 2-FE utilizou-se o DCCR do tipo 2^3 , sendo 6 pontos axiais e 3 centrais, onde variou-se a concentração de extrato de levedura e glicose e a agitação (Tabela 25), totalizando 17 experimentos. Os parâmetros temperatura (30°C) e massa de resíduo (55 g/L) foram fixados no processo.

Tabela 25: Valores utilizados no DCCR para a produção de 2-FE.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extrato de levedura (g/L)	5	14	27,5	41	50
Glicose (g/L)	0	5	12,5	20	25
Agitação (rpm)	75	110	162,5	215	250

Para a otimização da produção do 2-FEA utilizou-se o DCCR, o qual foi 2^2 , sendo 4 pontos axiais e 3 centrais, totalizando 11 experimentos (Tabela 26). Foram fixadas as

condições de temperatura (30°C), agitação (75 rpm) e quantidade de resíduo (55 g/L) enquanto que as variáveis de extrato de levedura e glicose tiveram os valores extrapolados afim de ampliar a faixa estudada.

Tabela 26: Valores utilizados no DCCR para a produção de 2-FEA.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura (g/L)	5	12	27,5	44	50
Glicose (g/L)	10	23	55	87	100

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fracionado para a produção do β -cariofileno onde apenas a agitação e quantidade de resíduo tiveram seus valores extrapolados (Tabela 27), foi realizado um planejamento do tipo DCCR 2², sendo 4 pontos axiais e 3 centrais, totalizando 11 experimentos. Nestes experimentos, foram fixadas as condições de temperatura (30°C), glicose (25 g/L) e extrato de levedura (5 g/L).

Tabela 27: Valores utilizados no DCCR para a produção de β -cariofileno.

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Resíduo (g/L)	25	55	127	200	230
Agitação (rpm)	75	100	162,5	224	250

A validação do processo foi realizada repetindo-se as análises em triplicata. Os experimentos fermentativos foram realizados conforme descrito no item 3.2.5.2.

3.2.5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial fracionado e delineamento composto central rotacional foram analisados pelo programa STATISTIC 10.0.

3.2.5.5 Produção dos compostos de aroma em escala de biorreator

A partir dos resultados de otimização do processo fermentativo em frascos agitados obtidos através do delineamento composto central rotacional (item 3.2.5.3), realizou-se os experimentos fermentativos para a obtenção dos compostos 2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e β -cariofileno em escala de biorreator. Os experimentos foram realizados em um biorreator (marca INFORS- HT; modelo Minifors) com capacidade de 2,5 litros. Foram preparados 2 litros de meio de cultivo, sob condições controladas de agitação, temperatura e pH, nas condições ótimas de cada composto de interesse obtidas no planejamento experimental completo.

3.2.5.6 Análise dos compostos não voláteis

A análise de compostos não voláteis foi realizada nos produtos fermentados obtidos nas condições otimizadas em frascos agitados (item 3.2.5.3) para a produção dos compostos de interesse (β -cariofileno, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletil). Os produtos fermentados foram coletados a cada 24h por 4 dias e centrifugados à 10.000 rpm por 10min à 5°C. Os sobrenadantes foram analisados quanto ao pH (método 017-IV do Instituto Adolf Lutz, 2008), sólidos solúveis (método 010-IV do Instituto Adolfo Lutz, 2008), e açúcares redutores (método DNS, Miller, 1959). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5.7 Captura e separação dos compostos voláteis

A produção de compostos voláteis foi monitorada a cada período de 24h através de análises cromatográficas do headspace, utilizando-se duas técnicas MEFS (Micro extração em Fase Sólida) e P&T (Purga e Armadilha). A primeira técnica foi utilizada para todos os experimentos enquanto a técnica de P&T foi utilizada apenas para os experimentos realizados no biorreator.

3.2.5.7.1 Análise dos compostos voláteis pela técnica de MEFS:

Essa técnica foi utilizada para todo o planejamento e amostras do biorreator. A extração e as análises cromatográficas foram realizadas nas mesmas condições descritas no Capítulo 2, item 2.2.8.5.

3.2.5.7.2 Análise dos compostos voláteis pela técnica de *Purge & Trap* (P&T):

Os compostos voláteis produzidos no biorreator foram submetidos ao sistema de purga e armadilha (Marca Tekmar; Modelo ATOMX), sendo os voláteis capturados pela armadilha Vocarb3000 e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS QQQ Agilent 7000) do tipo triplo quadrupolo. As condições de isolamento e concentração utilizadas no ATMOX para a análise cromatográfica foram baseadas em metodologia apresentada por Narain et al. (2007), descritas abaixo:

Temperatura da amostra 25°C;

Tempo de purga: 15min;

Fluxo de hélio: 40 ml/min;

Temperatura de desorção: 180°C;

Tempo de desorção: 10 min.

Temperatura da linha de transferência: 180°C.

A programação do forno, gás de arraste e temperaturas de injetor foram as mesmas que no experimento anterior (item 3.2.5.7.1).

3.2.5.8 Identificação e quantificação de compostos voláteis

Os compostos foram identificados seguindo o mesmo procedimento descrito no Capítulo 2 (item 2.2.10.4.3).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Seleção de parâmetros significativos para a produção dos compostos de aroma através do planejamento fatorial fracionado

Baseado nos resultados do capítulo anterior em que o resíduo de goiaba fermentado utilizando *Kluyveromyces lactis* produziu os compostos voláteis em maior intensidade, foi realizado um planejamento para otimização da produção dos compostos de interesse (2-FE, 2-FEA e CAR) (Item 3.2.5.2). Em paralelo, foram injetados os padrões autênticos, nas mesmas condições de análise, para confirmação da sua identidade.

A captura e análise de compostos de aroma costumam ser complexas principalmente pela característica de alta volatilidade e baixa concentração nas amostras. O uso da técnica de MEFS tem apresentado resultados relevantes. De maneira geral, o uso de MEFS para fins quantitativos é fortemente influenciado por diversos fatores, tais como: pela natureza da matriz, a quantidade de amostra, as condições de desadsorção, o revestimento da fibra, da temperatura de extração, tempo de extração, etc (Burman et al. 2005). No entanto, as curvas de calibração lineares, para o 2-FEA (Figura 36) e CAR (Figura 37) obtidas para os produtos voláteis escolhidos revelaram os valores R^2 de 0,9819 e 0,9830, respectivamente.

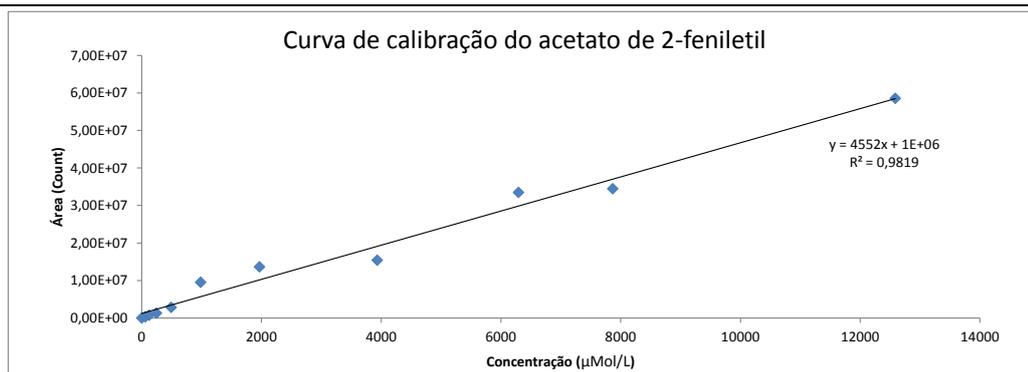


Figura 36: Curva de calibração do 2-FEA

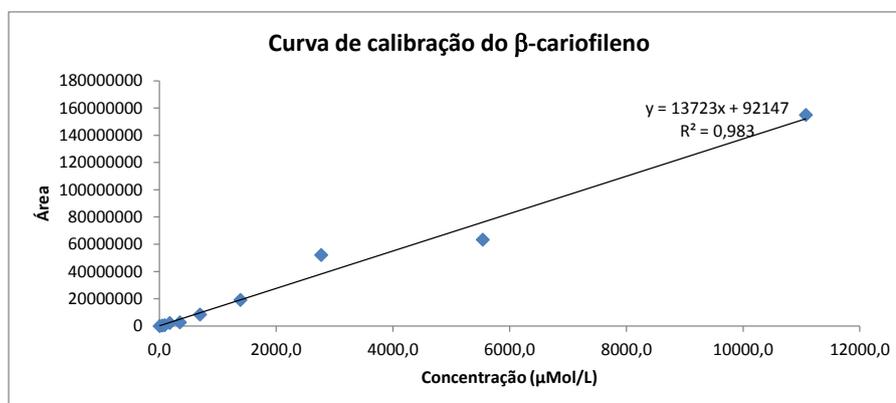


Figura 37: Curva de calibração do CAR

A estratégia escolhida neste trabalho foi de planejamento experimental. Primeiramente foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-1} e 3 repetições no ponto central. Foram avaliados os efeitos das concentrações de glicose e extrato de levedura, agitação, temperatura e concentração de resíduo na produção dos compostos de aroma 2-FE, 2-FEA e CAR conforme as condições variadas através do delineamento experimental (Tabela 28).

Tabela 28: Valores reais, codificados e variável resposta da matriz do planejamento fatorial fracionado para a produção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR

Ensaio	Variáveis independentes				Resíduo (g/L)	Concentração (μMol/L)		
	Glicose (g/L)	Extrato Levedura (g/L)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)		2-FE	2-FEA	CAR
1	0 (-1)	0 (-1)	75 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	107,6	4086,1	219,9
2	50 (+1)	0 (-1)	75 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	6,6	10149,4	129,6
3	0 (-1)	10 (+1)	75 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	885,3	1625,7	118,6
4	50 (+1)	10 (+1)	75 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	329,5	17179,3	193,0
5	0 (-1)	0 (-1)	150 (+1)	30 (-1)	10 (-1)	467,9	1324,7	147,0
6	50 (+1)	0 (-1)	150 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	221,9	6766,3	262,9
7	0 (-1)	10 (+1)	150 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	645,9	1878,3	270,9
8	50 (+1)	10 (+1)	150 (+1)	30 (-1)	10 (-1)	514,1	18255,7	157,2
9	0 (-1)	0 (-1)	75 (-1)	50 (+1)	10 (-1)	1,7	551,4	101,1
10	50 (+1)	0 (-1)	75 (-1)	50 (+1)	100 (+1)	2,2	145,0	185,7
11	0 (-1)	10 (+1)	75 (-1)	50 (+1)	100 (+1)	305,4	6261,0	158,0
12	50 (+1)	10 (+1)	75 (-1)	50 (+1)	10 (-1)	107,6	1693,8	67,6
13	0 (-1)	0 (-1)	150 (+1)	50 (+1)	100 (+1)	153,8	116,4	295,7
14	50 (+1)	0 (-1)	150 (+1)	50 (+1)	10 (-1)	241,7	1674,0	189,3
15	0 (-1)	10 (+1)	150 (+1)	50 (+1)	10 (-1)	136,2	544,8	263,6
16	50 (+1)	10 (+1)	150 (+1)	50 (+1)	100 (+1)	276,8	740,3	299,3
17	25 (0)	5 (0)	112,5 (0)	40 (0)	55 (0)	153,8	8348,0	132,5
18	25 (0)	5 (0)	112,5 (0)	40 (0)	55 (0)	114,2	5953,4	200,2
19	25 (0)	5 (0)	112,5 (0)	40 (0)	55 (0)	131,8	7469,2	197,3

Os gráficos de Pareto (Figuras 38, 39 e 40) ilustram os efeitos das variáveis, bem como suas interações ao nível de significância de 5%. Os parâmetros que ultrapassam a direita da linha tracejada são considerados significativos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Verificou-se para o 2-FE (Figura 38) que o extrato de levedura e a temperatura foram os parâmetros que mais influenciaram a produção do composto ao nível de 5% de significância, sendo os efeitos positivo e negativo, respectivamente, ou seja, em concentrações maiores de extrato de levedura e nos valores menores de temperaturas de fermentação, maior será a produção de 2-FE. A concentração do resíduo não teve influência significativa na produção deste composto. A agitação apresentou influência positiva, ou seja, quanto maior a agitação maior a produção do composto de aroma 2-FE.

Para a produção do acetato de 2-feniletil (Figura 39) observou-se que a temperatura, a concentração de glicose e a interação entre estes 2 parâmetros foram os que mais influenciaram ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) sobre a produção do composto. A glicose e o extrato de levedura apresentaram efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração maior a produção do composto e a temperatura e a interação entre glicose e temperatura demonstraram efeito negativo, ou seja, quanto maior forem estes

parâmetros menor será a produção do composto. A agitação não influenciou ao nível de 5% de significância a produção 2-FEA. Vale salientar que estas interpretações são válidas dentro da faixa de variação testada nos experimentos para cada parâmetro avaliado.

Para a produção do CAR (Figura 40) apenas a concentração de resíduo e a agitação influenciaram significativamente ($p < 0,05$) ao processo, e de forma positiva, ou seja, quanto maior os valores destes parâmetros maior foi a produção composto.

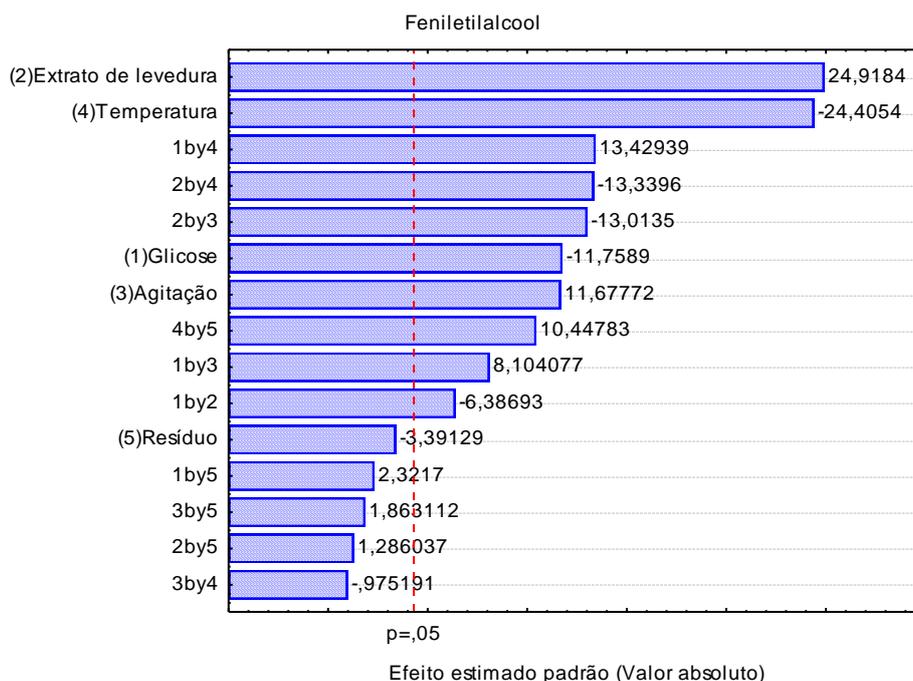


Figura 38: Diagrama de efeitos de Pareto para planejamento 2^{5-1} para a produção do 2-FE.

No planejamento fracionado realizado para os compostos alvo desse estudo (2-FE, 2-FEA e CAR), de todas as variáveis avaliadas (glicose, extrato de levedura, temperatura, quantidade de resíduo e agitação), a condição comum que apresentou influência entre os parâmetros foi apenas a agitação, de forma positiva, para os compostos 2-FE e CAR.

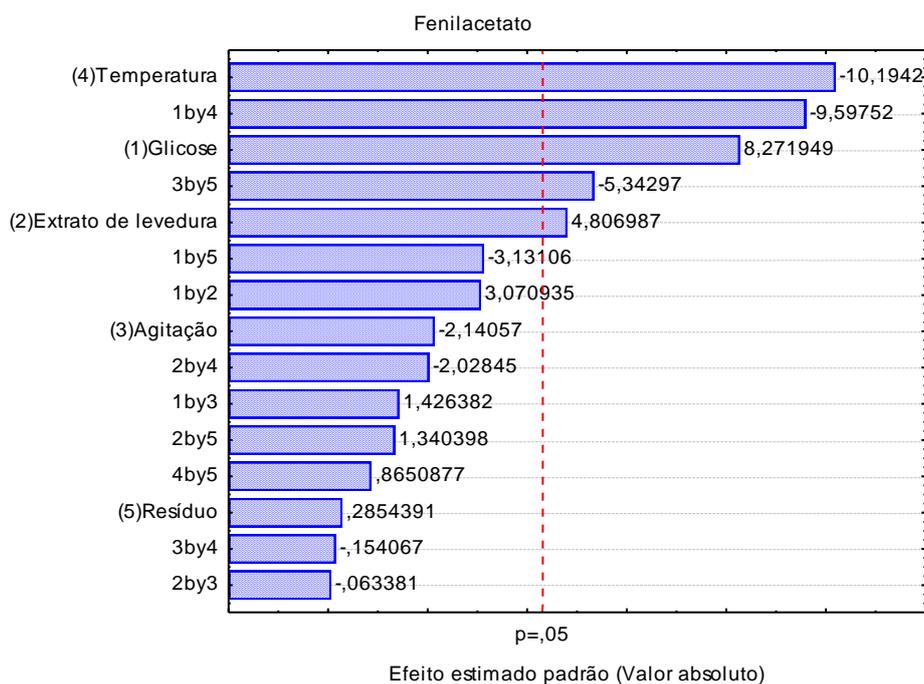


Figura 39: Diagrama de efeitos de Pareto para o planejamento 2^{5-1} para a produção do 2-FEA.

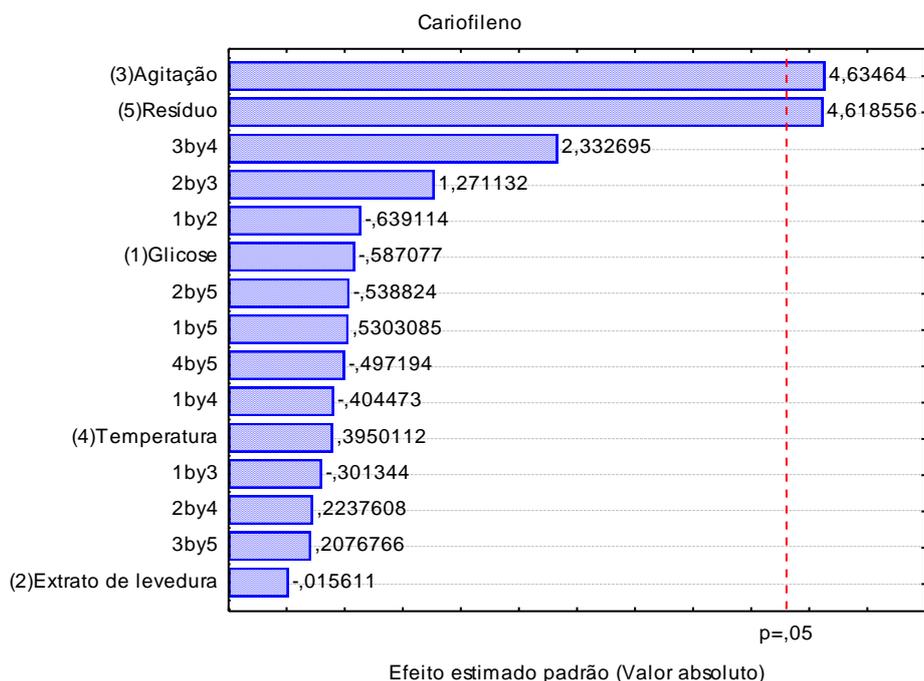


Figura 40: Diagrama de efeitos de Pareto para planejamento 2^{5-1} para a produção do CAR.

3.3.2. Otimização do processo biotecnológico para a produção dos compostos de aroma

A partir dos resultados do planejamento fatorial fracionado foi possível obter os parâmetros que influenciaram na produção de cada composto volátil e assim foi

estabelecido o delineamento composto central rotacional para a otimização do processo biotecnológico em frascos agitados.

3.3.2.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o 2-FE

Para a otimização da produção de 2-FE utilizou-se o DCCR, onde variou-se a concentração de extrato de levedura e glicose e a agitação, totalizando 17 experimentos. As áreas dos picos cromatográficos de 2-FE obtidas em cada experimento estão apresentadas na Tabela 29. A máxima produção do composto 2-FE foi obtida em 24 h para os ensaios 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 e 14, e após 48 h para os demais ensaios. Os picos máximos de produção do composto de aroma 2-FE variaram entre 13,8 a 2746 $\mu\text{Mol/L}$ em todos os ensaios realizados, sendo a maior concentração obtida (29437 $\mu\text{Mol/L}$) quando utilizado meio de cultivo contendo 5 g/L de glicose, 14 g/L de extrato de levedura e agitação de 228 rpm (experimento 3).

Tabela 29: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-FE e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) na produção do composto.

Ensaio	Extrato Levedura (g/L)	Agitação (RPM)	Glicose (g/L)	Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)
1	14 (-1)	120 (-1)	5 (-1)	184,5
2	41 (+1)	120 (-1)	5 (-1)	854,6
3	14 (-1)	228 (+1)	5 (-1)	2746,0
4	41 (+1)	228 (+1)	5 (-1)	1551,0
5	14 (-1)	120 (-1)	20 (+1)	850,2
6	41 (+1)	120 (-1)	20 (+1)	538,2
7	14 (-1)	228 (+1)	20 (+1)	590,9
8	41 (+1)	228 (+1)	20 (+1)	52,2
9	5 (-1,68)	175 (0)	12,5 (0)	160,4
10	50 (+1,68)	175 (0)	12,5 (0)	54,9
11	27,5 (0)	75 (-1,68)	12,5 (0)	13,8
12	27,5 (0)	250 (+1,68)	12,5 (0)	55,1
13	27,5 (0)	175 (0)	0 (-1,68)	70,3
14	27,5 (0)	175 (0)	25 (+1,68)	58,8
15	27,5 (0)	175 (0)	17,5 (0)	33,0
16	27,5 (0)	175 (0)	17,5 (0)	43,9
17	27,5 (0)	175 (0)	17,5 (0)	44,4

Os cromatogramas demonstrando os picos do composto 2-FE estão apresentados na Figura 41. O pico do composto foi identificado em média com 25,05 min de corrida. Os picos sobrepostos correspondem a produção do composto em cada ensaio realizado. A menor produção deste composto foi obtida quando utilizou 12,5 g/L de glicose, 27,5 g/L de extrato de levedura e agitação de 75 rpm.

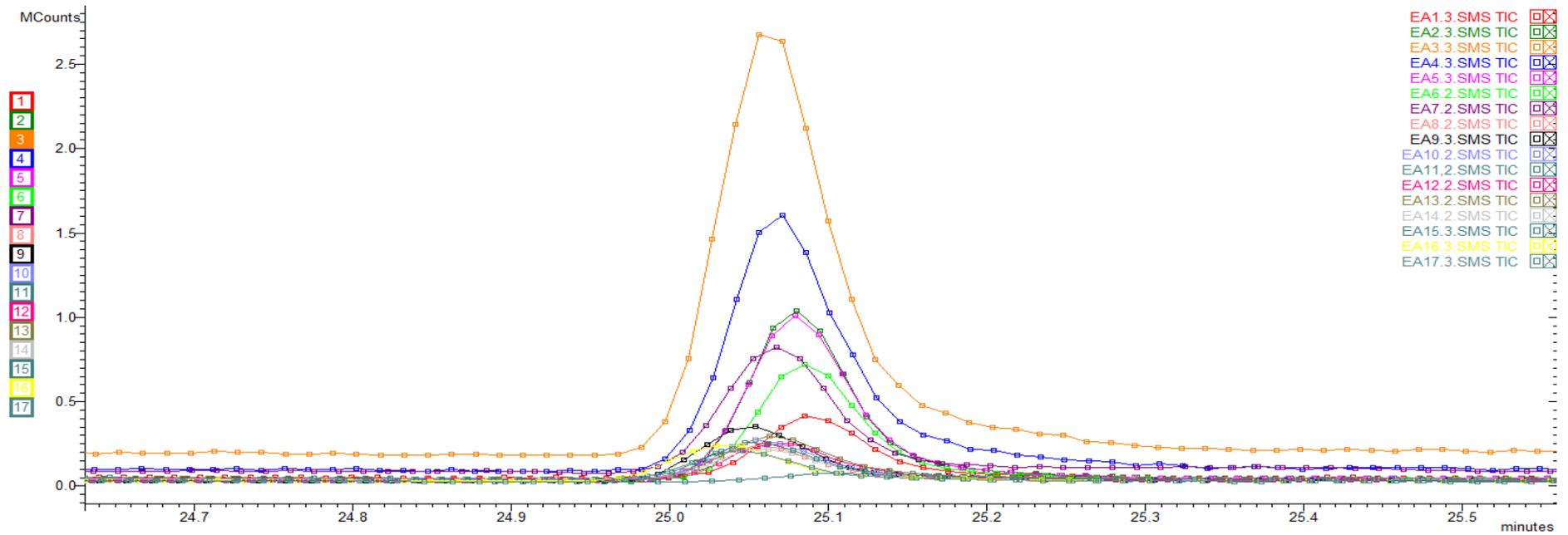


Figura 41: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto 2-FE segundo as diversas condições do planejamento DCCR

Huang *et al.* (2000) obtiveram maior produção de 2-FE utilizando *Pichia fermentans* em meio contendo 18% de sacarose, 0,25% de extrato levedura e 0,1% de fenilalanina. Mais próximos aos resultados encontrados nesse trabalho (0,5%), foram reportados por Stark *et al.* (2002) e Oliveira (2010) que obtiveram maior produção deste composto utilizando meio contendo 3% e 2% de glicose, respectivamente. No trabalho atual quando comparado aos demais autores a produção deste composto foi otimizada em frascos agitados utilizando meio de cultivo contendo uma quantidade bem menor de glicose (0,5%), extrato de levedura e resíduo de goiaba. Além disso, não foi utilizado o aminoácido L-fenilalanina comumente adicionado em meios sintéticos como substrato para a produção biotecnológica deste composto.

A máxima produção do composto foi em agitação 228 rpm, comparável aos valores obtidos por Garavaglia *et al.* (2007) e Damasceno *et al.* (2003), os quais obtiveram maior produção do 2-FE em mosto de uva por *Kluyveromyces marxianus* tendo agitação de 250 rpm e em mosto contendo maniveira por *Geotrichum fragrans* em agitação de 150 rpm.

A influência dos parâmetros no processo de produção de 2-FE foi avaliada através do gráfico de pareto apresentado na Figura 42. É possível verificar que na faixa estudada que a agitação e a glicose influenciaram de forma positiva e negativa, respectivamente.

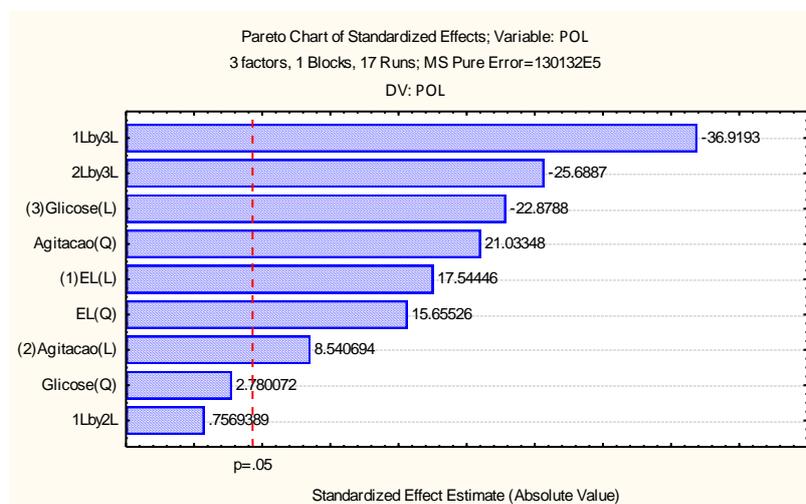


Figura 42: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma 2-FE.

A análise de variância está apresentada na Tabela 30, onde o coeficiente de correlação $R^2 = 0,72$, e o F calculado (de 3,02 inferior ao F tabelado = 3,68) não validaram estatisticamente o modelo e assim não foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno.

Tabela 30: Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-FE

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	1,11191011E+14	7	1,23545567777777 E+13	3,02
Resíduo	4,7247189E+13	9	6,749598428571E+12	-
Falta de ajuste	4,720869E+13	4	-	-
Erro puro	3,849900E+10	3	-	-
Total	1,584382E+14	16	-	-

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,72104$ $F_{9;7;5\%} = 3,68$

3.3.2.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o 2-FEA

Em virtude dos resultados obtidos no planejamento fracionado foi realizado um novo planejamento do tipo DCCR para o 2-FEA, o qual foi 2^2 , sendo 4 pontos axiais e 3 centrais. O composto 2-FEA alcançou sua máxima produção em 24h de fermentação apenas para os ensaios 1 e 2, e após 48 h para os demais ensaios (Tabela 31). A Tabela 31 relata os picos máximos de produção do composto de aroma 2-FEA variaram entre 230 a 5777 $\mu\text{Mol/L}$ em todos os ensaios realizados, sendo a maior concentração obtida para os experimentos do ponto central do planejamento (55 g/L de glicose e 27,5 g/L de extrato de levedura).

Tabela 31: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de 2-FEA e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) na produção do composto.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Glicose (g/L)	Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)
1	12 (-1)	23 (-1)	843.6
2	44 (+1)	23 (-1)	876.5
3	12 (-1)	87 (+1)	738.1
4	44 (+1)	87 (+1)	1388.4
5	5 (-1,41)	55 (0)	1603.7
6	50 (+1,41)	55 (0)	819.4
7	27,5 (0)	10 (-1,41)	1755.3
8	27,5 (0)	100 (+1,41)	230.7
9	27,5 (0)	55 (0)	4679.3
10	27,5 (0)	55 (0)	5777.7
11	27,5 (0)	55 (0)	4205.6

Os diversos cromatogramas demonstrando o pico do composto 2-FEA estão apresentados na Figura 43 e o gráfico de Pareto na Figura 44. O pico do composto foi identificado em média com 22,02 min de corrida. Os picos sobrepostos correspondem a produção do composto em cada experimento do planejamento realizado. A menor produção deste composto foi obtida quando utilizou 100 g/L de glicose e 27,5 g/L de extrato de levedura.

A Figura 44 apresenta o gráfico de Pareto onde verifica-se para a produção do 2-FEA os parâmetros de extrato de levedura e a glicose influenciaram negativamente a produção do composto ao nível de 5% de significância na faixa estudada.

Lee (1998) apud Huang et al. (2000) afirmam que extrato de levedura é a melhor fonte de nitrogênio para a produção de 2-FEA e 2-FE, sendo atribuído que o extrato de levedura além de contribuir com nitrogênio também contribui com vitaminas ao meio. E o mesmo perfil foi observado no gráfico de Pareto (Figura 44).

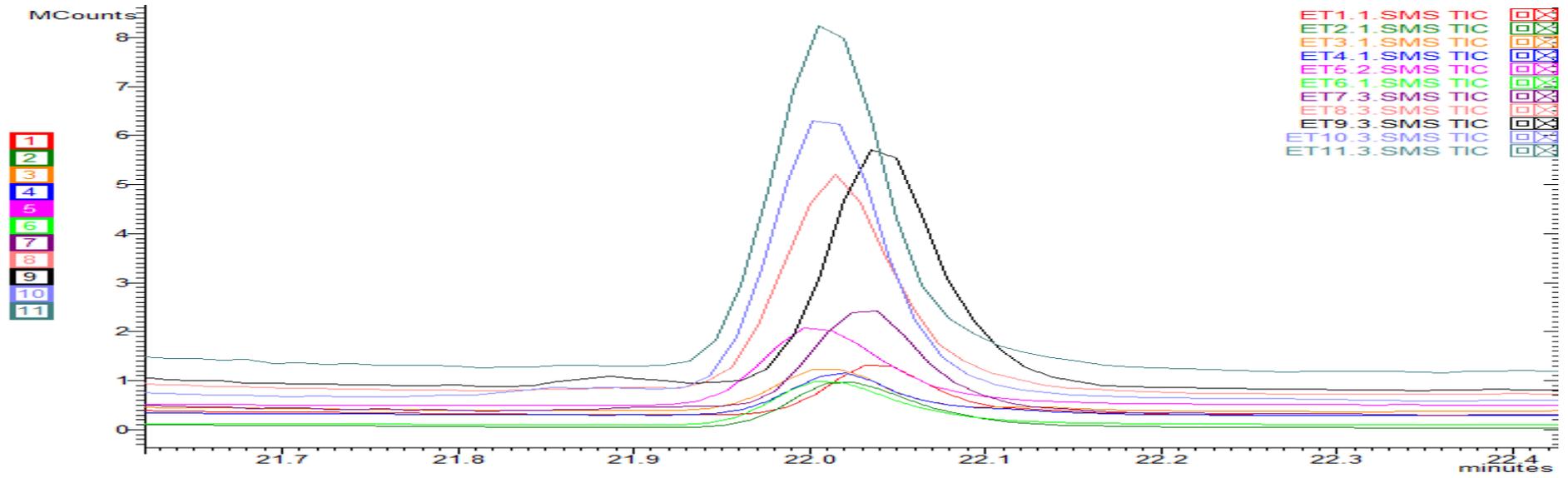


Figura 43: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto 2-FEA nas diversas condições do planejamento DCCR

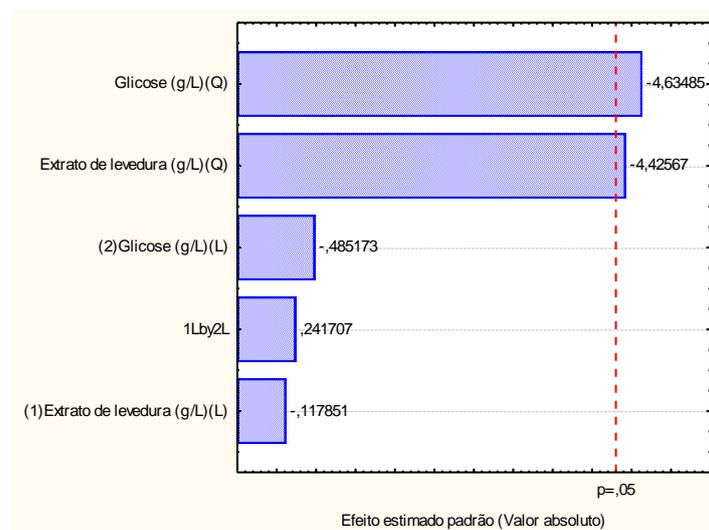


Figura 44: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto 2-FEA.

A equação 3 representa o modelo codificado de segunda ordem, que descreve em área do pico de produção do composto de aroma 2-feniletil acetato (variável dependente) em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 32. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,92 e o F calculado (46,43) foi maior que o F tabelado (4,46), portanto o modelo proposto na equação 2 é válido, podendo ser obtida a superfície de resposta.

Área do pico de 2-FEA = $2779925 - 1082125 \times (\text{conc extrato de levedura})^2 - 1137927 \times (\text{Conc glicose})^2$ (Eq. 3)

Tabela 32: Análise de variância (ANOVA) para a produção do 2-FEA

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	1,077261E+15	2	5,386305E+14	46,43
Resíduo	9,279977E+13	8	1,159997125E+13	
Falta de ajuste	2,579786E+13	3		
Erro puro	6,700187E+13	2		
Total	1,170061E+15	10		

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,92$

$F_{9;7;5\%} = 4,46$

A análise da superfície de resposta e da curva de contorno (Figuras 45 e 46) mostra a região ótima (área vermelha mais escura da curva de contorno), onde obtém os maiores valores do composto. A região de máximos valores de produção foi utilizando 27g/L de extrato de levedura e 55g/L de glicose.

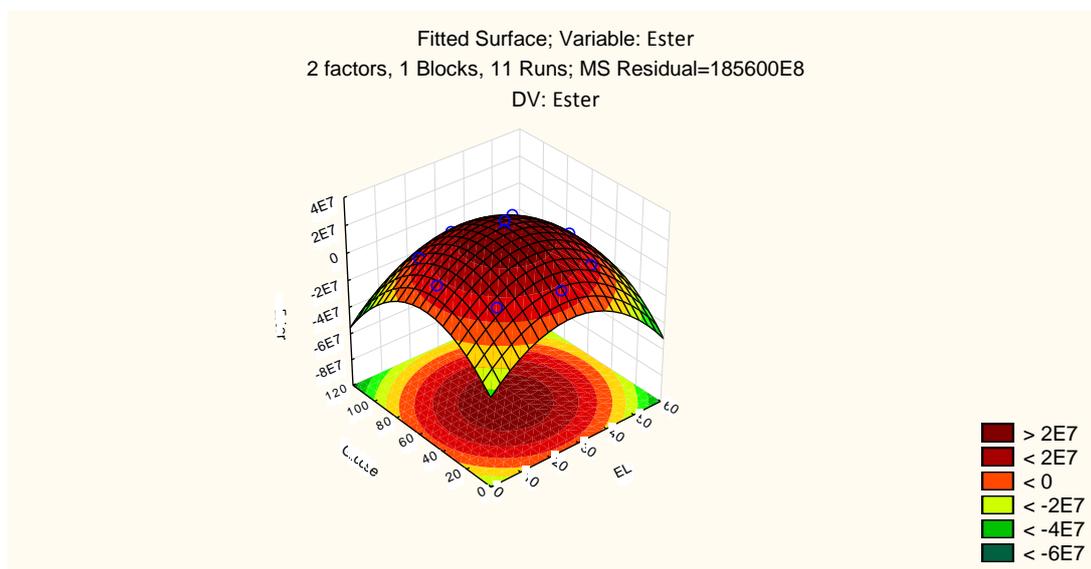


Figura 45: Superfície de resposta para a produção do composto de aroma 2-FEA demonstrando o efeito das concentrações de glicose e extrato de levedura

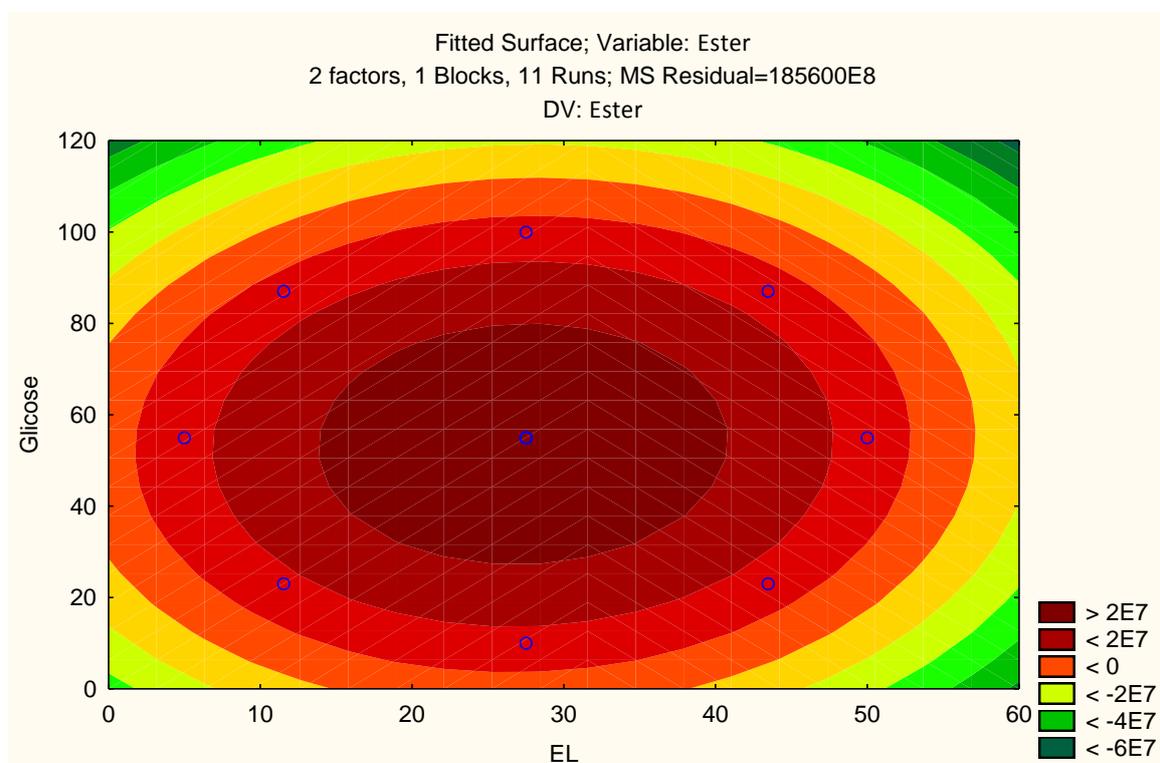


Figura 46: Curvas de contorno para a produção do composto 2-FEA de acordo com as variações nas concentrações de glicose e extrato de levedura.

3.3.2.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para o β -cariofileno

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fracionado onde apenas a agitação e quantidade de resíduo tiveram seus valores extrapolados (Tabela 33), foi realizado um planejamento do tipo DCCR 2², sendo 4 pontos axiais e 3 centrais, totalizando 11 experimentos. Nestes experimentos, foram fixadas as condições de temperatura (30°C), glicose (25 g/L) e extrato de levedura (5 g/L).

A maior produção do β -cariofileno ocorreu em 24 h de fermentação apenas para os ensaios 1, 9, 10 e 11, e 48 h para os demais ensaios. A máxima de produção do β -cariofileno variou entre 334 a 1159 $\mu\text{Mol/L}$ em todos os ensaios realizados (Tabela 33), sendo a maior concentração obtida para os experimentos do ponto central do planejamento (127 g/L de resíduo e 162,5 rpm de agitação).

Tabela 33: Valores reais e codificados da matriz do planejamento experimental para a produção de β -cariofileno e variável resposta em concentração ($\mu\text{Mol/L}$) do pico cromatográfico.

Ensaio	Resíduo (g/L)	Agitação (rpm)	Concentração ($\mu\text{Mol/L}$)
1	55 (-1)	100 (-1)	499.7
2	200 (+1)	100 (-1)	568.2
3	55 (-1)	224 (+1)	787.6
4	200 (+1)	224 (+1)	940.6
5	25 (-1,41)	162,5 (0)	334.3
6	230 (+1,41)	162,5 (0)	426.9
7	127 (0)	75 (-1,41)	397.7
8	127 (0)	250(+1,41)	787.6
9	127 (0)	162,5 (0)	1151.9
10	127 (0)	162,5 (0)	1159.2
11	127 (0)	162,5 (0)	977.0

Os diversos cromatogramas demonstrando o pico do composto β -cariofileno estão apresentados na Figura 47. O pico do composto foi identificado, em média, com 15,15 min de corrida. Os picos sobrepostos (Figura 47) correspondem a produção do composto a cada 24 h de fermentação, sendo que 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 a menor quantidade de resíduo 25 g/L de glicose e 162,5 rpm de agitação.

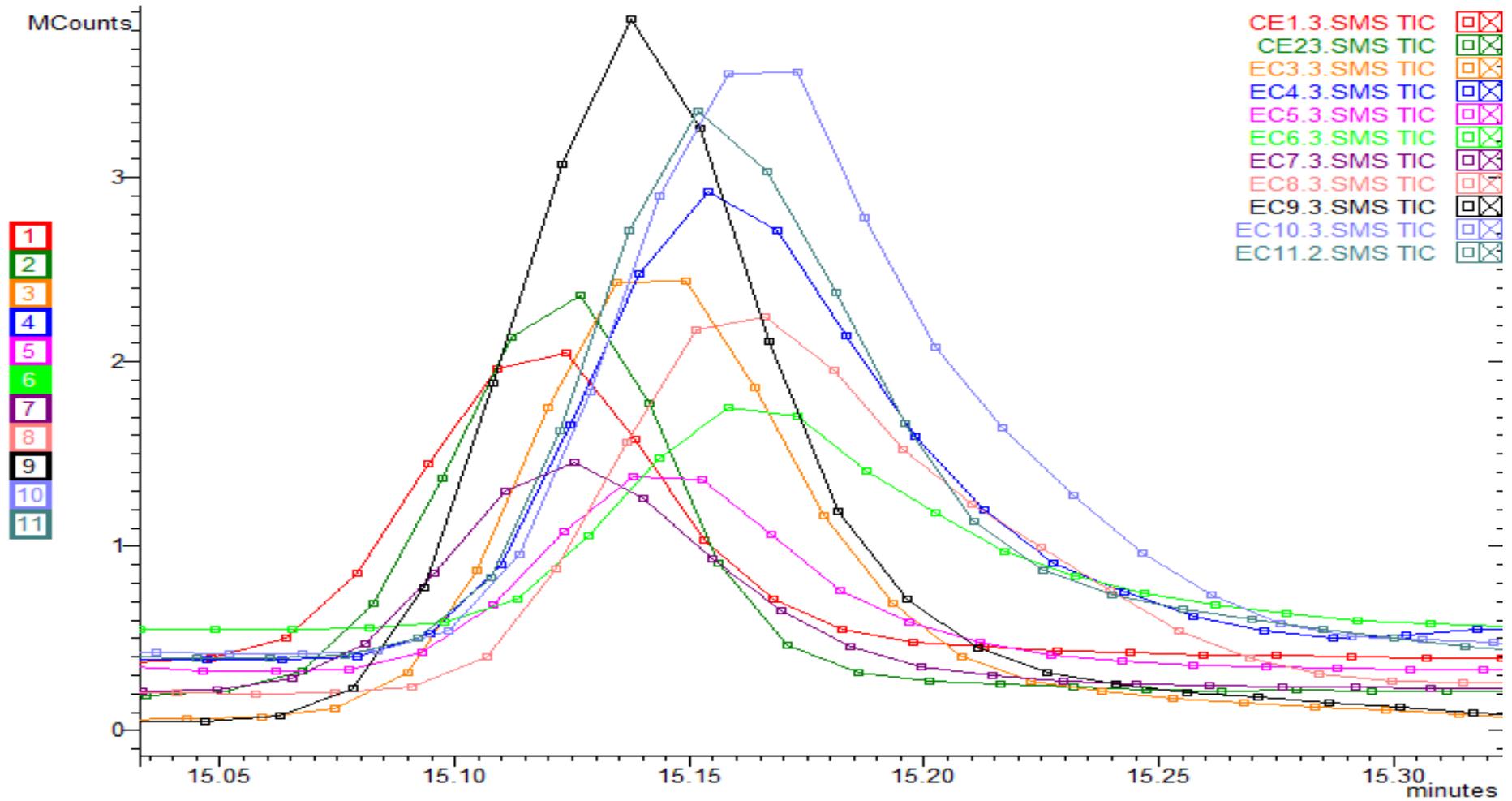


Figura 47: Cromatograma dos íons totais demonstrando o pico do composto β -cariofileno nas diversas condições do planejamento DCCR.

O gráfico de pareto, representado pela Figura 48, demonstra que para a produção do β -cariofileno a concentração de resíduo e a agitação influenciaram significativamente ($p < 0,05$), de forma negativa, ou seja, quanto menor os valores destes parâmetros maior a produção composta na faixa de valor estudada.

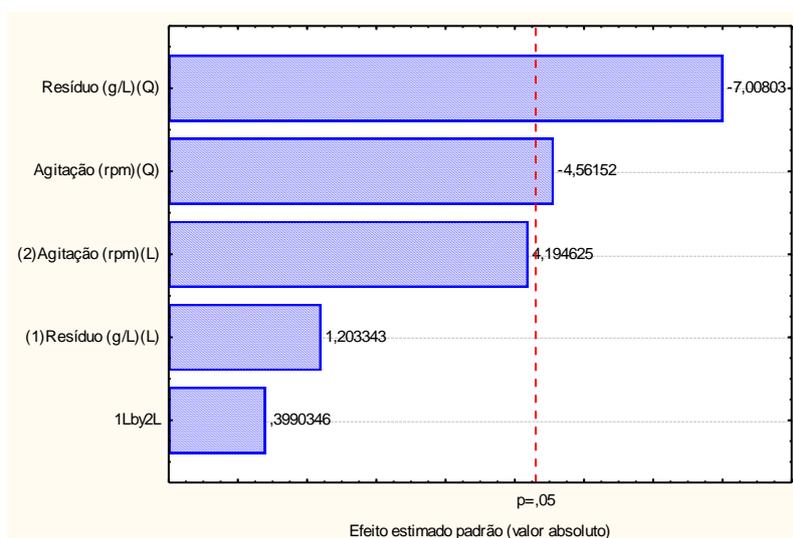


Figura 48: Gráfico de pareto para a estimativa de efeitos do planejamento fatorial completo na produção do composto de aroma β -cariofileno.

A equação 3 representa o modelo codificado de segunda ordem, que descreve em área do pico de produção do composto de aroma β -cariofileno em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo empírico obtido foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 34. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,87 e o F calculado (27,49) foi maior que o F tabelado (4,46), portanto o modelo proposto na equação 3 é válido, podendo ser obtida a superfície de resposta.

$$\text{Área do pico de CAR} = 15118079 - 4174815 [\text{Resíduo}]^2 - 2725105 (\text{agitação})^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Tabela 34: Análise de variância (ANOVA) para a produção de CAR

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	1,50027513E+14	2	7,50137565E+13	27,49
Resíduo	2,1827387E+13	8	2,728423375E+12	
Falta de ajuste	1,782072E+13	3		
Erro puro	4,006667E+12	2		
Total	1,718549E+14	10		

Coeficiente de correlação $R^2 = 0,87$

$F_{9;7;5\%} = 4,46$

A análise da superfície de resposta e da curva de contorno (Figuras 49 e 50) mostra a região ótima (área vermelha mais escura da curva de contorno), onde obtém os maiores valores de β -cariofileno. A região de máximos valores de produção do composto foi utilizando 127g/L de resíduo e 162 rpm.

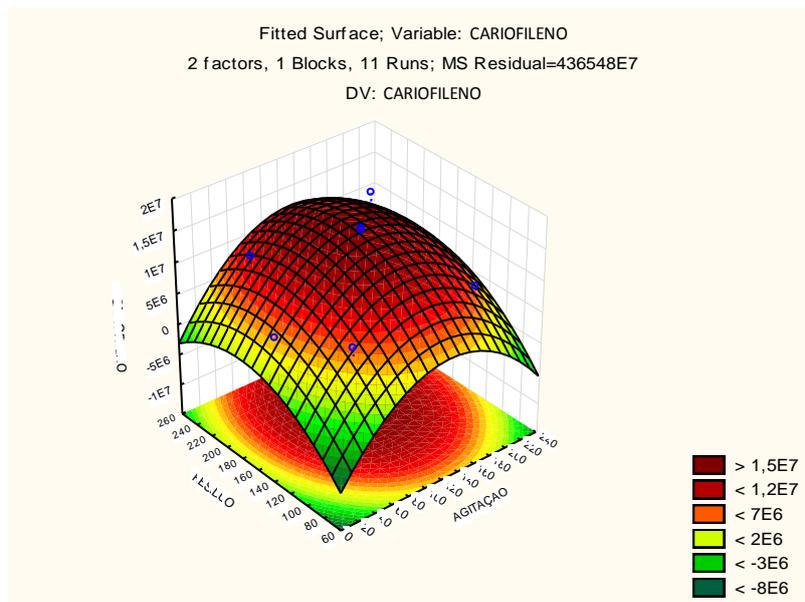


Figura 49: Superfície de resposta para a produção do composto de aroma β -cariofileno demonstrando o efeito da concentração de resíduo e agitação

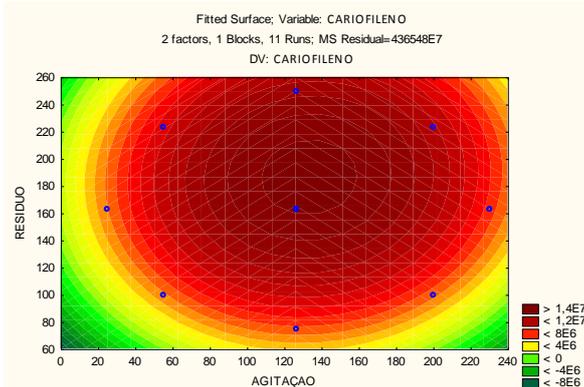


Figura 50: Curvas de contorno para a produção do composto β -cariofileno de acordo com as variações nas concentrações de resíduo e agitação.

3.3.3 Monitoramento da produção dos compostos de aroma durante a fermentação

O acompanhamento da produção dos compostos 2-feniletanol (2-FE), 2-fenilacetato (2-FEA) e β -cariofileno (CAR) foi estudada retirando-se alíquotas a cada 24h na melhor condição de fermentação de acordo com o planejamento experimental (DCCR) para cada composto de interesse durante o período total de 96h. Os cromatogramas dos compostos estão apresentados nas Figuras 51, 52 e 53 para os compostos 2-FE, 2-FEA e CAR, respectivamente. Analisando a produção do CAR durante a fermentação é possível verificar que o mesmo está presente em quantidade significativa desde o tempo 0h, uma vez que esse composto é originalmente do resíduo de goiaba. No entanto, o aumento da intensidade durante a fermentação pode ser atribuído ao processo biotecnológico.

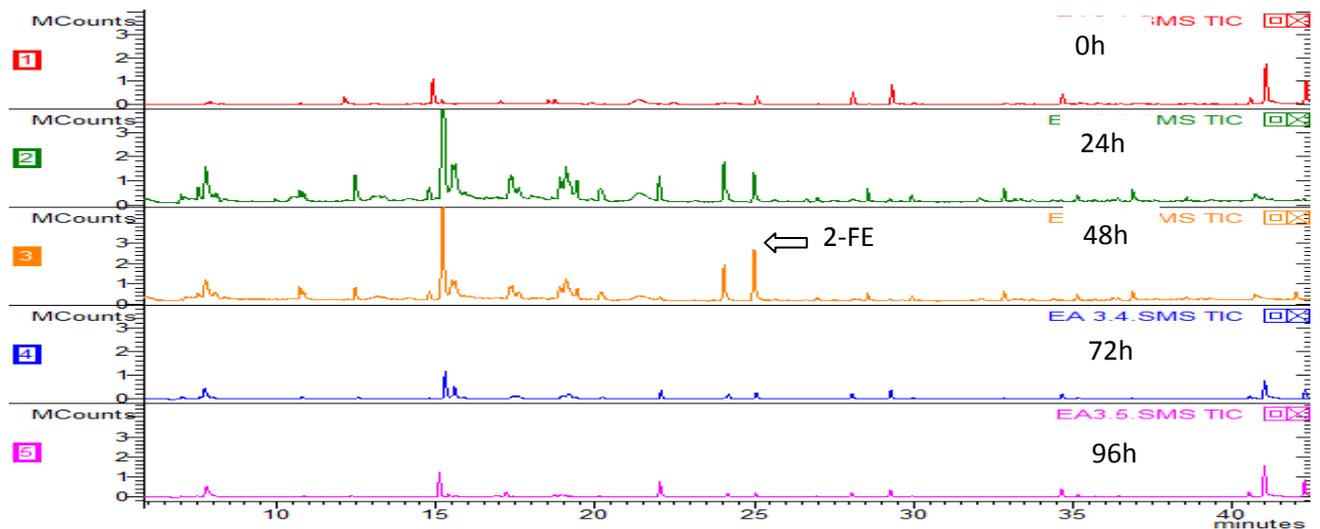


Figura 51: Acompanhamento da produção do 2-FE durante as 96h de fermentação da *Kluyveromyces lactis* usando resíduo de goiaba como substrato.

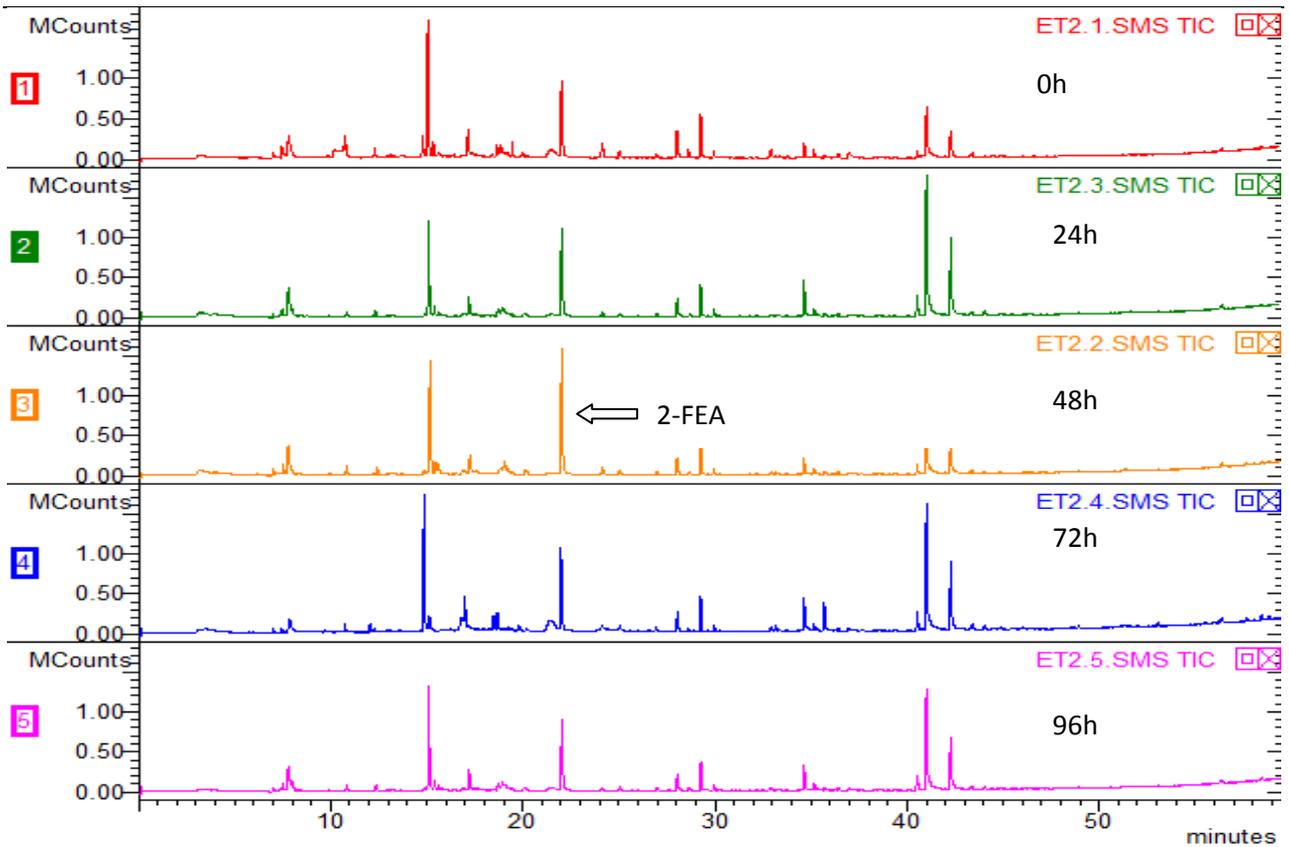


Figura 52: Acompanhamento da produção do 2-Fea durante as 96h de fermentação da *Kluyveromyces lactis* usando resíduo de goiaba como substrato.

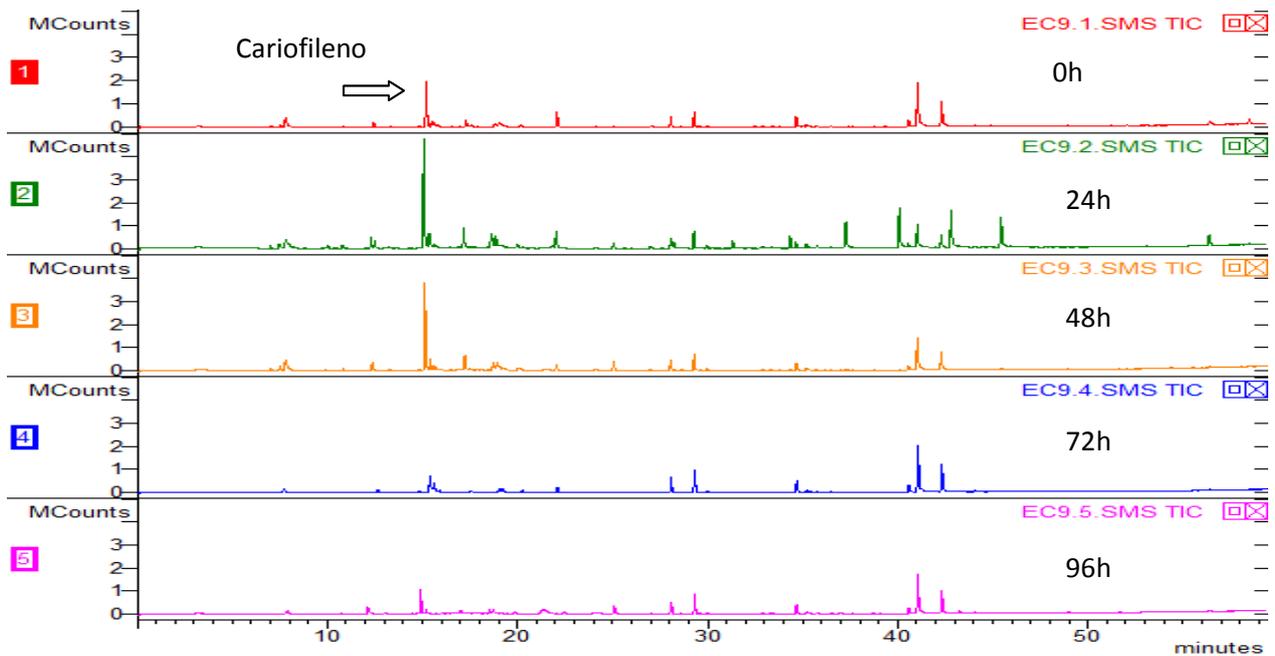


Figura 53: Acompanhamento da produção do β -cariofileno durante as 96h de fermentação da *Kluyveromyces lactis* usando resíduo de goiaba como substrato.

3.3.4 Cinética do consumo de substrato e variação de pH e °Brix

O consumo de substrato e as variações de pH e Brix durante os processo de obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR foram acompanhados durante 4 dias de fermentação. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 54, 55 e 56.

Os valores de pH oscilaram entre 5,8 a 4,3. O pH reduziu durante o processo fermentativo com um discreto mas pequeno aumento no final da fermentação. Esta variação pode ser atribuída provavelmente a formação de compostos ácidos ou devido a formação de íons de hidrogênio associado ao crescimento microbiano (Starzack et al.,1994). Com relação ao teor de sólidos solúveis os valores de 2-FEA iniciaram com valores mais elevados (8,2°Brix), seguido pelo 2-FE (4,97°Brix) e CAR (3,36°Brix). Esses valores distintos são resultados das diferentes condições de fermentação utilizadas para cada composto de interesse. No entanto, o comportamento de redução do teor de sólidos solúveis durante a fermentação foi o mesmo para todos os compostos, entretanto, o percentual de redução do °brix foi variado, sendo 43, 32 e 65% para os compostos 2-FEA, 2-FE e CAR, respectivamente.

O consumo de substrato, em função da determinação de ART, foi significativo desde as primeiras 24h de fermentação, sendo mais acentuado durante a produção de CAR e 2-FEA. O consumo do substrato atingiu cerca de 90% em 48 h durante a produção de 2-FEA e 2-FE e em 72 h durante a produção de CAR. Diante dos resultados obtidos, observou-se que a glicose foi essencial para o processo fermentativo, tendo em vista que a produção máxima desses compostos foi obtida em 48h de fermentação.

Starzak et al. (2007) afirmam que a inibição do crescimento microbiano ocorre por uma alta concentração de produto e/ou substrato. Fato que pode ter acontecido com os produtos fermentados obtidos, uma vez que após a otimização do processo altas concentrações de compostos voláteis foram obtidas.

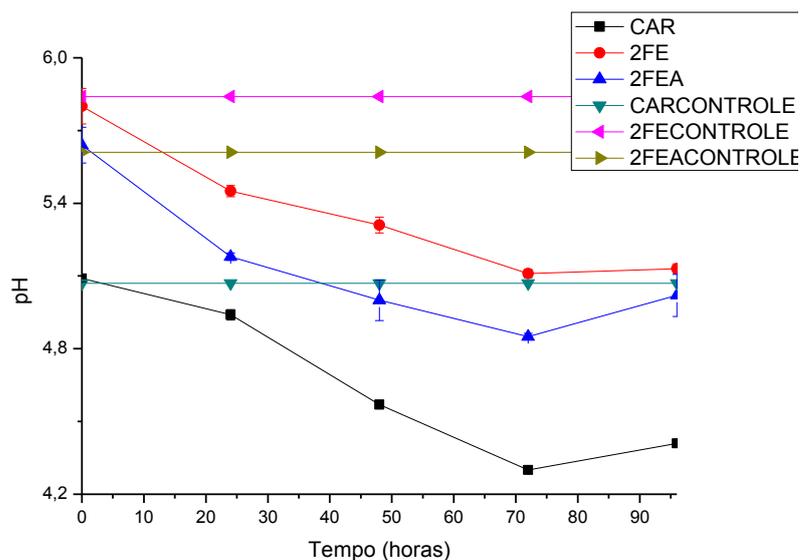


Figura 54: Acompanhamento do pH durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.

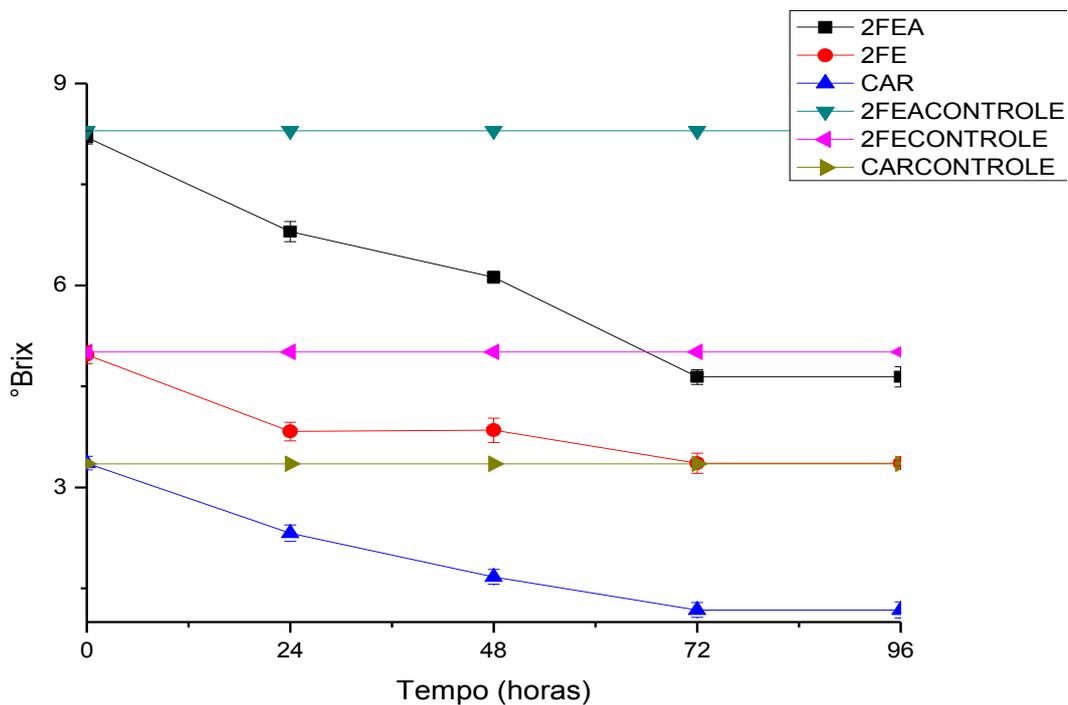


Figura 55: Acompanhamento do °Brix durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.

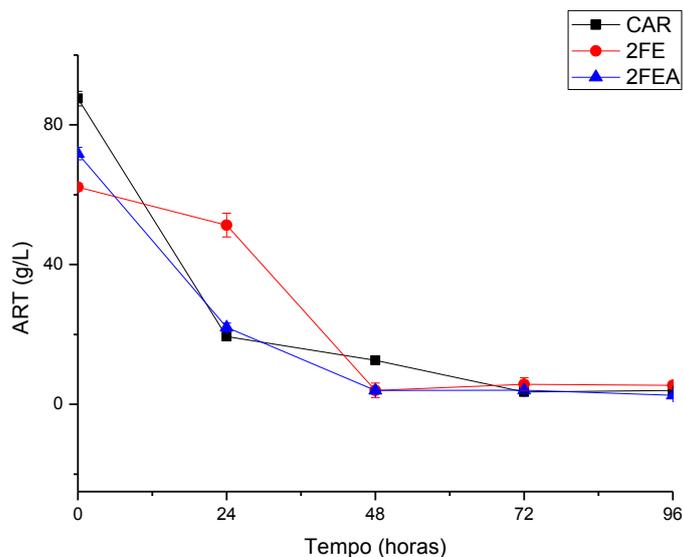


Figura 56: Acompanhamento do ART durante a fermentação para a obtenção dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR.

3.3.5 Processo biotecnológico para a obtenção de compostos de aroma em biorreator de bancada

Após a otimização do processo biotecnológico de produção dos compostos 2-feniletanol (2-FE), 2-feniletil acetato (2-FEA) e β -cariofileno (CAR) em frascos agitados, realizou-se o escalonamento do processo em Biorreator de bancada de 2,5L. A fermentação foi realizada para cada composto de interesse (2-FE, 2-FEA e CAR) utilizando as condições operacionais ótimas onde obteve-se a máxima produção dos mesmos nos experimentos em frascos agitados. Os compostos voláteis foram analisados através de análises cromatográficas de *headspace*, utilizando as técnicas MEFS e P & T.

3.3.5.1 Análise dos compostos de interesse através da técnica MEFS

Os compostos voláteis dos fermentados obtidos em frascos agitados e no biorreator foram analisados utilizando a técnica de MEFS para cada composto de interesse. Para fins de comparação, nas Figuras 57, 58 e 59 estão apresentados os cromatogramas obtidos na produção do 2-FE, 2-FEA e β -cariofileno, respectivamente, em biorreator e em frascos agitados.

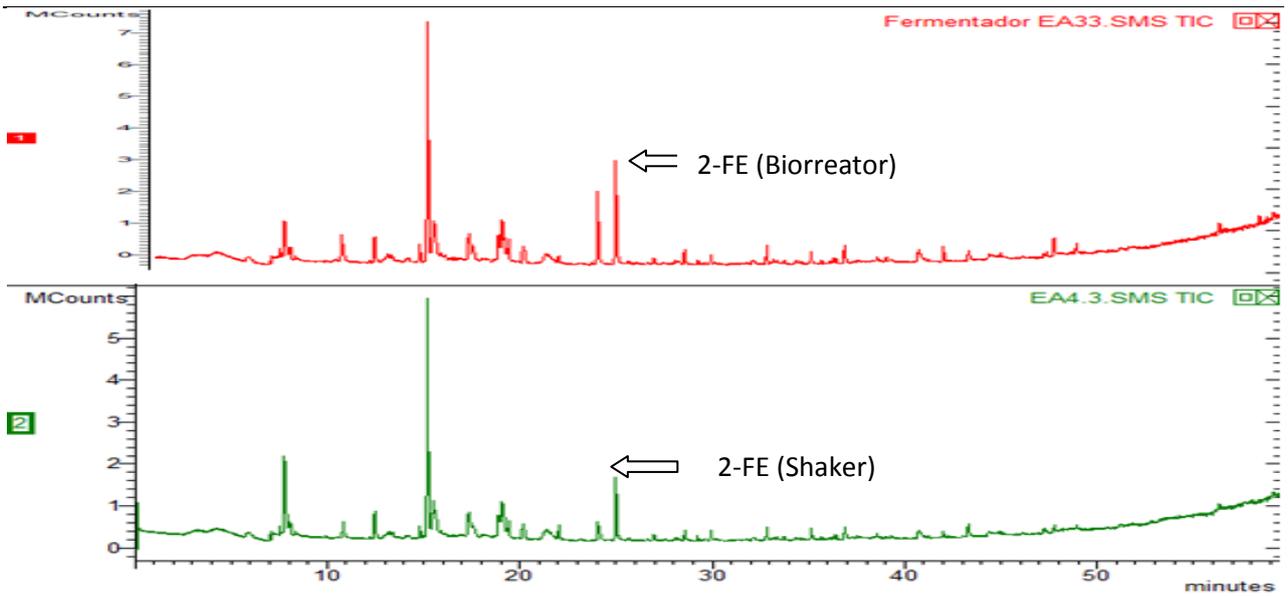


Figura 57: Cromatograma dos íons totais da produção do 2-FE no biorreator e no shaker

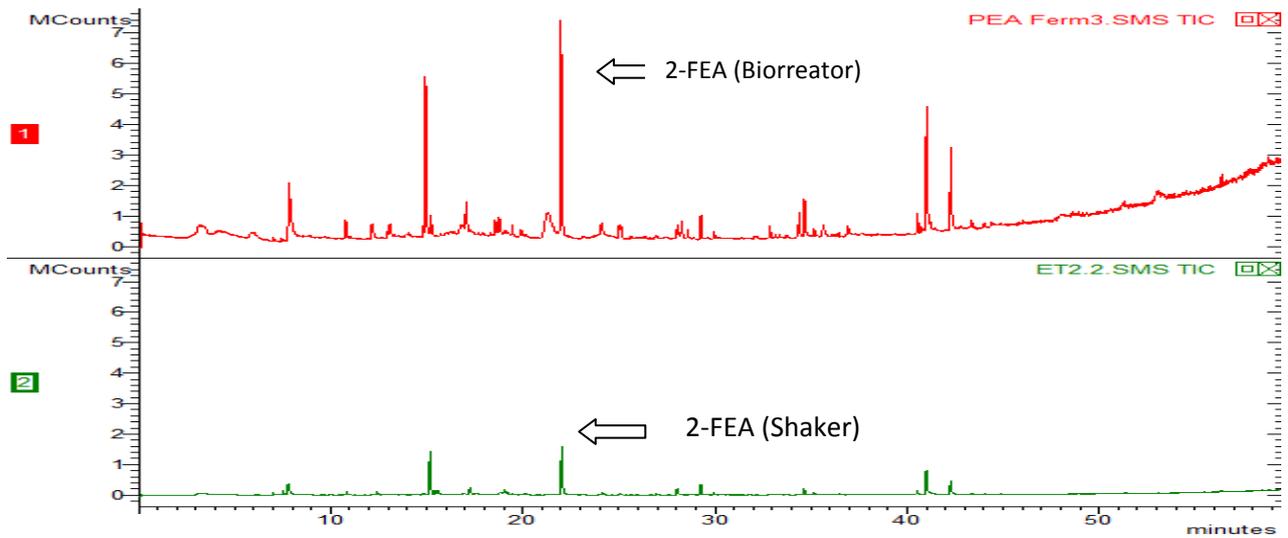


Figura 58: Cromatograma dos íons totais da produção do 2-FEA no biorreator e no shaker

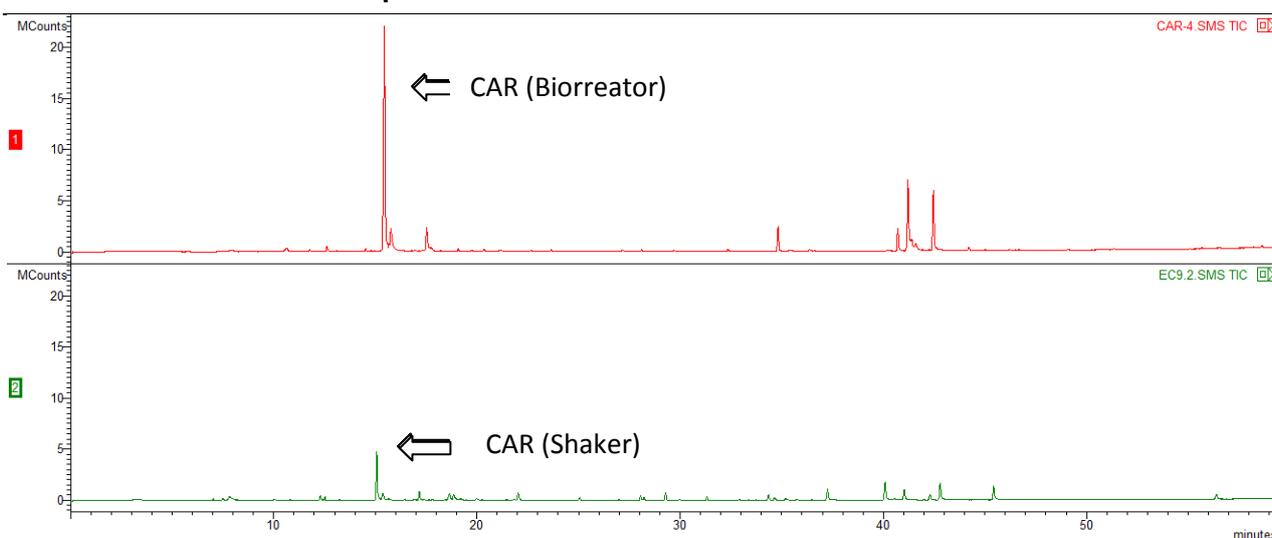


Figura 59: Cromatograma dos íons totais da produção do β -cariofileno no biorreator e no shaker

Foi obtido um escalonamento eficiente, sendo que a produção de β -cariofileno e 2-FE aumentou cerca de 6 vezes quando o processo foi realizado em biorreator e para o 2-FEA o aumento foi de 1,5 vezes em relação a produção destes compostos em frascos agitados. Essas diferenças provavelmente podem ser decorrentes do maior controle das variáveis do processo agitação e temperatura, as quais foram estáveis durante as fermentações em biorreator em comparação aos experimentos em frascos agitados (Larroche et al., 1988; Van der Shaft et al., 1992). Boluda-Aguilar & López-Gómez (2013) avaliando a produção de vários produtos (bioetanol, ácido galacturônico e δ -limoneno) utilizando resíduo de casca de limão como substrato também observaram esse mesmo comportamento.

O acompanhamento da produção dos compostos 2-FE, 2-FEA e β -cariofileno está apresentada nas Figuras 60, 61 e 62. É possível verificar o comportamento da produção dos compostos avaliados ocorrendo de maneira similar no biorreator e em frascos.

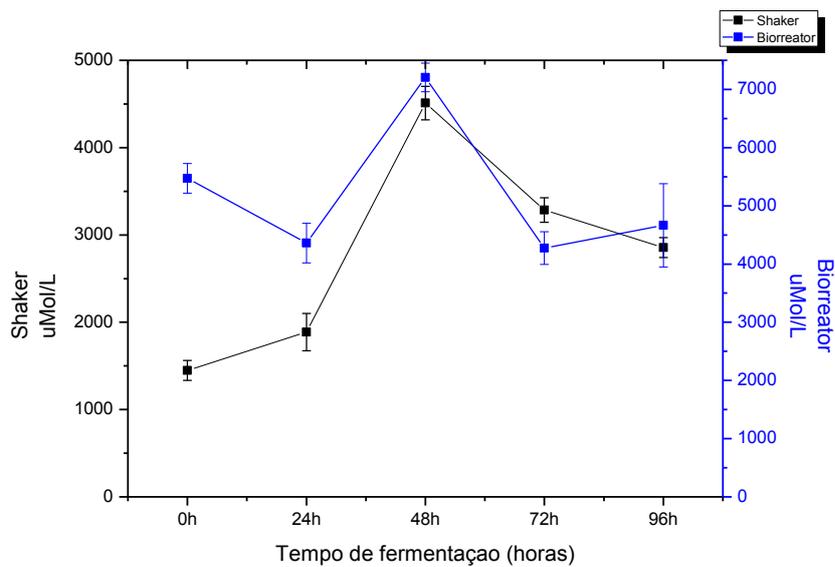


Figura 60: Monitoramento da produção do 2-FE no shaker e no biorreator

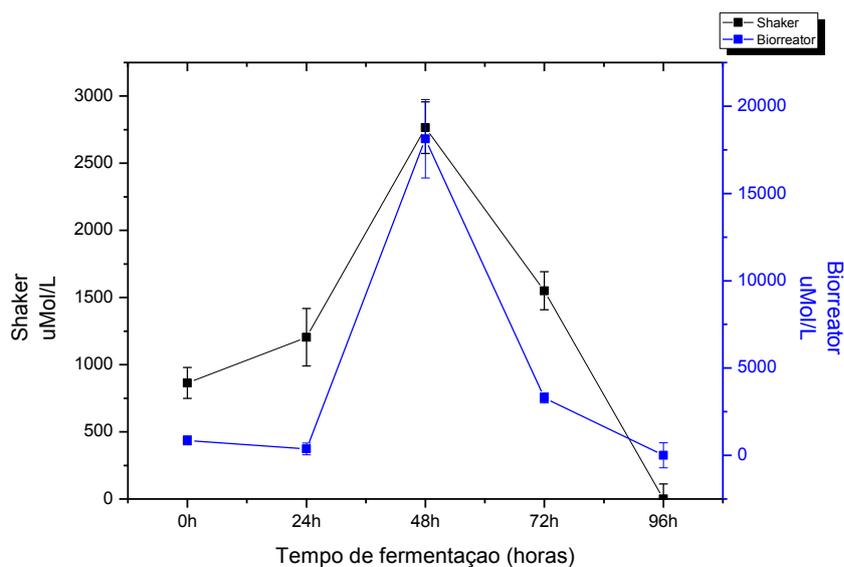


Figura 61: Monitoramento da produção do 2-FEA no shaker e no biorreator

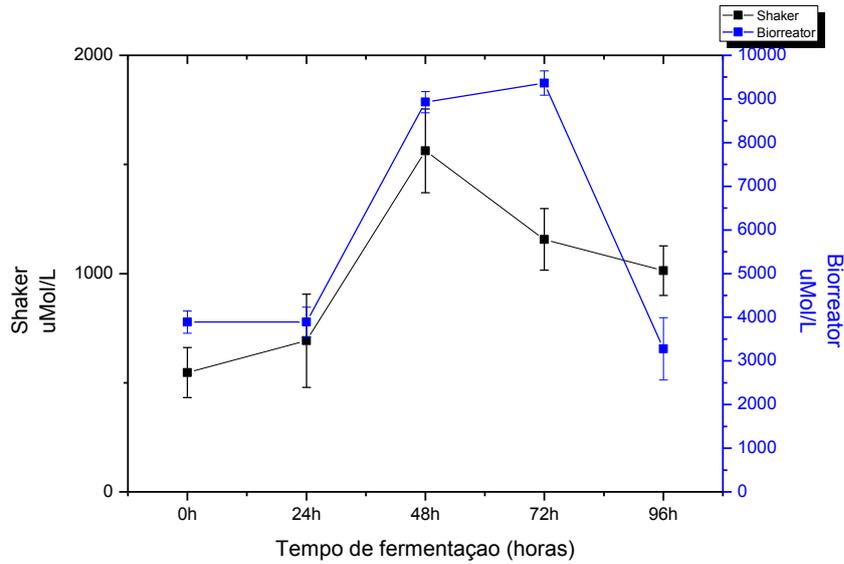


Figura 62: Monitoramento da produção do CAR no shaker e no biorreator

3.3.5.2 Análise dos compostos de interesse através da técnica *Purge and Trap*

Os compostos de interesse obtidos no fermentador também foram avaliados pela técnica de *Purge and Trap*, utilizando o sistema Atomx. É possível perceber na Figura 63 que os compostos 2-FE, 2-FEA e CAR apresentam comportamento similar ao descrito utilizando a técnica MEFS, mas com intensidade superior.

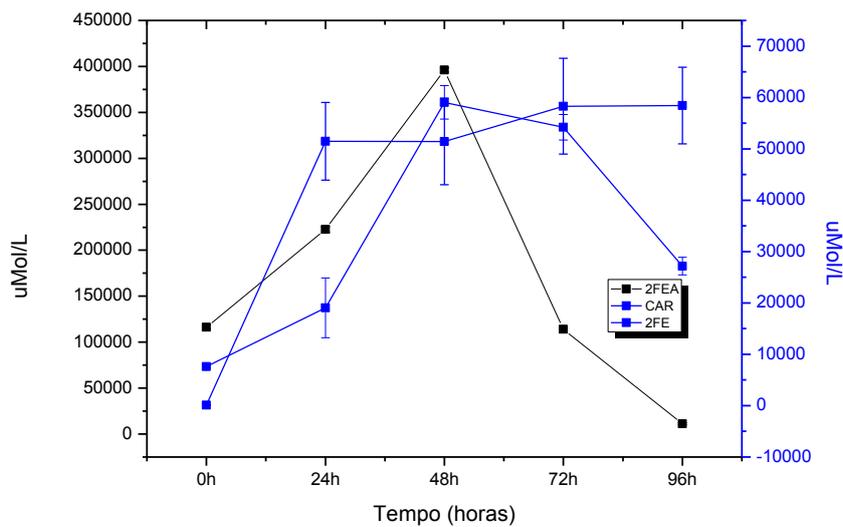


Figura 63: Monitoramento da produção do 2-FE obtido no fermentador utilizando a técnica do *Purge & Trap*

Dentre todos os resultados obtidos foi possível verificar que a máxima produção para todos compostos (2-FE, 2-FEA e CAR) ocorreu no biorreator utilizando a técnica de Purge and Trap. O 2-feniletanol apresentou um máximo de produção durante a fermentação com 48h, com um valor de 9,7 g/L em biorreator. Hua & Xu (2011), em uma revisão sobre a produção deste composto por diferentes microrganismos, reportou melhores rendimentos desse álcool quando utilizou cepas de *Kluyveromyces*, como por exemplo, Etschmann et al. (2004) que obteve 5,6 g/L utilizando como microrganismo uma cepa de *Kluyveromyces marxianus*. Os valores encontrados para este trabalho superam em quase 75% a quantidade produzida deste composto. Essa elevação na produção provavelmente ocorreu por alterações na temperatura, cultura de microrganismo utilizada, pH inicial e velocidade de agitação durante a fermentação como sugerido por Huang et al. (2001).

Na quantificação do acetato de 2-feniletil o valor máximo encontrado também foi em 48h de fermentação com uma produção equivalente a 65,6 g/L. Lee et al. (2010) utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, *Williopsis saturnus* e uma cultura mista destes dois microrganismos, na fermentação do suco de mamão papaia para obtenção de vários compostos aromáticos, dentre eles o acetato de 2-feniletil, constatou que o microrganismo *Williopsis saturnus* teve melhor desempenho na produção do composto com um valor de 2,42 (v/v). Janssens et al. (1992) aborda em seu trabalho que *Williopsis saturnus* tem grande poder de converter facilmente álcoois em seus ésteres correspondentes. Etschmann et al. (2005) e Etschmann & Scharader (2006) obtiveram 5,9 g/L e 6,1 g/L, respectivamente, desse éster utilizando *Kluyveromyces marxianus* em meio sintético. Os valores encontrados neste trabalho superam o encontrado pela literatura provavelmente por um poder de conversão maior da *Kluyveromyces lactis* do que os microrganismos estudados por esses autores.

Para o β -cariofileno o presente estudo encontrou em período máximo de produção (48h) a quantidade de 9,6 g/L. Não foram encontrados na literatura trabalhos relatando a produção de β -cariofileno pela via biotecnológica. Entretanto, Jélen et al. (1995) estudaram a produção de sesquiterpenos por diversas cepas de *Fusarium sambucinum* em meio sintético e encontraram compostos como isocariofileno (11,2%), longifolene (20,6%), acoradiene (11,2%). Em outro trabalho, Reinsvold et al. (2011) estudaram a produção de β -cariofileno por uma cepa transgênica de *Synechocystis* em meio sintético e encontraram um valor de quantificação de 46,4 ng/ml de cultura/semana do composto. Diante do exposto este trabalho adquire uma importância significativa por representar um resultado inovador.

Outro aspecto interessante a ser salientado apresentado por este estudo foram os maiores valores de quantificação quando a técnica de extração utilizada foi a de *Purge and Trap*. Este comportamento está em concordância com o reportado por Povolo & Cantarini (2003) quando comparou a técnica de *Purge and Trap* com a técnica de MEFS para a análise de compostos voláteis de manteiga e constatou que por *Purge and Trap* a quantidade de compostos extraídos foi maior, assim como sua concentração. Elmore et al. (1997) e Vercaemmen et al.

(2000) reportam em seus estudos que esse maior poder de extração por Purge and Trap dá-se pelas seguintes razões: maior área superficial do Trap quando comparado a fibra de MEFS, maior afinidade do Tenax com a maioria dos compostos voláteis e um maior campo de extração na condição de headspace dinâmico maior no Purge and Trap.

3.4 CONCLUSÕES

- No planejamento fracionado realizado para os compostos alvos deste estudo (2-FE, 2-FEA e CAR), de todas as variáveis avaliadas (glicose, extrato de levedura, temperatura, quantidade de resíduo e agitação), a condição que apresentou influência entre os parâmetros foi apenas a agitação, de forma positiva, para os compostos 2-FE e CAR;
- As melhores condições de fermentação para obtenção do 2-FE: temperatura (30°C); concentração de resíduo de goiaba no meio (55 g/L); concentração de extrato de levedura (14g/L); agitação (228rpm) e concentração de glicose (5g/L);
- As melhores condições de fermentação para obtenção do 2-FEA foram: temperatura (30°C), agitação (75 rpm); concentração de resíduo de goiaba no meio (55 g/L); concentração de extrato de levedura (25 a 35g/L), concentração de glicose (40 a 60 g/L);
- As melhores condições de fermentação para obtenção do β -cariofileno foram: temperatura (30°C), concentração de glicose (25 g/L); concentração de extrato de levedura (5 g/L); concentração de resíduo de goiaba no meio (120 a 140g/L), e agitação (160 e 180 rpm);
- Dentre todos os resultados obtidos foi possível verificar que a máxima produção para os compostos - 2-FE de 9,7g/L; 2-FEA de 65,6g/L e CAR de 9,6g/L ocorreu no biorreator utilizando a técnica de *Purge and Trap*.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barga, M. C. Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade de Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

Boluda-Aguilar, M.; López-Gómez, A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, v. 41, p.188-197. 2013.

Burman, L.; Albertsson, A.C.; Hoglund, A. Solid-phase microextraction for qualitative and quantitative determination of migrated degradation products of antioxidants in an organic aqueous solution. *Journal of Chromatography A*, v. 1080, p.107-116. 2005.

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.

Elmore, J.S., Erbahadir, M.A., Mottram, D.S. Comparison of dynamics headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analyses of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.2638, 1997.

Etschmann, M.M.W.; Sell, D.; Schrader, J. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 92, p.624-634. 2005.

Etschmann MMW, Schrader J. An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 71, p.440-443. 2006.

Fonseca, G.G.; Gombert, A.K.; Heinzle, E.; Wittmann, C. Physiology of the *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, v.7, p.422-435, 2007.

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 fermentans* L-5 as Affected by Some Medium Components. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, p. 142-147, 2000.

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. 1. ed. Digital. São Paulo: IAL, 2008.

Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, v.27, p.195-215, 1992.

Jelén H.H., Mirocha C.J., Wasowicz E., Kamiński E., Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3815-3820. 1995.

Larroche, C.; Tallu, B.; Gros, J.B. Aroma production by spores of *Penicillium roqueforti* on a synthetic medium. *J. Ind. Microbiol.*, v.3, p.1-8, 1988.

Louvel, M.; Breunig, K. D.; Fukuhara, H. *Kluyveromyces lactis* – a review. *Molecular Microbiology*, v. 25, p. 139-188, 1996.

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.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.

Narain, N.; Galvão, M.S.; Madruga, M.S. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. *Food Chemistry*, v.102, p. 726-731. 2007.

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.

Povolo, M., Contarini, G. Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *Journal of Chromatography A*, v.985, p. 117-125, 2003.

Reinsvold, R.E., Jinkerson, R.E., Radakovits, R., Posewitz, M.C., Basu, C.. The production of the sesquiterpene b-caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Journal Plant Physiology*, v.168, p. 848–852. 2011.

Soccol, C.R.; Vandenbergue, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.205-218. 2003.

Souza, C.G.; Ledingham, W.M.; Morais, M.A. Utilization of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnological Letters*, v.23, p.1413-1416, 2001.

Stark, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., von Stockar, U. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.*18: 514–523. 2002.

Starzack, M.; Krzystek, L.; Nowicki, L.; Michalski, H. Macro-approach kinetics of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: experimental studies and mathematical modelling. *The Chemical Engineering Journal*, v. 54, p. 221-240, 1994.

Van der Shaft, P.H., ter Burg, N., van der Bosch, S.; Cohen, A.M.: Fed-batch production of 2-heptanone by *Fusarium poae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.709-711. 1992.



Vercammen, P. S., Baltussen E., Sandra T., David F. Considerations on static and dynamic sorptive and adsorptive sampling to monitor volatiles emitted by living plants. *Journal of High Resolution Chromatography*, v.23, p.547-553, 2000.

CONCLUSÕES

- Os microrganismos isolados a partir de frutas (goiaba, maracujá e umbu) apresentaram odor característico de aromas frutais/florais, sendo que os microrganismos isolados de goiaba e maracujá tiveram com maior potencial aromático;
- A levedura *Kluyveromyces lactis* obteve notas mais elevadas na análise sensorial quando comparada com outras culturas puras (*Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus*);
- Dentre os resíduos agroindustriais (goiaba, maracujá e umbu) estudados, o resíduo de goiaba foi o que apresentou maior potencial para a produção de aromas frutais por fermentação submersa utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis*;
- Entre os 43 compostos de aroma produzidos pela fermentação em meio contendo resíduo de goiaba utilizando a *K. lactis*, destacou-se a produção dos compostos 2-feniletanol e acetato de 2-fenetil acetato, os quais caracterizam alto valor comercial;
- A produção dos compostos voláteis foi bastante rápida, e essa produção iniciou a partir do primeiro dia de fermentação e teve o seu máximo entre 24-48h de fermentação;
- As melhores condições para obtenção do 2-FE: temperatura (30°C); concentração de resíduo de goiaba no meio (55 g/L); concentração de extrato de levedura (14g/L); agitação (228rpm) e concentração de glicose (5g/L);
- As melhores condições para obtenção do 2-FEA foram: temperatura (30°C), agitação (75 rpm); concentração de resíduo de goiaba no meio (55 g/L); concentração de extrato de levedura (25 a 35g/L), concentração de glicose (40 a 60 g/L);
- As melhores condições para obtenção do β -cariofileno foram: temperatura (30°C), concentração de glicose (25 g/L); concentração de extrato de levedura (5 g/L); concentração de resíduo de goiaba no meio (120 a 140g/L), e agitação (160 e 180 rpm);
- Na fermentação realizada no biorreator de 2L de capacidade foi possível obter produção quase 6 vezes maior para os compostos 2-feniletanol (9,7g/L) e β -cariofileno (65,6g/L), e 1,5 vezes para o acetato de 2-feniltil (9,6g/L) quando comparado com a produção em frascos erlenmeyers de 250mL de capacidade;
- Concluiu-se que o resíduo de goiaba e a levedura *Kluyveromyces lactis* podem ser utilizados para obter produtos de aroma frutal/floral (2-FE e 2-FEA) assim comprovando que os resíduos agroindustriais servirem como fontes de carbono de baixo custo.

APÊNDICE

Apêndice 1

Ficha sensorial

Nome: _____ Data: _____

Por favor, marque com um traço nas escalas abaixo a intensidade de cada nota de aroma percebida em cada amostra.

AMOSTRA

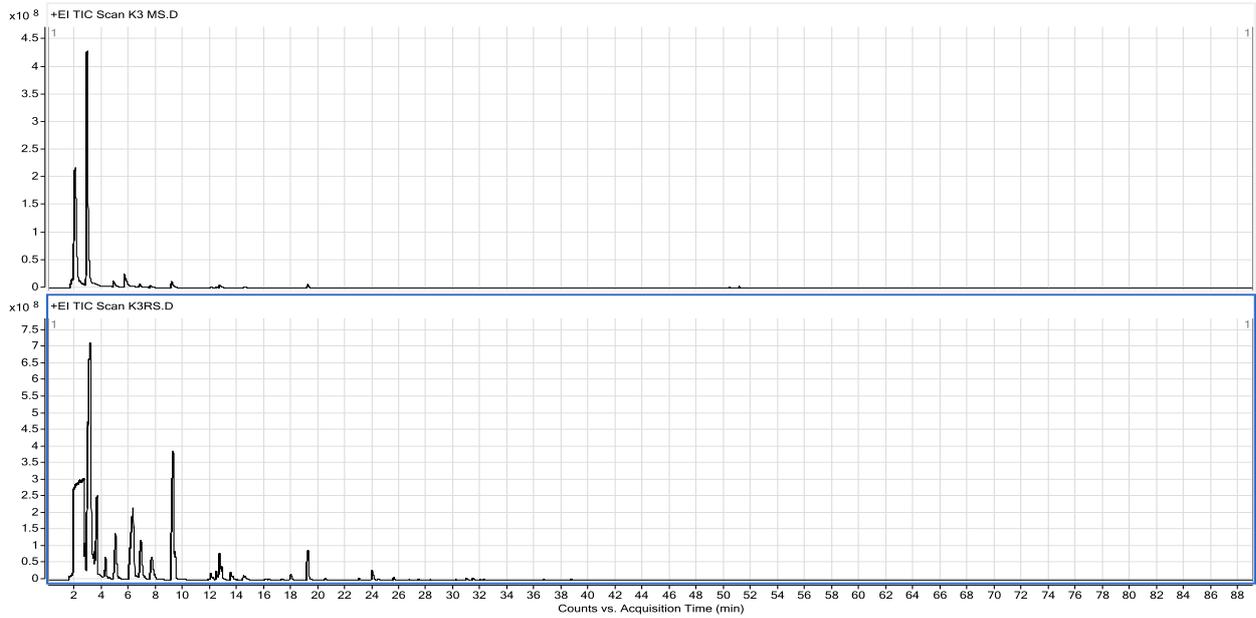
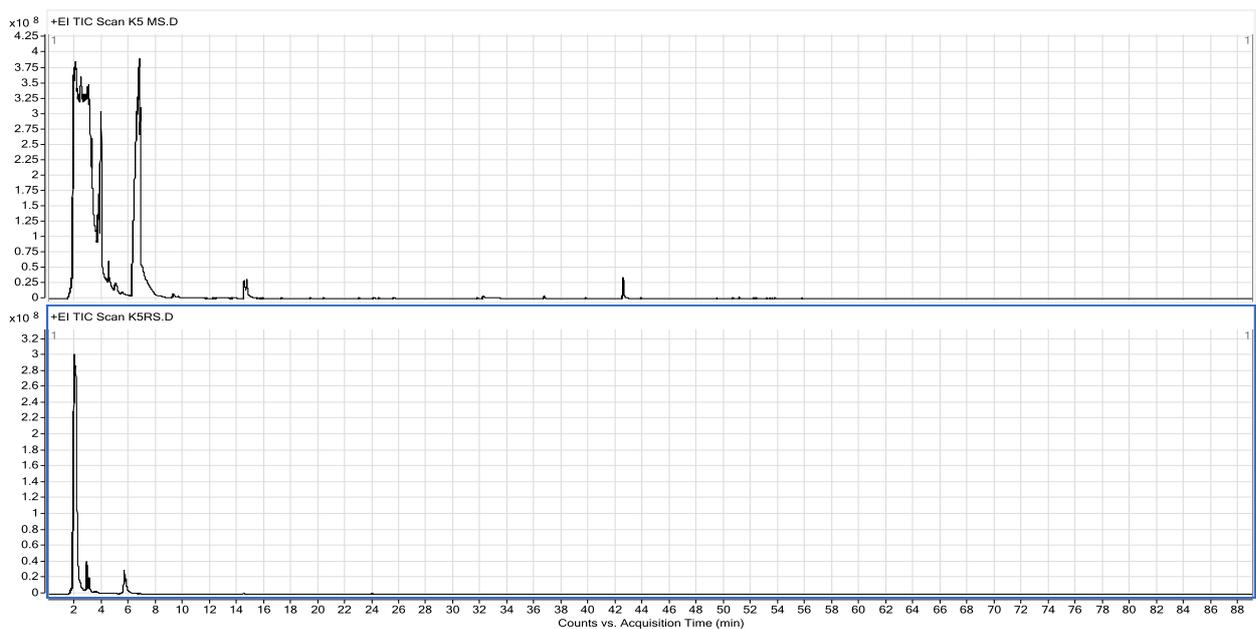
INTENSIDADE

	fraco	moderado	forte
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

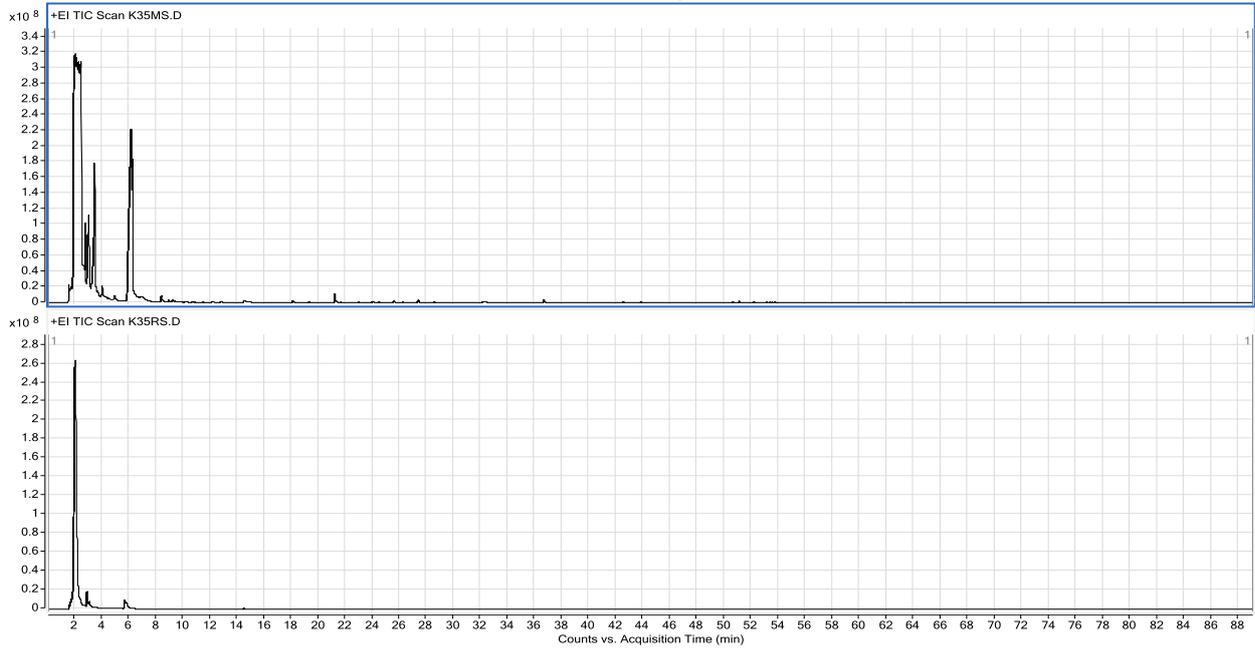
Comentários: _____

Cromatograma dos compostos voláteis dos produtos fermentados obtidos utilizando microrganismos isolados de maracujá e goiaba**Apêndice 2***Técnica Purge & Trap*

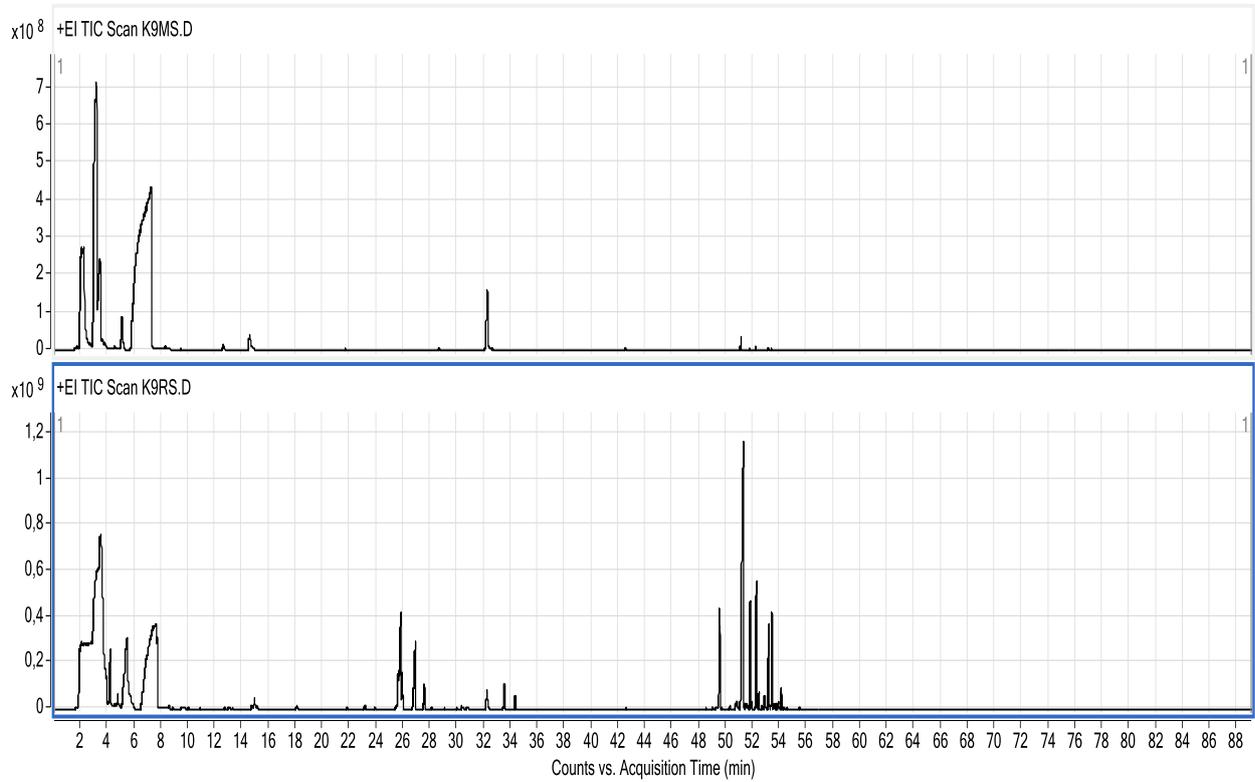
Coluna: Apolar

LAF 3: Meio sintético x Meio com resíduo de maracujá**LAF 5: Meio sintético x Meio com resíduo de maracujá**

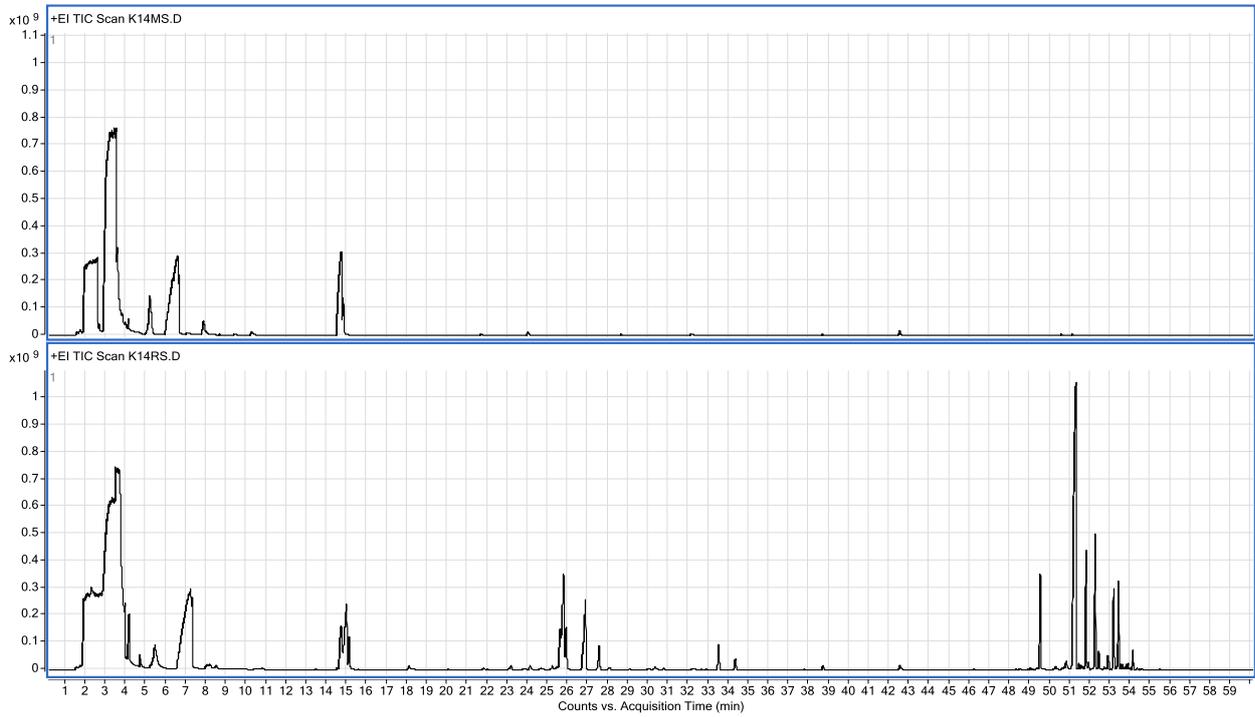
LAF35: Meio sintético x Meio com resíduo de maracujá



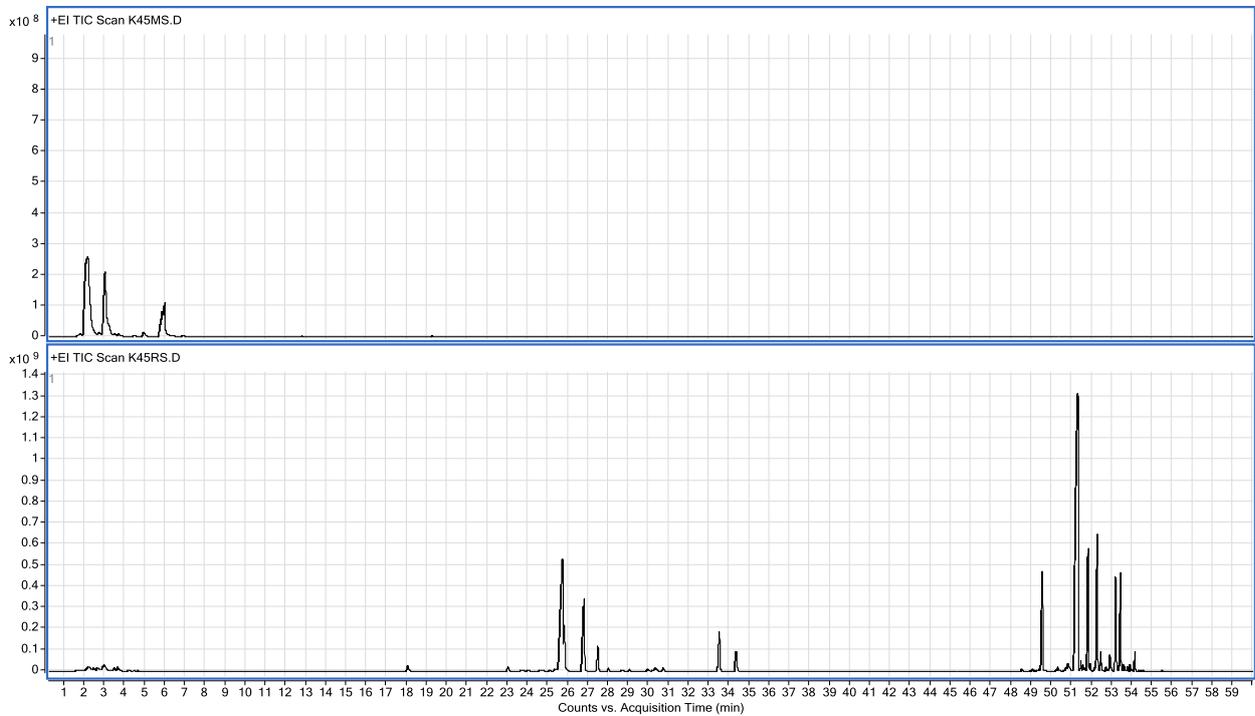
LAF9: Meio sintético x Meio com resíduo de goiaba

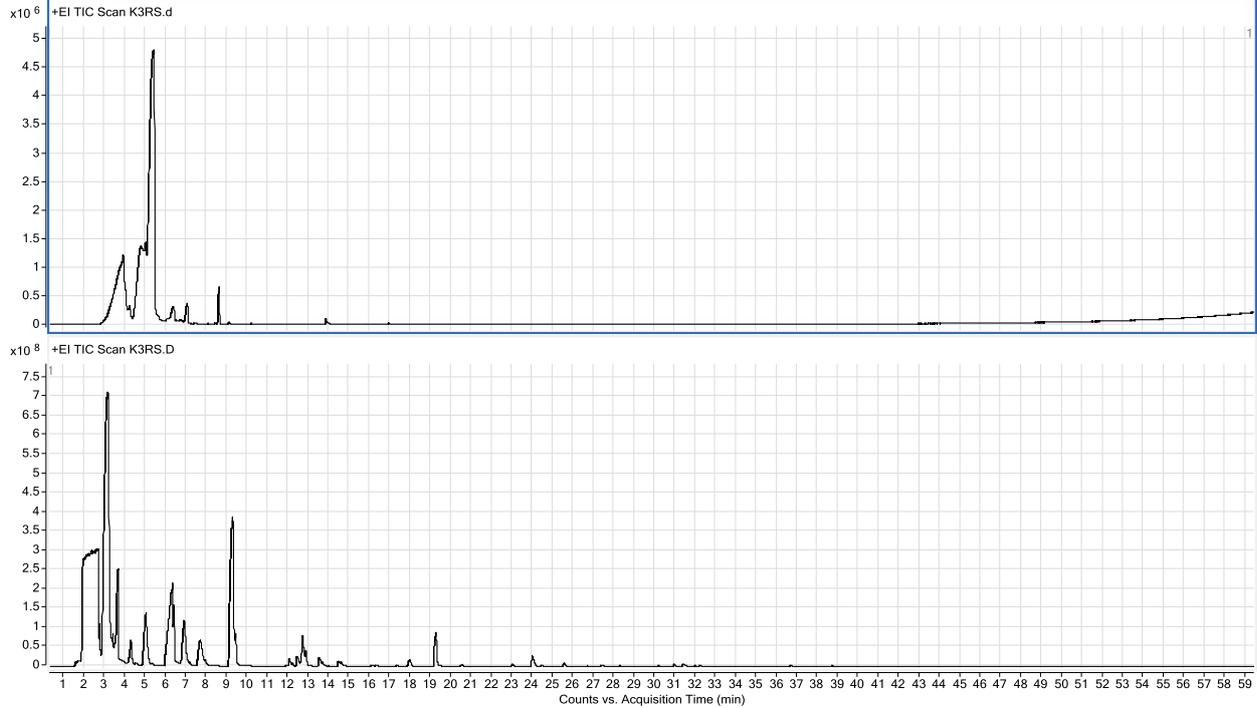
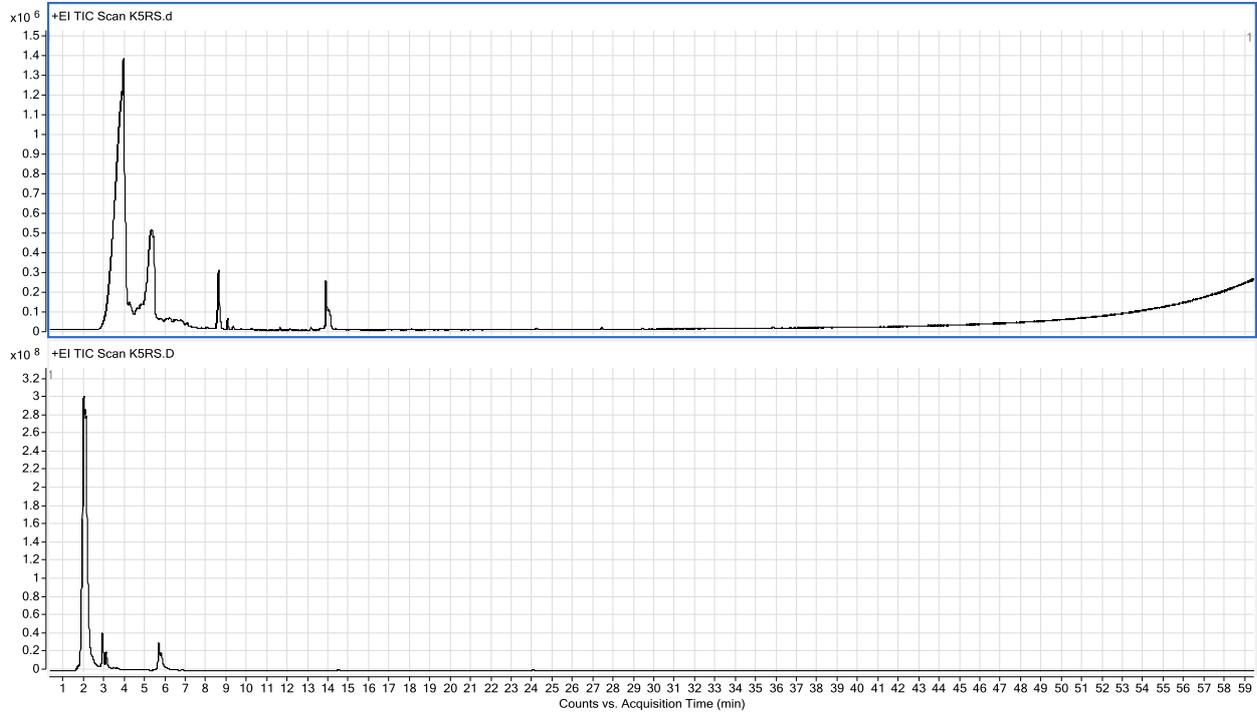


LAF14: Meio sintético x Meio com resíduo de goiaba

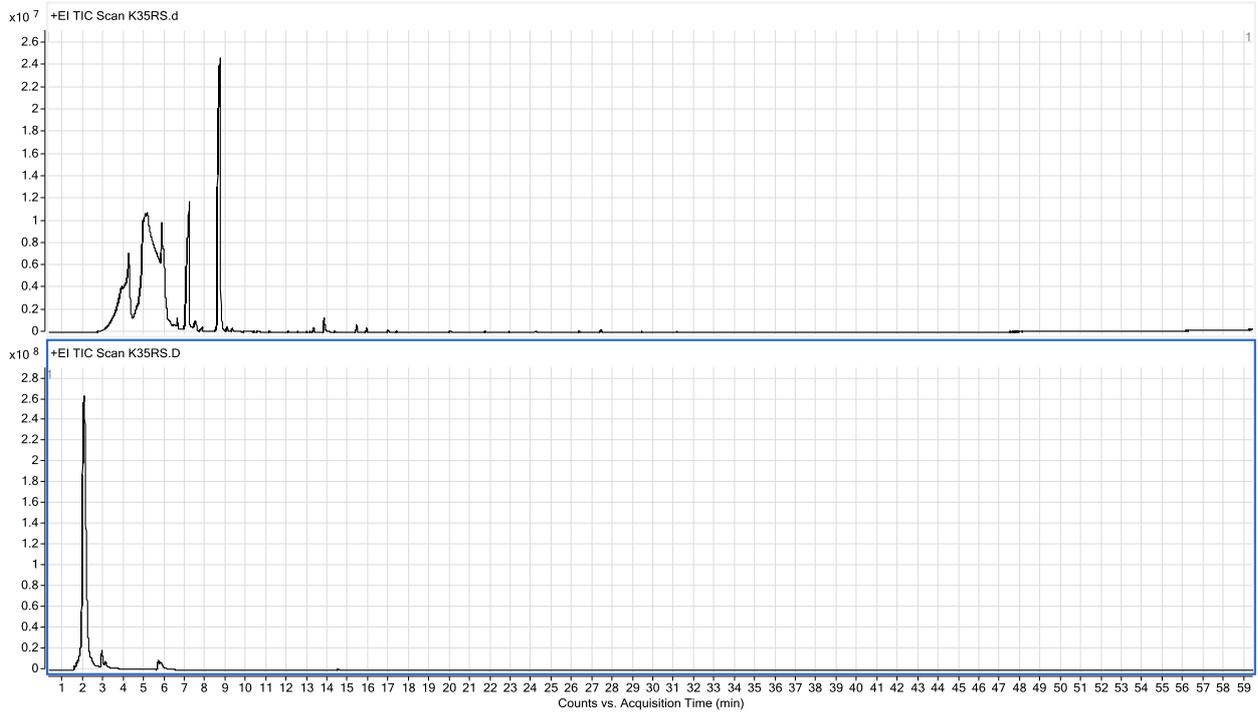


LAF45: Meio sintético x Meio com resíduo de goiaba

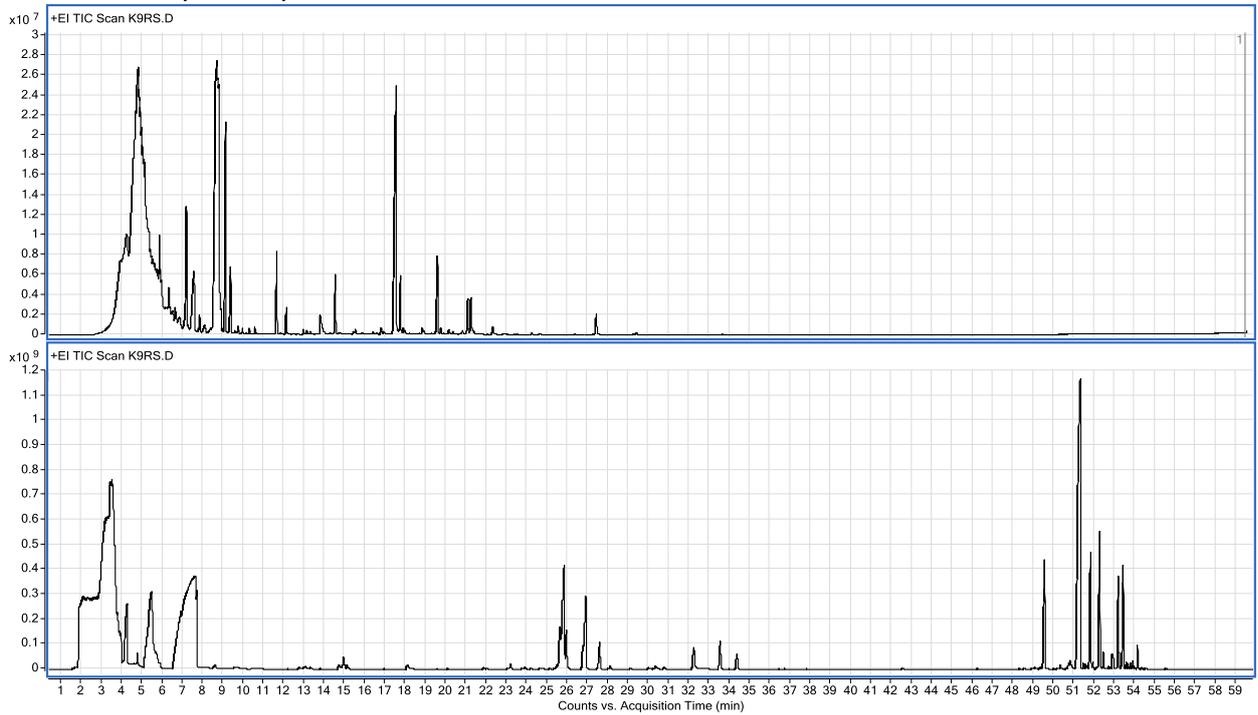


Técnica: Purge & Trap**Meio: resíduo de maracujá (LAF4, LAF5 e LAF35) ou goiaba (LAF9, LAF14 e LAF45)****LAF3: coluna apolar e polar****LAF 5: coluna apolar e polar**

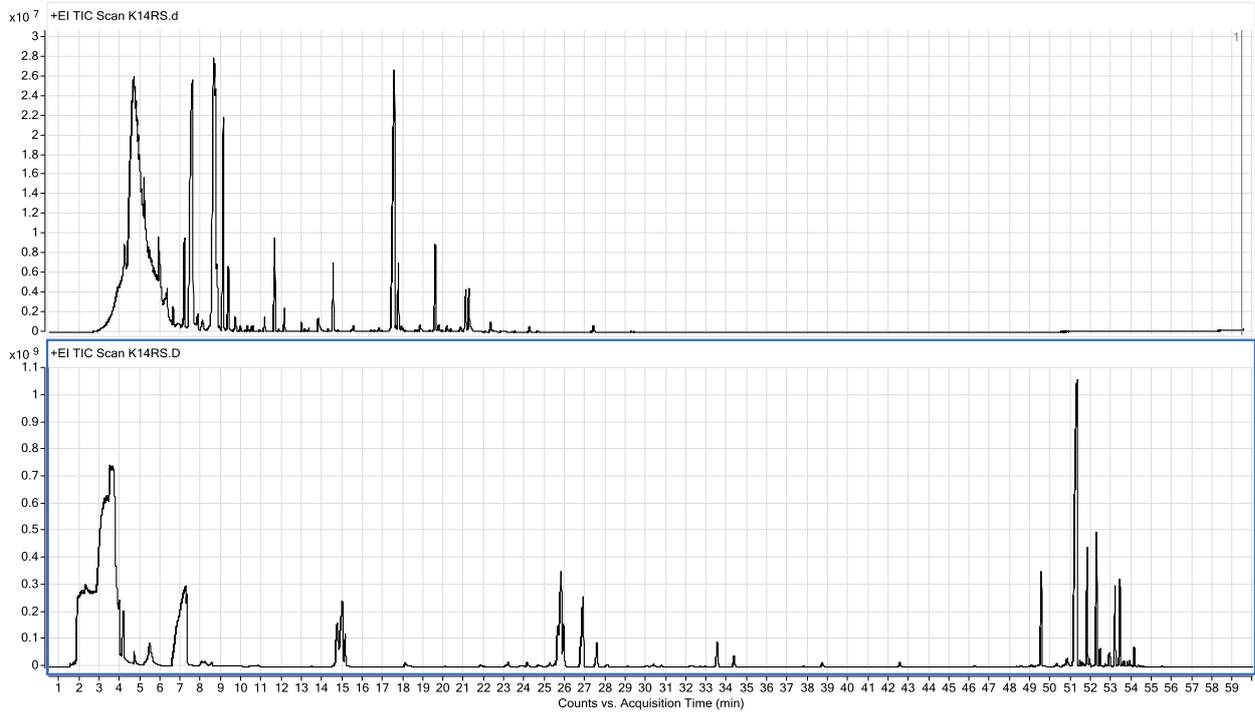
LAF35: coluna polar e apolar



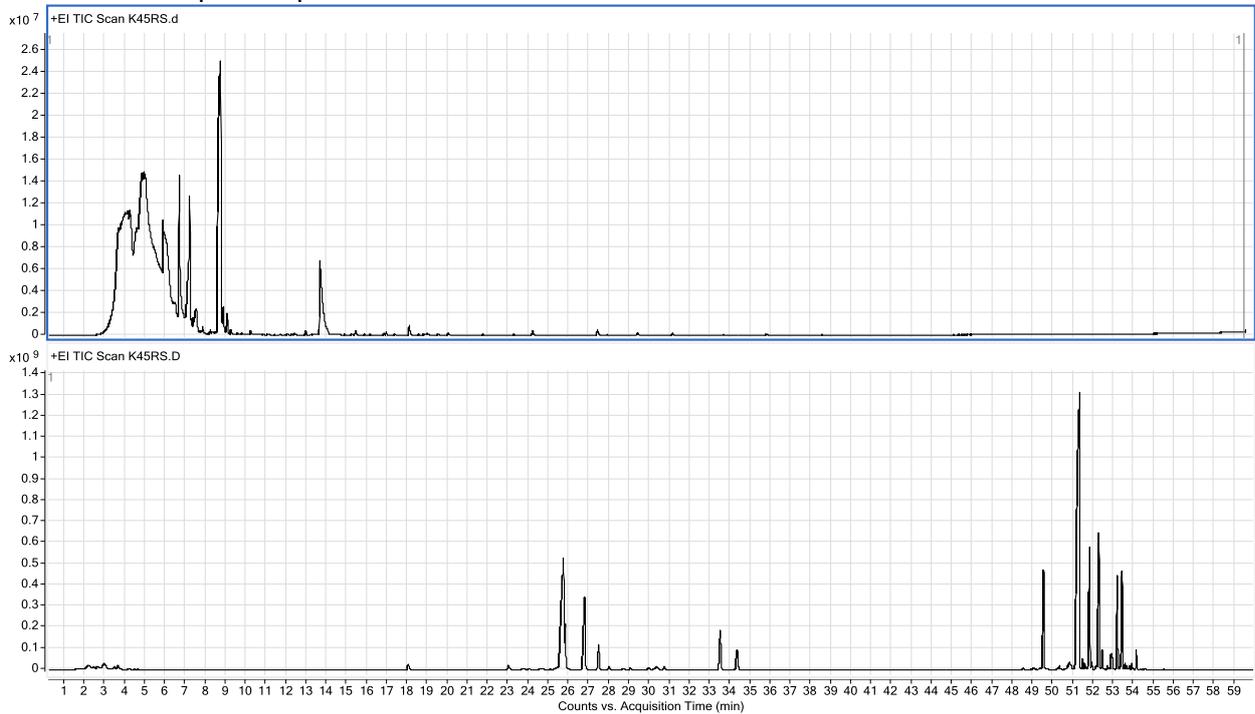
LAF 9: coluna apolar e polar



LAF 14: coluna apolar e polar



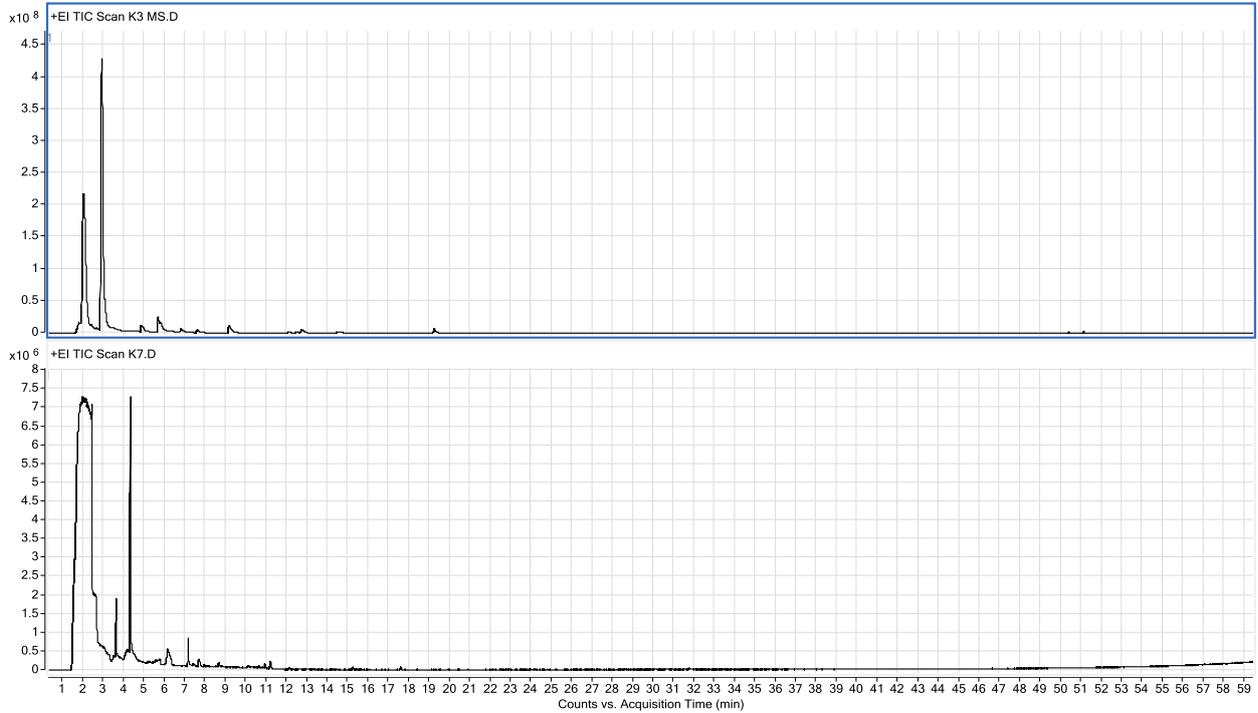
LAF 45: coluna apolar e polar



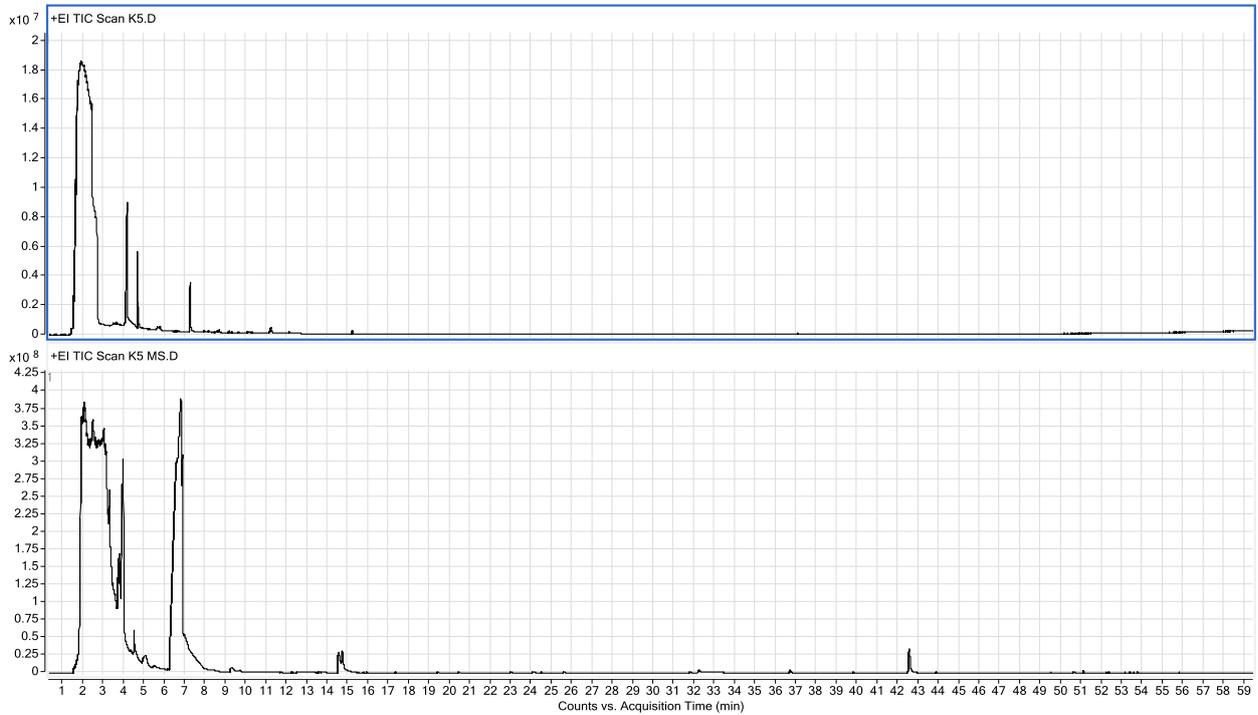
Coluna: Apolar

Meio: sintético

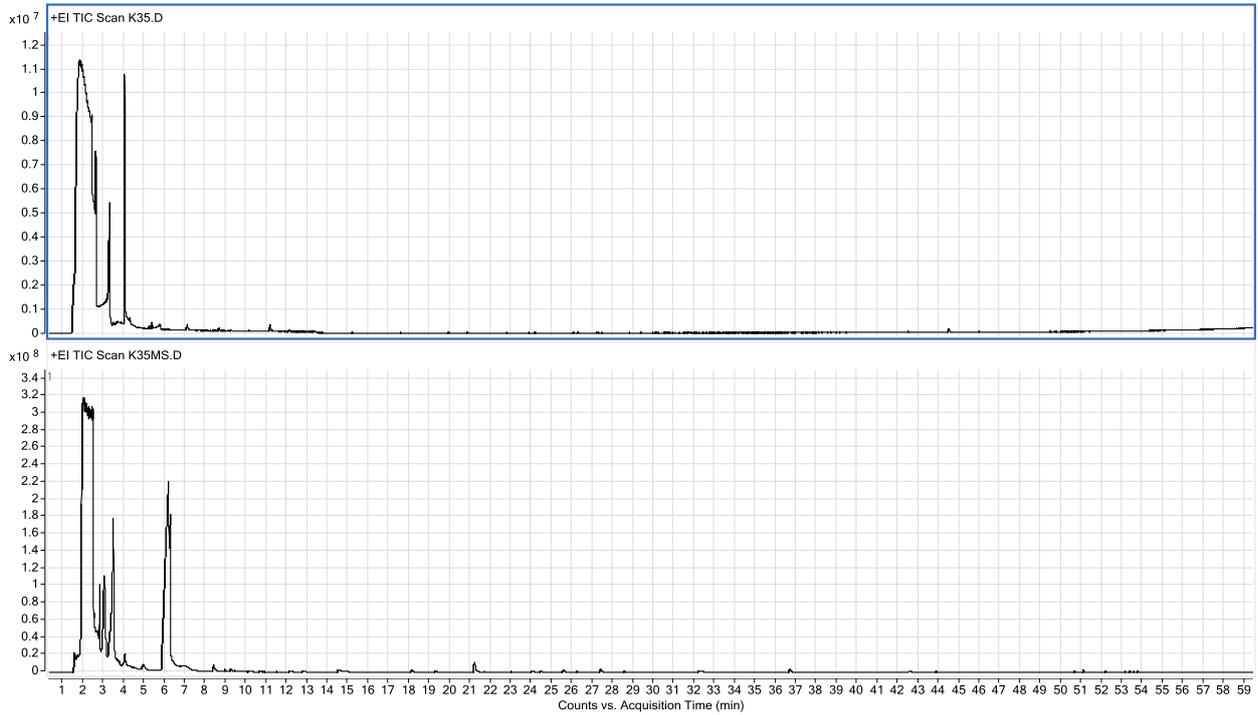
LAF3: *Purge & Trap* e MEFS



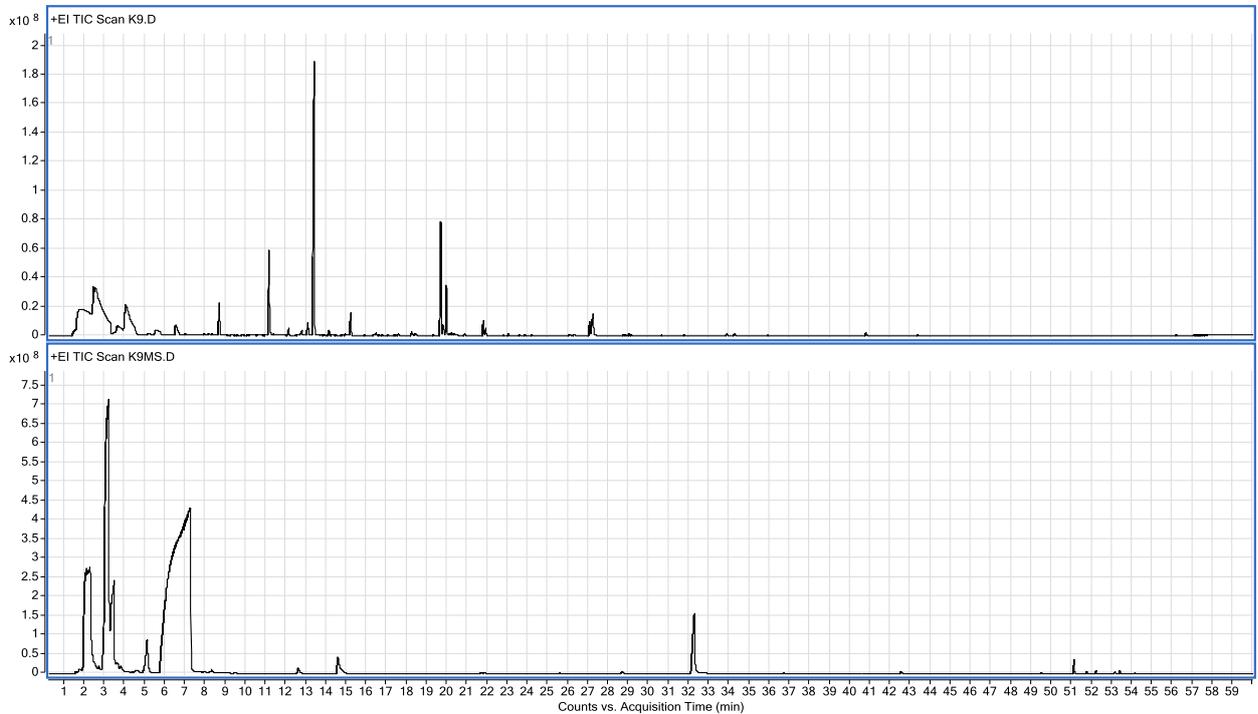
LAF5: *Purge & Trap* e MEFS



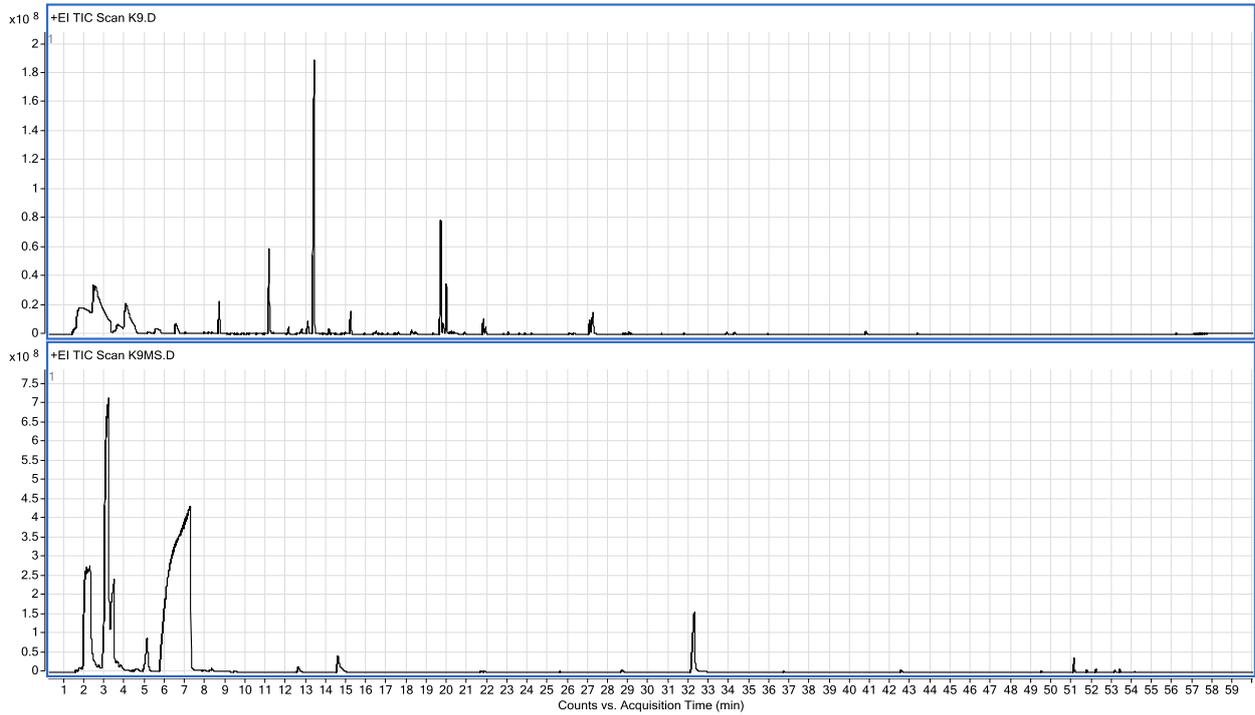
LAF35: *Purge & Trap* e MEFS



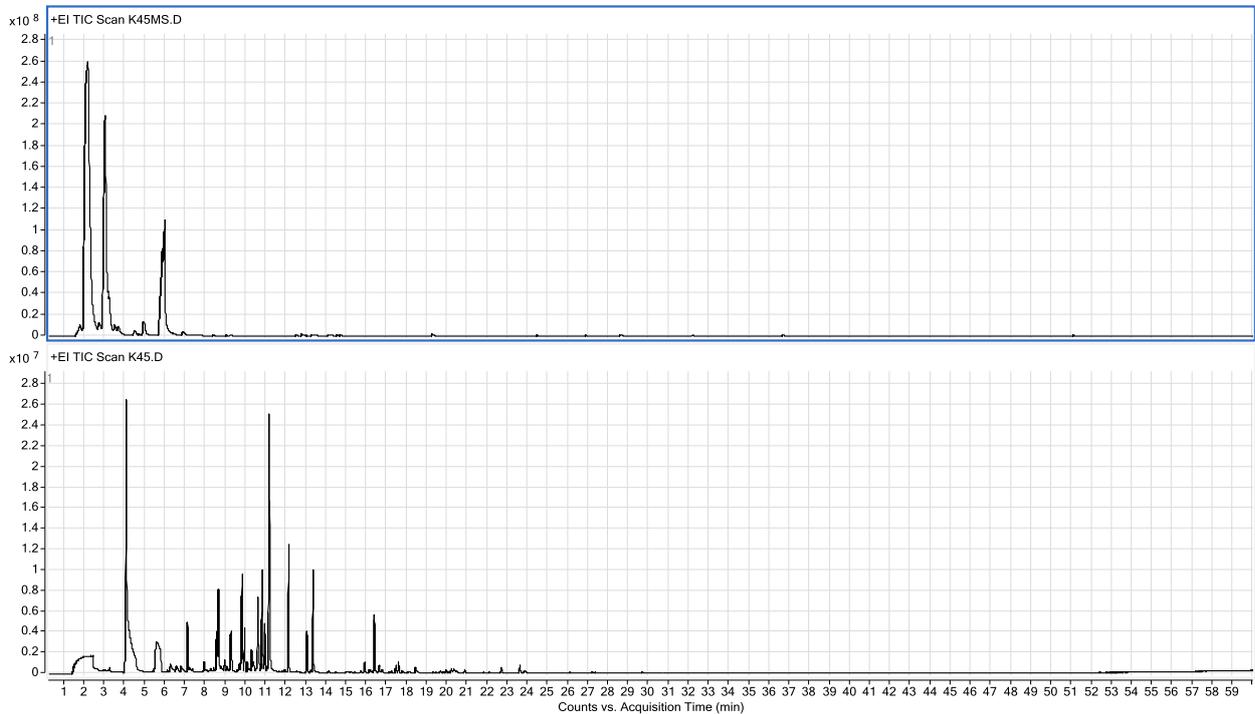
LAF9: *Purge & Trap* e MEFS



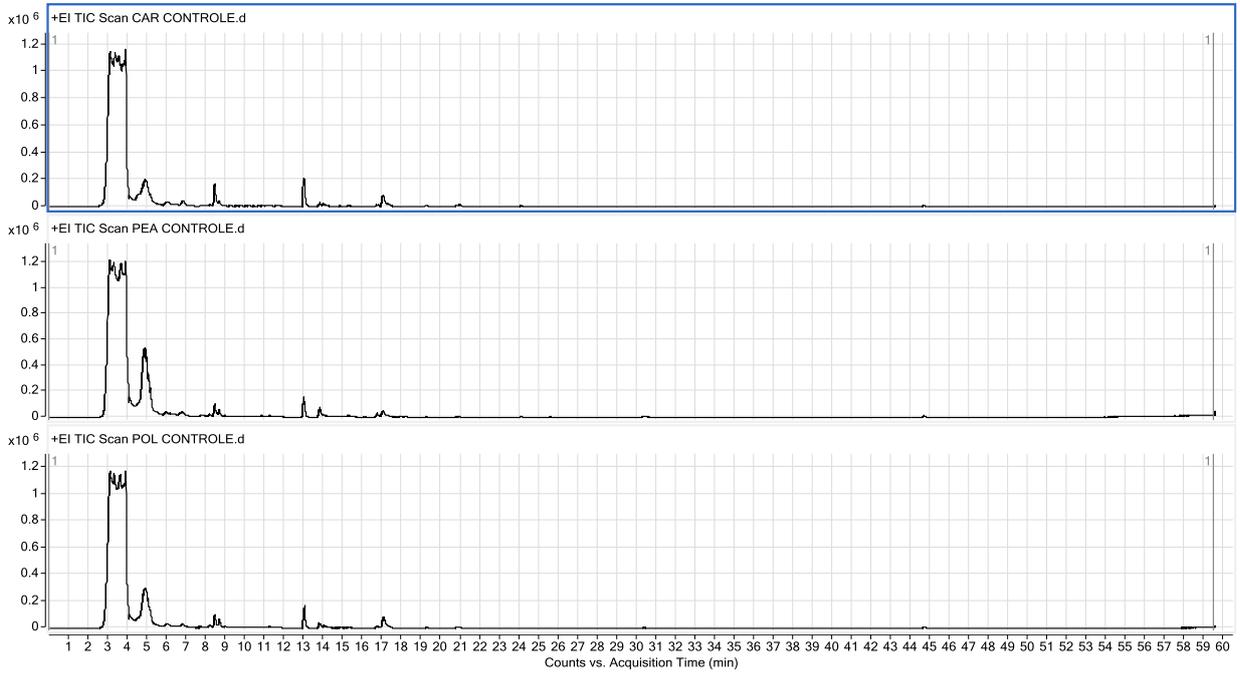
LAF14: *Purge & Trap* e MEFS



LAF 45: MEFS e *Purge & Trap*



Apêndice 3



Apêndice 4

Tabela 35: Quantificação dos compostos 2-FE, 2-FEA e CAR utilizando *Kluyveromyces lactis* em meio com resíduo de goiaba obtidos em Shaker e em Biorreator pelas técnicas de MEFS e Purge and Trap

Composto	Tempo de fermentação	Técnica de extração		
		Concentração ($\mu\text{Mol/L}$ de fermentado)		
		MEFS		Purge and Trap
		Biorreator	Shaker	Biorreator
2-FE	0h	852 \pm 255	863,5 \pm 115	7613 \pm 278
	24h	366 \pm 341	1204,3 \pm 214	19048 \pm 5810
	48h	18132 \pm 1244	2765,8 \pm 192	59058 \pm 3251
	72h	3286 \pm 280	1550,7 \pm 141	54216 \pm 2490
	96h	6,0 \pm 3	0	27176 \pm 1715
2-FEA	0h	5472 \pm 408	1448 \pm 251	116332 \pm 2115
	24h	4361 \pm 350	1888 \pm 239	222541 \pm 3145
	48h	7206 \pm 708	4510 \pm 466	396214 \pm 2244
	72h	4275 \pm 292	3286 \pm 298	113875 \pm 1830
	96h	4664 \pm 115	2856 \pm 197	11190 \pm 1125
CAR	0h	3890 \pm 417	547 \pm 136	100 \pm 25
	24h	3891 \pm 963	692 \pm 79	58303 \pm 9335
	48h	8927 \pm 1087	1562 \pm 107	58440 \pm 7445
	72h	9364 \pm 1231	1156 \pm 113	51464 \pm 7550
	96h	3275 \pm 305	1013 \pm 81	51443 \pm 8425