

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUZAN CRISTINA ROSSI

RECUPERAÇÃO POR PERVAPORAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE AROMA
NATURAL FRUTAL PRODUZIDO POR *Pichia fermentans* EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA

CURITIBA

2015

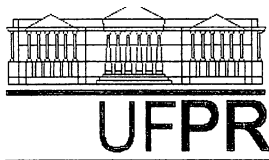
SUZAN CRISTINA ROSSI

RECUPERAÇÃO POR PERVAPORAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE AROMA
NATURAL FRUTAL PRODUZIDO POR *Pichia fermentans* EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutorado Programa de
Pós - Graduação em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^aDr.^a Adriane Bianchi Pedroni
Medeiros

Curitiba
2015



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos dezoito dias do mês de maio de 2015, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Centésima Segunda Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Biotecnologia Agroalimentar. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Giovana de Arruda Moura Pietrowski (UTFPR), Vítor Renan da Silva (UFPR), Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR), Luiz Alberto Júnior Letti (UFPR), e Adriane Bianchi Pedroni Medeiros (UFPR – orientadora da tese).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Suzan Cristina Rossi** a fazer a apresentação da Tese intitulada: “RECUPERAÇÃO POR PERVAPORAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE AROMA NATURAL FRUTAL PRODUZIDO POR *Pichia fermentans* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores doutores Giovana de Arruda Moura Pietrowski, Vítor Renan da Silva, Adenise Lorenci Woiciechowski, Luiz Alberto Júnior Letti e Adriane Bianchi Pedroni Medeiros declarou o candidato aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 18 de maio de 2015.

Prof. Dr. Vítor Renan da Silva

Prof^a Dr^a Adenise Lorenci Woiciechowski

Prof^a Dr^a Giovana de A. Moura Pietrowski

Prof^a Dr^a Adriane Bianchi Pedroni Medeiros

Prof Dr. Luiz Alberto Júnior Letti

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Adriane B. P. Medeiros pela orientação e apoio em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores deste departamento que auxiliaram na minha formação. A todos os meus colegas do laboratório pela ajuda, discussões e descontração durante o desenvolvimento das atividades realizadas.

À minha família, meu marido André e meus filhos Pedro e Raul pela compreensão durante a minha ausência.

À minha mãe Maria, pela ajuda nas horas difíceis e ao meu pai, Antonio.

A todos os meus familiares pelo carinho e apoio.

A prof. Agnes de Paula Scheer do departamento de Engenharia Química por disponibilizar o módulo de pervaporação para esta pesquisa.

A Lilian Côco do Lacaute pelas análises no CG/MS.

A empresa Duas Rodas S.A. pela aplicação do aroma nas bebidas.

A UFPR e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	AROMAS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO	15
3.2	PICHIA FERMENTANS	17
3.3	MELAÇO DE CANA.....	19
3.4	RECUPERAÇÃO DE AROMAS.....	22
3.5	HS-SPME- GC (“HEADSPACE- SOLID PHASE MICRO EXTRACTION-GAS CHROMATOGRAPHY”).....	28
3.6	MICROENCAPSULAÇÃO	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MICROORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO	34
4.2	MEIO DE CULTIVO	35
4.2.1	Características do Melaço De Cana	35
4.2.2	Sulfato de Magnésio	35
4.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	36
4.3.1	Determinação do pH	36
4.3.2	Determinação do teor de açúcares	36
4.3.3	Determinação da biomassa	36
4.3.4	Padronização da Técnica de Microextração em Fase Sólida “SPME”	37
4.3.5	Análise dos Compostos Voláteis em CG (Cromatógrafo Gasoso)	38
4.3.6	Determinação dos íons presentes no fermentado	40
4.3.7	Análise dos compostos de aroma por CG/MS	41
4.3.8	Microscopia eletrônica de varredura	41

4.3.9 Determinação da viabilidade celular do fermentado e do fermentado bruto em pó.....	42
4.4 ESTUDO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA	42
4.4.1 Primeiro Planejamento Experimental.....	43
4.4.2 Segundo Planejamento Experimental.....	43
4.5 EFEITO DA LEUCINA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA	44
4.6 ESTUDOS EM BIORREATOR	45
4.6.1 Efeito da Adição de Leucina e Aeração em Biorreator de Bancada	45
4.6.2 Experimentos em Batelada Alimentada	46
4.7 SISTEMA DE PERVAPORAÇÃO	46
4.7.1 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	48
4.8 SECAGEM E MICROENCAPSULAMENTO	49
4.9 APLICAÇÃO DO AROMA NATURAL CONCENTRADO EM BEBIDAS	51
4.9.1 Preparação da Amostra.....	51
4.9.2 Teste Perfil Sensorial	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA UTILIZADO NAS FERMENTAÇÕES	52
TABELA 8: COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA	52
TABELA 9: ANÁLISE ELEMENTAR DO MELAÇO DE CANA.....	52
5.2 ESTUDOS DAS VARIÁVEIS QUE PODEM INFLUENCIAR NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	53
5.2.1 Planejamento Experimental 1.....	53
5.2.2 Planejamento Experimental 2.....	54
5.3 EFEITO DA LEUCINA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA POR FERMENTAÇÃO EM FRASCOS	55
5.4 INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E ADIÇÃO DE LEUCINA EM BIORREATOR DE BANCADA	58
5.5 EXPERIMENTOS EM BATELADA ALIMENTADA	64
5.5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO POR SPME	65
5.6 ANÁLISE DO FERMENTADO EM CROMATÓGRAFO DE ÍONS	68

5.7	RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO AROMA NATURAL POR PERVAPORAÇÃO	70
	5.7.1 Estudos da influência da temperatura de alimentação	70
5.8	EFICIÊNCIA DE MICROENCAPSULAÇÃO	77
	5.8.1 Análise por microscopia eletrônica de Varredura	80
	5.8.2 Aspecto dos Aromas Obtidos em Pó	82
	5.8.3 Viabilidade	82
	5.8.4 ESTABILIDADE DETERMINADA DOS AROMAS EM PÓ APÓS 3 MESES DE ESTOQUE.....	83
5.9	PERFIL SENSORIAL DO AROMA FRUTAL	84
5.10	COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG/MS	86
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXO I.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema com as principais aplicações da pervaporação.....	23
Figura 2: Fluxograma do bioprocesso desenvolvido para produção de aroma frutal	34
Figura 3: (A) Aquecedor/ agitador para microextração do aroma por SPME (B) Detalhe do “holder” acoplado ao injetor do CG para dessorção da fibra.....	39
Figura 4: Biorreator de bancada de 2 L utilizado para produção de acetato de isoamila por <i>P. fermentans</i>	45
Figura 5: Diagrama do módulo de pervaporação	47
Figura 6: Módulo de pervaporação do Emultec - UFPR.....	47
Figura 7: Detalhe da célula de permeação utilizada para pervaporação dos compostos de aroma	48
Figura 8: Diagrama de Pareto do primeiro planejamento experimental fatorial 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central	53
Figura 9: Diagrama de Pareto para o segundo planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central	54
Figura 10: Superfície de resposta – Influência da leucina e melação de cana na produção de acetato de isoamila.....	55
Figura 11: Superfície de resposta – Influência do sulfato de magnésio e do melação de cana na produção de acetato de isoamila.....	55
Figura 12: Influência da adição de leucina na produção de acetato de isoamila por <i>P.fermentans</i> cultivado em meio à base de melação de cana em frascos	57
Figura 13: Perfil da produção de voláteis totais e acetato de isoamila durante a fermentação por <i>P.fermentans</i>	59
Figura 14: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa por <i>Pichia fermentans</i>	60
Figura 15: Perfil da produção de acetato de isoamila durante a fermentação submersa por <i>Pichia fermentans</i>	61
Figura 16: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa(2) por <i>Pichia fermentans</i>	61
Figura 17: Perfil da produção de acetato de isoamila durante a fermentação submersa por <i>Pichia fermentans</i>	62

Figura 18: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa (3) por <i>Pichia fermentans</i>	62
Figura 19: Comparação do perfil da produção de acetato de isoamila durante as fermentações variando aeração e concentração de leucina	63
Figura 20: Teor de açúcares redutores, concentração de biomassa e produção de acetato de isoamila durante fermentação submersa em batelada alimentada	65
Figura 21: Comparação da microextração de acetato de isoamila por HS-SPME/CG em diferentes tempos de exposição da fibra ao componente de aroma nas mesmas condições de concentração e temperatura com análise por HS/CG	67
Figura 22: Curva de saturação da fibra SPME em relação ao tempo de exposição da mesma ao “headspace”	67
Figura 23: Curva padrão de acetato de isoamila conforme análise realizada por HS-SPME/CG	68
Figura 24: Perfil de Íons analisados em cromatógrafo de íons durante 28 horas de fermentação submersa por <i>Pichia fermentans</i>	69
Figura 25: Fluxo total e fluxo individual dos componentes, produzidos durante fermentação por <i>P. fermentans</i> , durante processo de pervaporação	71
Figura 26: Efeito da temperatura sobre o fator de enriquecimento da membrana de separação dos componentes de aroma	72
Figura 27: Influência da microfiltração na concentração de acetato de isoamila e fluxo total durante pervaporação,	73
Figura 28: Fluxo total através da membrana durante 13 horas de pervaporação	74
Figura 29: Perfil da concentração do componente de aroma, acetato de isoamila, na alimentação e no permeado durante o processo de recuperação por pervaporação	76
Figura 30: Aspecto das amostras e da membrana antes e após o processo de pervaporação	77
Figura 31: Concentração dos compostos de aroma (acetato de etila e acetato de isoamila) conforme as formulações estudadas para posterior secagem do aroma frutal	78
Figura 32: Microcápsulas de acetato de etila e aroma natural obtido por fermentação usando distintos agentes encapsulantes	81
Figura 33: Aspecto das formulações contendo aroma natural:	82
Figura 34: Aspecto do aroma natural produzido por fermentação,	86

Figura 35: Cromatograma gerado por CG/MS do aroma natural líquido (amostra 2)	88
Figura 36: Espectro de massa do acetato de isoamila gerado por CG/MS do aroma natural líquido (amostra 2)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição físico-química do melão de cana-de-açúcar	20
Tabela 2: Utilização do melão de cana como fonte de carbono por fermentação submersa	21
Tabela 3: Exemplos de membranas hidrofóbicas (folha plana) testadas para pervaporação de mistura álcool isoamílico e acetato de isoamila	25
TABELA 4: Tempos de retenção dos padrões de compostos voláteis obtidos por CG	40
Tabela 5: Planejamento experimental fatorial 2^{4-1} com 3 pontos centrais para produção de acetato de isoamila por <i>P. fermentans</i> em meio a base de melão.	43
Tabela 6: Planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais para produção de acetato de isoamila por <i>P. fermentans</i> em meio a base de melão	44
Tabela 7: Formulações de compostos de aroma (acetato de etila) e aroma natural com diferentes agentes encapsulantes	50
Tabela 8: Composição física do melão de cana	52
Tabela 9: Análise elementar do melão de cana	52
Tabela 10: Produção de acetato de isoamila durante as fermentações submersas em erlenmeyers	56
Tabela 11: Tabela Anova “one way” com pós teste de Tukey gerada por GraphPad	58
Tabela 12: Produção de acetato de isoamila por FSm em biorreator com adição de leucina e aeração forçada	63
Tabela 13: Tabela Anova “one way” com pós- teste de “Tukey” gerada por “Graph Pad Prism”	64
Tabela 14: Tabela Anova “one way” com pós teste de “Tukey” gerada por “GraphPad Prism”	65
Tabela 15: Ponto de ebulição dos compostos voláteis	72

Tabela 16: Características da emulsão e das microcápsulas produzidas por “spray drier” de acetato de etila e do aroma natural.....	80
Tabela 17: Teste de estabilidade em relação à concentração de acetato de isoamila microencapsulado	83
Tabela 18: Perfil de compostos voláteis do aroma nas amostras 1 e 2 analisados por HS-SPME-CG	85
Tabela 19: Compostos presentes nos aromas produzidos por fermentação submersa por <i>Pichia fermentans</i>	87

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um processo para obtenção de um aroma frutal, cujo principal componente foi o acetato de isoamila, biossintetizado por *Pichia fermentans* em fermentação submersa. O perfil da produção do aroma foi estudado durante 28 horas de fermentação por HS/SPME-CG (microextração em fase sólida do “headspace”) sendo que a produção máxima foi alcançada em 6h de fermentação. Estudos do processo de pervaporação foram realizados para concentrar/recuperar o aroma natural produzido. Foram testadas temperaturas da alimentação do pervaporador a 30, 45 e 60 °C. Determinou-se o fluxo total (J_t), o fluxo parcial dos componentes (J_i) e o fator de enriquecimento (β) para definir a melhor condição de recuperação do aroma natural frutal. Foi utilizada a membrana Pervap 4060-Sulzer. A temperatura selecionada foi de 45 °C. O aroma líquido obtido por pervaporação e o fermentado bruto foram submetidos à secagem em “*spray dryer*”. Goma arábica, dextrina, maltodextrina e uma mistura de dextrina e maltodextrina foram testados como agentes encapsulantes. Os melhores resultados foram obtidos como amido modificado (20% de dextrina) seguido da mistura de dextrina (15%) e maltodextrina (15%) com eficiência de encapsulamento de 68,95% e 39,33%, respectivamente. O aroma líquido natural produzido foi aplicado em refrigerante e em coquetel (bebida tipo “Ice”). O perfil sensorial das bebidas foi avaliado por aromistas treinados e apresentaram notas frutais que remeteram a banana.

ABSTRACT

In this work a process for obtaining a fruity aroma was developed, the main component is the isoamyl acetate, biosynthesized by *Pichia fermentans* in submerged fermentation. The profile of the aroma production was studied for 28 hours fermentation by HS / SPME-GC (headspace solid phase microextraction) and the maximum production was achieved in 6h SmF. Studies of the pervaporation process were performed to recover the natural aroma produced. The feed temperatures of 30, 45 and 60°C in pervaporation were tested, which were determined total flux (J_t), partial flux of components (J_i) and enrichment factor (β). The best temperature was 45 °C, within the ranges tested for membrane used (Pervap 4060-Sulzer) and recovery of the natural fruity aroma. The fermented (crude aroma) and liquid natural aroma obtained were dried in spray dryer. Arabic gum, dextrin, maltodextrin and a mixture of dextrin and maltodextrin were tested as encapsulating agents. The best agent was modified starch (20% dextrin) followed by the mixture dextrin (15%) and maltodextrin (15%), the encapsulation efficiency was 68.95% and 39.33%, respectively. The natural liquid aroma produced was applied to soda and ice cocktail. The sensory profile of the drinks was evaluated by trained flavorists, these fruity notes refers the banana flavours.

1 INTRODUÇÃO

Os aromas são compostos adicionados aos alimentos com a finalidade de conferir ou definir, reforçar ou reconstituir sabor. São considerados aditivos alimentares por não ter função nutricional e podem ser classificados como natural artificial ou idêntico ao natural. A maioria dos aromas consumidos atualmente são os idênticos ao natural, ou seja, aromas sintéticos que contêm as mesmas moléculas aromáticas dos naturais, mas que diferem no método de obtenção dessas moléculas. Segundo a Food and Agriculture Organization - FAO, aromas naturais são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes naturais, as quais são produtos de origem animal ou vegetal.

Os aromas naturais produzidos por biossíntese são menos agressivos ao meio ambiente, pois não produzem resíduos químicos e podem ser desenvolvidos com substratos oriundos de subprodutos da agroindústria. Devido à produção em concentrações muito baixas e às etapas de purificação necessárias o seu custo ainda é elevado em comparação aos produzidos por síntese química. A maior parte desses aromas naturais é o resultado da mistura de compostos produzidos em baixas concentrações, essas misturas podem conter terpenos, aldeídos, ésteres, lactonas, alcoóis superiores e outras moléculas complexas que conferem aroma global dependendo da concentração de cada um deles. Estas moléculas resultam do metabolismo de fungos filamentosos e leveduras. O acetato de isoamila, éster que pode ser produzido por fungos filamentosos e leveduras, confere o aroma de banana dependendo do meio de cultivo utilizado. Este é reconhecidamente produzido por *Ceratocystis fimbriata* (Rossi *et al.*, 2009), *Pichia fermentans* entre outros microrganismos.

Estudos da produção de aromas por microrganismos demonstraram que para compostos aromatizantes com valor de mercado a partir de US\$ 200,00 por quilograma, a rota microbiana torna-se econômica, enquanto, para aromas com preços inferiores a este valor a produção por biossíntese não é conveniente. Isto quer dizer que o valor de mercado do composto aromatizante e a elasticidade de seu preço irá tornar vantajosa ou não a biossíntese de um aroma (Insumos, 2011).

Em relação à demanda mundial, o mercado de aromas e fragrâncias deve subir 4,4% ao ano até 2016 chegando a 26,5 bilhões de dólares (“The Freedonia Group”, 2012). No Brasil esse mercado cresce a taxas anuais que superam entre 1,5 a 2,0 vezes a taxa de expansão do PIB nacional (Alimentos e Bebidas, 2011).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de produção de aroma natural frutal por pervaporação com maior concentração de acetato de isoamila produzido por *Pichia fermentans* em fermentação submersa e aplica-lo em bebidas determinando seu perfil sensorial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo de produção de aroma frutal por *Pichia fermentans* em fermentação submersa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir aroma natural por *Pichia fermentans* em fermentação submersa utilizando melação de cana como fonte de carbono.
2. Estudar e analisar os compostos de aroma utilizando método de microextração SPME-CG durante a fermentação, pervaporação e no produto final encapsulado em “*spray-drier*”.
3. Recuperar e concentrar os aromas naturais produzidos por pervaporação em módulo com membrana polimérica.
4. Secar e microencapsular o aroma final em distintos agentes encapsulantes em “*spray-drier*”.
5. Aplicar o aroma natural em bebida e determinar o seu perfil sensorial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AROMAS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO

Os aromas naturais produzidos por biossíntese têm como vantagem a produção de múltiplos componentes que contribuem para um perfil balanceado do mesmo, além de possibilitar a obtenção de novos efeitos de aroma com características únicas que não são obtidos em processos tradicionais. Por isso, as indústrias de aroma têm investido em pesquisas para desenvolvimento de bioprocessos para produção de aroma natural, apesar de sua produção ainda não ser considerada viável comercialmente.

Muitos setores da indústria de alimentos utilizam aroma na fabricação de seus produtos, como: laticínios (leites, iogurtes líquidos, flans, pudins); bebidas (refrescos, refrigerantes, pós para refrescos e bebidas em geral); confeitaria (doces, gomas de mascar, balas, bolos e biscoitos); carnes (embutidos em geral e produtos processados); e na culinária (mistura para sopas, doces e salgados). Com a crescente industrialização dos alimentos e a procura por produtos mais práticos e saudáveis, muitos estudos tem sido realizados para o desenvolvimento de processos para produção de aromas naturais (Chiappini, 2008) e produtos contendo aromas naturais.

Em 1923 foi realizado um dos primeiros trabalhos na produção de aroma natural, no qual Omelianski relatou que microrganismos (fungos e bactérias) têm capacidade de produzir fragrâncias. No qual foi realizado uma série de experimentos com microrganismos isolados do leite, do pão e de algumas frutas onde obteve em diferentes substratos, aroma de morango, aroma de fruta e aroma de queijo, com a variação da composição do meio de cultura. Dentre estes microrganismos, destacaram-se as leveduras como um dos grupos mais importantes que produzem em cultura aroma etéreos. Huang, Lee e Chou (2001) produziram 515,2 ppm de feniletanol, composto que caracteriza a fragrância de pétalas de rosas, após 16 horas de fermentação submersa com *Pichia fermentans* L-5 isolada do solo utilizando glicose e extrato de malte como meio de cultivo.

Mantzouridou e Paraskevopoulou (2013) estudaram a polpa de laranja como substrato para fermentação com o objetivo de produzir ésteres; estes usaram um

fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) de vinho comercial (Vitilevure MT) e estudaram o comportamento cinético desta levedura (crescimento da célula, assimilação do substrato e a formação de ésteres voláteis). A polpa de laranja foi utilizada como complemento do meio nutritivo sob duas condições de aeração diferentes. Os resultados foram comparados com os obtidos a partir de processos convencionais em meio nutritivo contendo glicose como única fonte de carbono. Estes estudos revelaram que as células de levedura foram capazes de crescer em meio contendo polpa de laranja após período 12 h de latência, provavelmente devido ao efeito inibidor do limoneno. A polpa de laranja foi capaz de estimular a síntese *de novo* de acetato de isoamila, acetato de fenil etila e ésteres etílicos (hexanoato, octanoato, decanoato e dodecanoato) por *S. cerevisiae*. A produção de ésteres foi evidente quando houve limitação de oxigênio no meio. A polpa de laranja pode ser uma opção promissora para produção de bioaromas por leveduras. Resultados semelhantes também foram encontrados por Lalou *et al.* (2013) utilizando tecnologia de imobilização. As células imobilizadas de *S. cerevisiae* apresentaram melhor desempenho de crescimento, e produziram maior quantidade de ésteres voláteis de aroma frutado (acetato de 2-feniletil, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato e dodecanoato de etila) comparadas as células em suspensão. Rossi *et al.* (2009) estudaram a produção de aroma de frutas por *C. fimbriata*, por fermentação no estado sólido, testando polpa cítrica, melão de cana de açúcar e melão de soja como fontes de glicose e farelo de soja ou ureia como fontes nitrogênio. As melhores condições para produção de voláteis foi farelo de soja com adição de melão de cana e solução salina, atingindo em torno de 100 µmol/L de headspace por grama de substrato de voláteis totais (acetaldeído, etanol, acetato de etila, acetato de propila, hexanol e acetato de isoamila).

A conversão de moléculas precursoras ou a síntese *de novo* está ganhando importância através do rápido crescimento dos campos em biologia nos sistemas de engenharia metabólica, se tornando mais eficientes para a produção de compostos de aroma natural. A síntese *de novo* ocorre quando simples açúcares e nutrientes podem ser metabolizados em compostos de aromas e fragrâncias por via bioquímica. Alternativamente, a bioconversão de um precursor em uma única etapa (ou algumas etapas) catalisada por enzima. Outro processo no qual vem sendo desenvolvido para produção de compostos voláteis como cetonas, aldeídos, álcoois,

ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas e terpenos, estes podem ser formados por leveduras (Carlquist *et al.*, 2015).

A utilização da engenharia genética para o desenvolvimento de microrganismos recombinantes tem sido crucial para bioprocessos de alta eficiência e rapidez na produção de aromas naturais (Carlquist *et al.*, 2015). Beekwilder *et al.* (2007) desenvolveu a cepa *S. cerevisiae* recombinante para super expressar a coenzima A – cumarato, essencial para síntese *de novo* de p-hidroxibenzaldeído.

3.2 *Pichia Fermentans*

A levedura *Pichia fermentans* tem sido estudada em culturas puras ou mistas para produzir e aumentar a produção de compostos de aroma. O gênero *Pichia* é capaz de promover a esterificação de vários alcoóis tais como etanol, álcool isoamílico e 2-fenil etanol (Plata *et al.*, 2003). Segundo Domizio *et al.* (2011), o gênero *Pichia* produz elevadas quantidades de acetato de etila, é o segundo maior produtor de acetato de isobutila e de isoamila, perdendo somente para o gênero *Hanseniospora spp.* Conforme Clemente-Jimenes *et al.* (2005), a cepa *P. fermentans* CECT 1173 combinada com *Saccharomyces cerevisiae*, em 48 horas de fermentação de mosto de uva aumenta qualitativamente e quantitativamente os compostos de aroma no vinho, tais como acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol, caprilato de etila, 2,3-butanodiol e glicerol.

Sanna *et al.* (2012) estudaram fontes de N e distintos valores de pH para formação de biofilme durante a transição dimórfica da *Pichia fermentans* para controlar a podridão parda causada por *Monilia sp.* em frutos de pêra e maçã. Alguns componentes induziram a formação de pseudo-hifas que são fundamentais para formação do biofilme, aminoácidos como metionina, valina e fenilalanina independentes da concentração de nitrogênio (N) e pH do meio. Os álcoois metionol (3-metil, tio 1-propanol), 1-butanol, isobutanol e isopropanol também foram capazes de induzir a formação de pseudo-hifas, isto ocorre devido à assimilação dos aminoácidos através da via de Ehrlich que pode conduzir a produção de álcoois superiores, porém a isoleucina induz a produção de álcool isoamílico, sendo este último, precursor do acetato de isoamila.

Caputo *et al.* (2012) isolaram aleatoriamente 51 cepas de leveduras em 3 diferentes tipos de bebida boza (bebida fermentada a base de cereais, açúcar e água) sendo que a *P. fermentans* foi a espécie dominante com 21 isolados com elevado polimorfismo. Estas leveduras foram analisadas por RAPD-PCR e a partir desta técnica 15 cepas foram distinguidas conforme características bioquímicas e tecnológicas. Três destas leveduras produziram uma quantidade elevada de 2-feniletanol, um dos compostos responsável pela fragrância de rosas, isto indica que esta pode estar envolvida com o desenvolvimento do sabor desta bebida tradicional na Turquia, Bulgária e Albânia. Osimani *et al.* (2015) estudaram a bebida boza, não pasteurizada, como fonte e diversidade de muitos microrganismos com objetivo de isolar um grande número de culturas com características acidificantes, antioxidantes, produção de compostos de aroma, entre outras; dentre as estirpes isoladas estava a *P. fermentans*.

Das *et al.* (2010) combinaram o efeito de extrato de bagaço de cana com corantes sintéticos nas propriedades de crescimento e bioacúmulo de uma cepa de *Pichia fermentans* MTCC189. Os autores concluíram que esta levedura foi capaz de acumular os corantes “Acid Blue 93, Direct Red 28 e Basic Violet 3” utilizando o extrato de bagaço de cana como única fonte de carbono.

Domizio *et al.* (2014), isolaram 8 estirpes não-*Saccharomyces* de vinho, estas foram previamente selecionadas conforme a capacidade de modular as concentrações finais de compostos voláteis e sobreviverem em cultura mista com *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do suco de uva. O objetivo dos autores foi isolar cepas que liberam manoproteínas, estas são liberadas a partir da parede da célula de levedura durante a fermentação alcoólica e processo de envelhecimento do vinho. Das 8 estirpes isoladas dentre estas a *Pichia fermentans*, apresentaram alta capacidade de liberar polissacarídeos quando comparadas com *S. cerevisiae*, indicando que as cepas não-*Saccharomyces* podem agregar valor a bebida, pois as manoproteínas favorecem a formação de um aroma mais complexo e uma melhor qualidade do vinho.

Freitas *et al.* (2009) constataram que leveduras naturais podem ser encontradas em grandes quantidades em leite cru do queijo “Cantal”, um queijo francês de origem protegida, estes autores isolaram 3 leveduras: *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, e *Pichia fermentans*. Estas foram adicionadas como um

coquetel com objetivo de modificar a sobrevivência das bactérias no leite e melhorar a formação de compostos de aroma. A adição de leveduras não influenciou na composição do queijo em conteúdo total de aminoácidos livres. Em contraste, um ligeiro aumento na lipólise nos queijos aumentou a formação de compostos voláteis de aroma.

Zhu *et al.* (2015) isolaram 10 cepas de leveduras em uva e testaram sua capacidade antagonista para diminuição da produção de ocratoxina A, micotoxina nefrotóxica, nefrocarcinogênica, teratogênica e com capacidade imunossupressora, produzidas por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. A cepa *Pichia fermentans* M69 apresentou atividade antagonista em meio PDA em co-cultura de *Aspergillus Carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*.

Stringini *et al.* (2009) investigaram a presença de leveduras no vinho de palma durante a fermentação natural. Dentre as espécies, houve predominância de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycode ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida parapsilopsis*, *Candida fermentati* e *Pichia fermentans*.

Rijswijk *et al.* (2015) estudaram o impacto da limitação de glicose e nitrogênio no modo de crescimento e produção de voláteis orgânicos (álcoois, ácidos e ésteres) para cepas de *S. cerevisiae* 131, *Pichia fabianii* 65 e *Pichia kudriavzevii* 129. Uma ampla gama de ésteres foi encontrada apenas para a *Pichia spp.*, cultivada em ágar com limitação de nitrogênio, durante 21 dias, em comparação com ágar rico em nutrientes. Os resultados sugeriram que para as espécies de *Pichia* a formação de ésteres pode desempenhar um papel importante no modo de crescimento quando houve limitação de nitrogênio.

3.3 MELAÇO DE CANA

O melaço de cana de açúcar é resultante da etapa de centrifugação, no processo de fabricação de açúcar. Contém açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada. É utilizado na fermentação para produção de álcool, em especial o etanol, como matéria-prima para fabricar rum, fermentos biológicos e usado largamente em rações animais e outras aplicações, tais como: fundição, papelão, casquinhas de sorvete, horticultura, fertilizante agrícola, refratários, suinocultura,

hortaliças/verduras, cerâmica, mineração, compostagem, borracharia/ressolagem, cimento, porcelana, citricultura, cultivo de batata e pulverização do milho e café. Considerando seu potencial como substrato este subproduto é utilizado em vários setores da biotecnologia, devido à presença de macro e micronutrientes em sua composição como: potássio, nitrogênio, magnésio; e altas concentrações de açúcares totais e redutores (Tabela 1). Devido aos grandes volumes excedentes na indústria açucareira, é considerado um subproduto de baixo custo.

Tabela 1: Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar

Composição	(g, %)
Nitrogênio	0,58
Fósforo	0,015
Potássio	1,63
Umidade	9,10
Cinzas	9,98
Açúcares redutores em glicose	14,72
Açúcares não redutores em sacarose	33,78

Fonte: Feltrin *et al.*, 2000.

Segundo Moo-Young Jung *et al.* (2013), o melaço de cana é considerado uma boa fonte de carbono para biorrefinaria devido ao seu alto teor de açúcar e preço baixo, sendo que, a sacarose ocupa mais de metade do açúcar no melaço.

Bengtsson *et al.* (2010) utilizaram melaço de cana como fonte de carbono em fermentação com cultura mista de organismos acumuladores de glicogênio para produzir polihidroxicanoatos (PHAs), poliéster biodegradável que pode substituir os polímeros de petróleo. Já Albuquerque *et al.* (2007) desenvolveram um processo em 3 estágios para produção de PHAs a partir de fermentação utilizando melaço de cana como substrato. Primeiro com fermentação acidogênica, segundo seleção de culturas acumuladoras de PHAs e terceiro adição de lodo enriquecido no melaço de cana para fermentação.

Cazetta *et al.* (2005) otimizaram estudo para produção de sorbitol, um álcool de açúcar, amplamente utilizado na indústria alimentícia como edulcorante, umectante, agente de textura e amaciante, por *Zymomonas mobilis* utilizando melaço de cana como substrato por fermentação em batelada.

Ke Xu e Ping Xu, (2014) produziram L-ácido láctico, composto muito aplicado em alimentos, cosméticos, têxteis, produtos farmacêuticos e em muitos outros campos da indústria como acidulantes, umectantes, etc., por fermentação alimentada com *Bacillus coagulans* H-1 utilizando o melão de cana como fonte de carbono. Jun Xia *et al.* (2014) desenvolveram estudo para produção mais econômica de poli (L-lisina) e poli-(L-ácido diaminopropiônico), poliamida catiônica, utilizada no Japão, Coréia e Estados Unidos como conservante para alimentos naturais. Estes autores utilizaram melão de cana como fonte de carbono e um hidrolisado de células bacterianas para co-produção em batelada alimentada por *Streptomyces albulus* PD-1. Os resultados foram promissores sugerindo que o melão de cana de baixo custo e o hidrolisado de células podem ser utilizados para produção de baixo custo destes produtos.

Dan Zhang *et al.* (2012) utilizaram melão de cana e licor residual da produção de glutamato monossódico (MGWL) para produzir γ -poliácido glutâmico (PGA) por *Bacillus subtilis* NX-2.

Além da utilização do melão de cana como fonte de carbono nas fermentações existem outras aplicações para este subproduto da indústria; Asikin *et al.* (2013) por exemplo estudaram o melão de cana como fonte rica em frações antioxidantes com efeitos de eliminação de radicais peroxil (Tabela 2).

Tabela 2: Utilização do melão de cana como fonte de carbono por fermentação submersa

Microorganismo	Fermentação	Produto	Autores
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Descontínua alimentada	2,3-butanediol	Moo-Young Jung <i>et al.</i> (2013)
Cultura mista		polihidroxialcanoatos (PHAs)	Bengtsson <i>et al.</i> (2010)
Cultura mista	Acidogênica	PHAs	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Batelada	Sorbitol	Cazetta <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacillus coagulans</i> H-1	Alimentada	L-ácido láctico	Ke Xu e Ping Xu, (2014)
<i>Streptomyces albulus</i> PD-1		poli (L-lisina) poli-(L-ácido) diaminopropiônico)	Jun Xia <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus subtilis</i> NX-2		γ -poliácido glutâmico	Dan Zhang <i>et al.</i> (2012)

3.4 RECUPERAÇÃO DE AROMAS

Aroma é uma combinação de diversas substâncias responsáveis pelo odor e sabor de muitos alimentos. Estes são classificados como compostos voláteis orgânicos e estão presentes em fontes naturais, em baixas concentrações (em níveis de ppm ou ppb). Cada composto de aroma único tem diferentes contribuições sobre o aroma final da fruta devido as suas características moleculares e diferentes concentrações (Chiappini, 2008).

Com a finalidade de restaurar o aroma original do produto e de alimentos processados, cresceu a demanda por pesquisas para o desenvolvimento de novas metodologias de separação e recuperação de aromas. As primeiras tentativas para recuperação e concentração de compostos de aroma foram extração por solvente, destilação e adsorção, métodos que possuem alto consumo de energia e podem degradar o aroma durante sua recuperação. A concentração por evaporação, uma das mais utilizadas, apresenta como desvantagem a diminuição ou modificação dos compostos de aroma, alterando assim a qualidade final do produto (Raisi, Aroujaliana e Kaghazchi, 2008).

A separação por membrana baseada na pervaporação é uma técnica economicamente viável e eficiente para recuperação e concentração de aroma. Esta técnica tem sido cada vez mais estudada devido a sua operação com temperaturas moderadas, não necessita de gás de arraste como nesta pesquisa além de ser possível modular desenhos de unidades de membranas de acordo com o produto que será desenvolvido, portanto de fácil instalação e operação. A eficiência da separação por pervaporação depende da substância alvo e da membrana utilizada, bem como das variáveis de operação como temperatura da alimentação, pressão no permeado, concentração na alimentação e vazão de alimentação (Raisi, Aroujaliana e Kaghazchi, 2008).

A pervaporação, processo de separação por membrana, é mais viável quando quantidades pequenas devem ser removidas da fase líquida e quando esta membrana apresenta seletividade elevada em relação ao componente a ser separado. Este processo é utilizado no fracionamento de misturas de difícil separação por destilação, tais como mistura de isômeros ou misturas que formam

azeótropos. Algumas aplicações desta técnica podem ser visualizadas na Figura 1 (Habert, Borges e Nobrega, 2006).

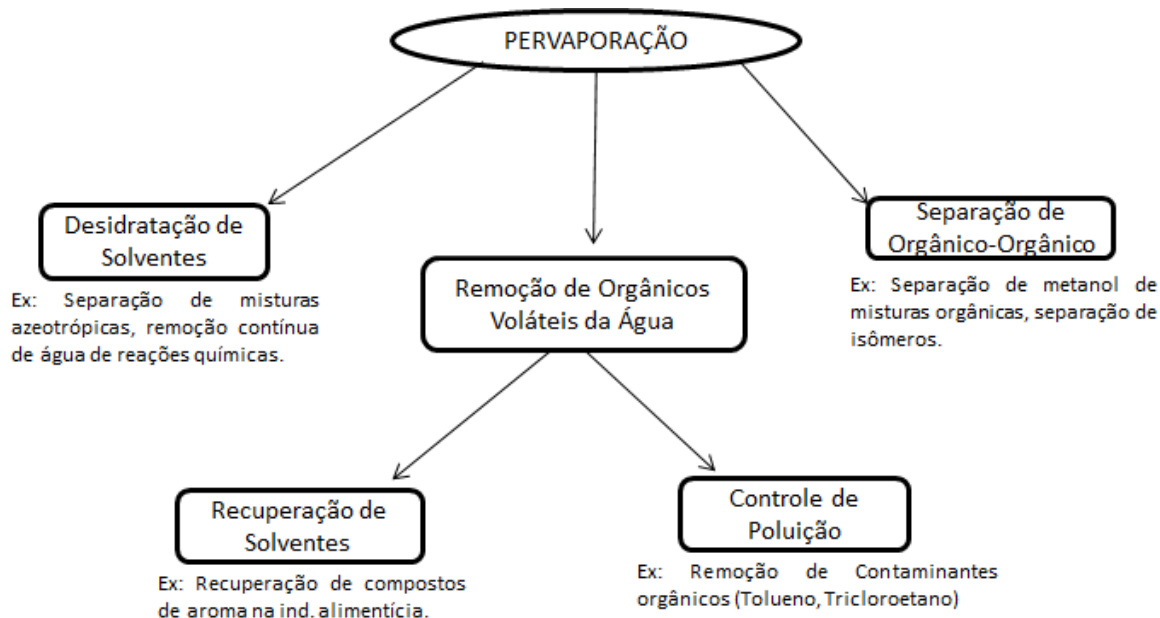


Figura 1: Esquema com as principais aplicações da pervaporação

A pervaporação é um processo de separação que envolve mudança de fase. A espécie líquida adsorve na superfície, e sofre mudança de fase de forma a permear a membrana densa, pelos vazios atômicos. A alimentação que entra no módulo de membrana é líquida e sai no permeado na forma gasosa. Isto pode ser alcançado realizando-se vácuo no lado permeado da membrana. Desta maneira, a pressão do lado permeado será menor do que a pressão de saturação dos componentes, fazendo com que os mesmos passem à fase vapor. Uma alternativa ao uso de vácuo é utilizar um fluxo transversal de gás inerte no lado permeado da membrana ou através do aumento de temperatura da alimentação. Neste caso, o aumento de temperatura provocará um aumento do coeficiente de atividade dos componentes e facilitará a passagem dos compostos menos solúveis na solução de alimentação para a forma vapor (Habert, Borges e Nobrega, 2006).

A pervaporação utiliza membranas de morfologia densa, sendo que a seletividade depende da afinidade entre o soluto permeado com o material da membrana, e o transporte segue o mecanismo de sorção-difusão. Portanto, a permeação pode ser dividida em três etapas: sorção dos componentes da fase líquida no material da membrana, difusão dos componentes dentro da membrana e

dessorção dos componentes da membrana para a fase vapor (Habert, Borges e Nobrega, 2006).

O transporte através da membrana ocorre devido a uma diferença de potencial, algumas vezes uma diferença de potencial químico, e assim as moléculas permeiam através do filme de separação do lado com maior potencial para o lado com menor potencial (Mattos e Queiroz, 1997). Esta técnica é utilizada para a separação de misturas azeotrópicas, está baseada na vaporização parcial de compostos através de uma membrana densa não porosa. A membrana age como uma barreira seletiva entre as duas fases (a fase líquida de alimentação e a fase de vapor permeável) sendo a força motriz de separação a diferença das pressões parciais dos componentes nos dois lados da membrana. A seletividade da separação é dada por diferentes taxas de transporte das moléculas através da membrana como resultado da diferença de solubilidade e difusividade dos componentes.

Luis, Degrève, Bruggen (2013) testaram 10 tipos de membranas para pervaporação com objetivo de separar misturas de metanol e acetato de n-butila. No estudo estes autores consideraram que a seletividade dependia da concentração de acetato de n-butila na solução de alimentação. As membranas PolyAn e a membrana Pervap 2255-50 mostraram o melhor desempenho, quando a concentração de solução de alimentação possuía alta concentração de acetato de n-butila. Em particular, as membranas Poly OL M1 e M2 atingiram a mais alta permeabilidade de acetato de n-butila e seletividade mais elevada (Encostam / MET $\frac{1}{4}$ 20) a 80 mol% de acetato de n-butila. Por outro lado, a membrana Pervap 1201 foi a melhor escolha quando havia um intermediário presente na mistura ou a concentração de acetato de butila era baixa na solução de alimentação. Já em relação ao efeito da temperatura sobre o processo de separação, apenas a membrana Pervap 2250 mostrou um aumento na permeabilidade e na seletividade em relação ao acetato de butila quando a temperatura foi aumentada. As outras membranas apresentaram um pior desempenho a temperaturas mais elevadas.

Catarino, Ferreira e Mendes (2009) estudaram e otimizaram a extração de compostos de aroma de cerveja com sistema de pervaporação com membranas assimétricas polyoctylmethyl siloxane/polyethe-rimide (POMS/PEI). A otimização foi realizada com metodologia de superfície de respostas ("*Central Composite Design*")

onde os fatores considerados para o "design" dos experimentos foram: temperatura de alimentação, velocidade da alimentação e a pressão do permeado. O estudo demonstrou que todos os fatores apresentaram efeito positivo na seletividade álcoois/ésteres, porém a temperatura de alimentação apresentou maior influência seguida pelos efeitos da pressão do permeado e velocidade de alimentação.

Fehér *et al.* (2009) desenvolveram um sistema integrado para pervaporação e destilação osmótica com o objetivo de separar uma mistura azeotrópica de água, álcool isoamílico e acetato de isoamila produzidos utilizando a lipase B imobilizada de *Candida antarctica*. Estes autores testaram membranas para pervaporação com modelo de mistura contendo 0,7% (m/m) de água, com excesso de álcool isoamílico, (começando com uma taxa molar de 1:7 ácido-álcool) e 0,5 % de tolueno como padrão interno (V/V). No sistema de pervaporação a membrana hidrofóbica escolhida foi a Pervap 2256 (Sulzer, Alemanha) porque esta apresentou 100% de retenção de acetato de isoamila e água, e remoção de 100 % de álcool isoamílico (Tabela 3). No processo foram necessários 38 cm² de membrana folha plana, 17 horas de reação sendo 5h de pervaporação e 12 horas de adsorção com zeólito para remoção total de 0,7% de água.

Tabela 3: Exemplos de membranas hidrofóbicas (folha plana) testadas para pervaporação de mistura álcool isoamílico e acetato de isoamila

Tipos de membranas	J _{total} (Kg/m ² .h)	RETENÇÃO		
		Álcool isoamílico (%)	Água (%)	Acetato de isoamila (%)
PV-20063	0,21	53	96	62
SulzerPervap 2250-50	0,045	17	23	100
SulzerPervap 2256	0,55	0	100	100
SulzerPervap 1060	0,43	2	17	3
Sulzer POMS/PEI	0,22	86	97	59
Sulzer PDMS/PAN	0,06	90	93	72
MetcellStarmen 120	0,16	27	8	78
MetcellStarmen 228	0,07	23	2	78

Fonte: Adaptado de Féher *et al.*, 2009.

Niemisto, Kujawiski e Keiski (2013) estudaram o desempenho da membrana de polidimetilsiloxano (PDMS) com suporte de poliacrilonitrila (PAN) em pervaporação com objetivo de separar misturas de acetona/butanol/etanol produzidos por fermentação. Estes autores determinaram o efeito da composição de alimentação testando misturas binárias, ternárias e quaternárias de acetona, butanol, etanol e água. Todas as misturas na alimentação utilizadas foram soluções aquosas com a concentração de compostos orgânicos abaixo de 5% (m/m), simulando a concentração de acetona/butanol/etanol em típico processo de fermentação. Diferentes misturas na alimentação foram utilizadas a fim de descobrir a eficiência de remoção de acetona, butanol e etanol a partir de soluções aquosas diluídas. A permeabilidade/seletividade da membrana conforme as concentrações do permeado foi na seguinte ordem: acetona>butanol>etanol. A temperatura da solução de alimentação foi mantida constante a 42°C.

Thiyagarajan *et al.* (2011) testaram membranas de copolímero, bloco de poliéter e poliamida (PEBA) e polidimetilsiloxano (PDMS) em pervaporação, com objetivo de separar misturas de etil/metil/cetona da água. Os experimentos testaram distintas concentrações da mistura (10,15 e 20%) na alimentação, temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressão no “downstream” em torno de 3 a 7,5 mmHg. A baixas temperaturas, a membrana PEBA apresentou maior fluxo (0,12 Kg/m².h) que a PDMS (0,06 Kg/m².h), porém a altas temperaturas as duas membranas apresentaram fluxo praticamente idênticos, indicando assim que para esta mistura a membrana PDMS é mais apropriada em condições de altas temperaturas. A influência da concentração na alimentação foi muito mais baixa para PEBA que para PDMS, porém alguns parâmetros foram considerados como: o coeficiente de difusividade aparente independente da concentração na alimentação e análise de transporte através das membranas para a mistura de metil/etil/cetona-água por pervaporação. Os perfis de concentração nas membranas foram obtidos através dos parâmetros de interações polímero-líquido e líquido-líquido. A seletividade da membrana PDMS foi 7,4 vezes maior que da PEBA para esta mistura.

Bluemke e Schrader (2001) desenvolveram um sistema integrado para a produção e recuperação de compostos voláteis, no qual o biorreator foi acoplado a um módulo de membranas de pervaporação (POMS ou PEBA) A fermentação foi realizada em biorreator por *Ceratocystis moliniformis*. Os compostos produzidos

foram acetatos de etila, de propila, de isobutila e de isoamila além de citrionelol e geraniol. Com a membrana composta (POMS) obteve-se um fluxo maior de compostos de aroma em relação à membrana homogênea (PEBA). A escolha da membrana determinou a composição das classes de aroma (ésteres ou terpenos). Utilizando as membranas de POMS recuperou-se concentrações mais elevadas de ésteres, já com a membrana PEBA, concentrações de terpenos foram mais elevadas no permeado. Este sistema integrado influenciou tanto o desempenho do microrganismo quanto o perfil dos aromas recuperados por pervaporação. Este estudo apresentou uma alternativa para produzir e isolar compostos de aromas e fragrâncias do caldo cultivo sem o uso de solventes orgânicos para sua extração e possíveis inibições de produtos.

Olmo *et al.* (2014) utilizaram a pervaporação com membrana polimérica de polidimetilsiloxano hidrofóbica (Pervatech-BV, Holanda) para recuperar aroma das cervejas, Special Beer e Reserve Beer, e melhorar a qualidade sensorial das cervejas de baixo teor alcoólico e cervejas sem álcool. A alimentação foi com as cervejas e uma solução padrão (acetato de etila, acetato de isoamila e álcool isobutílico sintéticos) para posterior comparação. Foram determinados: o perfil do fluxo durante a pervaporação dos componentes, o fator de enriquecimento (β) e seletividade da membrana. Depois de recuperados, os compostos de aroma das cervejas foram adicionados às cervejas sem álcool e com baixo teor alcoólico e analisados em CG. Os resultados das análises apresentaram um aumento no teor alcoólico, porém, dentro dos limites aceitáveis em álcool por volume. O álcool isobutílico na cerveja enriquecida sem álcool aumentou 16,33%, o acetato de etila na cerveja com baixo teor alcoólico aumentou 35,72%, o acetato de isoamila não apresentou aumento em ambas as cervejas. Na análise sensorial 90% dos provadores preferiram as cervejas enriquecidas, indicando o grande impacto sobre as propriedades sensoriais das cervejas. Estes autores demonstraram que a pervaporação pode ser utilizada para recuperar compostos de aroma de cerveja e estes podem ser adicionados a cervejas com menor teor alcoólico ou sem álcool melhorando assim sua qualidade.

Martinez *et al.* (2013) concentrou compostos de aroma de um caldo de caranguejo por pervaporação e avaliou o desempenho da membrana Pervap™ 4060 quanto a temperatura de pervaporação, a concentração na alimentação e a pressão

de permeação. quanto maior a concentração de compostos voláteis na solução de alimentação, maior o fluxo total na membrana. Quanto maior a temperatura, maior o fluxo total e parcial dos componentes voláteis, enquanto o fluxo total de permeação diminuía quando a pressão aumentava. A membrana utilizada foi eficiente para concentração dos compostos de aroma presentes no caldo de caranguejo como acetato de etila, hexanal, 2-3-pentanodiona, benzaldeído, 3-metilbutanal.

Weschenfelder *et al.* (2015) concentrou compostos de aroma identificados em uma solução industrial de café solúvel (benzaldeído, furfural, metil furfural, acetaldeído, metil butanal, pentanodiona, butanodiona e dimetilpirazina) por pervaporação com membrana PDMS (Pervatech BV, Holanda). A temperatura e pressão de permeação apresentaram efeito no desempenho da pervaporação, porém fenômenos de concentração por polarização não foram identificados quando a vazão da alimentação foi estudada.

De maneira geral, os resultados dos estudos apresentados indicaram que as membranas compostas de polidimetilsiloxano são mais eficientes para recuperação de compostos de aroma. Com isso, neste trabalho optou-se pelo uso de uma membrana de polidimetilsiloxano.

3.5 HS-SPME- GC (“HEADSPACE- SOLID PHASE MICRO EXTRACTION-GAS CHROMATOGRAPHY”)

É uma técnica de extração utilizada para análise de compostos voláteis ou não-voláteis. As análises no processo de produção e pervaporação dos compostos de aroma são mais eficientes quanto à quantificação e qualificação de ésteres quando realizadas por microextração do “*headspace*” em fibra de polidimetilsiloxano. Esta técnica de microextração – SPME é utilizada para extração de amostras, isenta de solvente, que integra extração e concentração de compostos voláteis e não voláteis, de líquidos ou “*headspace*” em uma fibra de sílica fundida recoberta por polímero, um sólido adsorvente ou uma combinação dos dois, em única etapa de extração (ALPENDURATA, 2000; KATAOKA, 2000). Processo onde o agente ativo é recoberto com polímeros sendo que a posterior liberação desses agentes ocorrerá

somente em condições específicas. Promove-se a estabilidade do produto e o aumento da sua vida útil (GOULA, 2005; GHARSALLAOUI, 2007).

A fibra de sílica é um filamento capilar mantido em uma agulha oca (tubo retrátil). A extremidade exibível da fibra (10-20 mm) é recoberta por um filme (7-100 μm), cuja natureza química é semelhante à dos recheios de colunas cromatográficas, por exemplo, polidimetilsiloxano/PDMS, poliacrilato/PA, carbowax/CW, carboxen/CAR e divinibenzeno/DVB.

Esse filme age como uma esponja, concentrando os analitos orgânicos na sua superfície durante a absorção ou adsorção da matriz da amostra. Na extremidade oposta do dispositivo, existe uma espécie de parafuso (“hub”), que é usado para conectar a fibra ao amostrador (“holder”), possuindo uma cor específica para cada tipo de revestimento de fibra (KATAOKA *et al.*, 2000; VALENTE e AUGUSTO, 2000). Como esta é um dispositivo frágil para tornar seu uso mais prático, ela é incorporada ao “holder”, que é um suporte (uma espécie de seringa modificada) que sustenta o dispositivo da fibra de modo que ela seja facilmente manipulável.

A fibra é presa a um êmbolo, na extremidade oposta, deixando o tubo hipodérmico exposto, o qual além de proteger a fibra, funciona como agulha na perfuração dos septos dos recipientes das amostras. SPME pode ser usada em dois modos de princípio: extração direta ou por “*headspace*”.

Para extração de modo direto, a fibra revestida é inserida diretamente na amostra, e analitos são extraídos diretamente da matriz da amostra na fase de extração. No modo “*headspace*”, a fibra é colocada logo acima do volume da matriz (que pode ser líquida ou sólida). O modo de extração por “*headspace*” é o método que tem sido usado para análise de compostos voláteis de frutas (PAWLISZYN *et al.*, 1997; KATAOKA *et al.*, 2000).

Carvalho *et al.* (2014) otimizaram o método HS-SPME para determinar a concentração de compostos de aroma frutal produzido por *Neurospora sitophila*. Os autores testaram três membranas (Supelco-EUA): PDMS100 μm , CAR/PDMS 75 μm e DVB/PDMS 65 μm . Foi definida a melhor condição para o procedimento de SPME, entre cinco tempos de equilíbrio (0, 3, 5, 7, 10 min) e quatro tempos de extração (10, 20, 30, 40 min) para a análise do “*headspace*” de um padrão de etil-hexanoato. Limites de detecção de 0,6 mg/L e limite de quantificação de 1,9 mg/L com precisão de 73% foram encontrados por estes autores.

3.6 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é o processo onde o agente ativo é aprisionado por meio de uma cobertura de polímeros com a liberação desses agentes ativos ocorrendo em condições específicas, protegendo o material das condições adversas do meio, promovendo a estabilidade do produto e o aumento da sua vida útil. A principal forma de obtenção das microcápsulas é pelo processo de atomização ou “*spray drying*” (GOULA 2010; GOULA, 2005; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O método de secagem em spray-dryer tem sido utilizado há décadas para encapsular ingredientes utilizados em alimentos como compostos de aroma, lipídeos, óleos essenciais, etc. Este requer estudos de agentes encapsulantes, bem como otimização das condições de operação (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Amido e ingredientes à base de amido (amido modificado, maltodextrinas, β -ciclodextrinas) são amplamente utilizados na indústria alimentar para reter e proteger os compostos voláteis de aroma. Eles podem atuar como veículos para encapsulação de aroma, substitutos de gordura e também como emulsões estabilizadoras.

As maltodextrinas são formadas por hidrólise parcial do amido de milho com ácidos ou através de enzimas, as quais são fornecidas como equivalentes de dextrose (DE). O valor da DE é uma medida do grau de polímeros de amido obtidos durante a hidrólise. Eles manifestam a capacidade de formar matrizes que são importantes na formação de microcápsulas. Como material de parede a maltodextrina é um bom agente encapsulante em relação ao custo e a eficácia, não possui sabor relevante, possui baixa viscosidade a uma elevada razão de sólidos e está disponível em diferentes pesos moleculares, porém tem grande deficiência na capacidade emulsificante e assim baixa retenção de compostos voláteis (Yoshi *et al.*, 2001).

A goma arábica é frequentemente usada como um material encapsulante de aromas. A sua solubilidade, baixa viscosidade, características de emulsificação e boa retenção de compostos voláteis tornam-na muito versáteis para a maioria dos métodos de encapsulamento. O material de parede é adequado para o encapsulamento de gotículas lipídicas, uma vez que funciona como agente ativo de superfície e atua na secagem da matriz, evitando assim a perda de voláteis em

contato com a atmosfera, porém esta é mais cara que a maltodextrina (Shiga *et al.*, 2001; Madene *et al.*, 2006).

Misturas de goma arábica e maltodextrina têm sido promissoras como veículos com alto teor de sólidos. Como propionato de etila, butirato de etila, óleo de laranja, aldeído cinâmico e benzaldeído encapsulados em mistura de goma arábica e maltodextrina, no qual foi observada uma tendência de aumento na retenção dos compostos voláteis quando a fração de goma arábica foi aumentada (Madene *et al.*, 2006).

Yoshi *et al.* (2001) estudaram liberação do composto de aroma, butirato de etila, seco em spray-drier com uma mistura de 10-30% de maltodextrina e 10% de goma arábica como agentes encapsulantes. Estes observaram que a liberação de butirato de etila diminuía à medida que a concentração de maltodextrina na alimentação de líquido aumentava. Apintanapong e Noomhorm (2003) utilizaram diferentes razões de goma arábica e maltodextrinas para encapsular apropriadamente, por secagem por pulverização, o 2-acetil-1-pirrolina, composto de aroma de pão branco, arroz ou da mandioquinha/batata salsa. Estes autores mostraram que as combinações de goma arábica e maltodextrina, 70:30, apresentaram formação de cápsulas com melhor retenção de voláteis.

Aburto *et al.* (1999) testaram para microencapsulação do óleo essencial de laranja os agentes encapsulantes: goma arábica, maltodextrina, amido modificado e mistura de amido modificado (Capsul) com maltodextrina. A goma arábica apresentou baixa viscosidade em solução aquosa e favoreceu a estabilidade das emulsões. A retenção de compostos voláteis foi acima de 85%, e ainda apresentou efetiva proteção contra a oxidação. A maltodextrina possui baixa higroscopicidade, baixo custo e evita a aglomeração das partículas. Além do efeito antioxidante, a maltodextrina apresentou retenção de voláteis na faixa de 65 a 80%. O amido modificado é usado pela excelente retenção de voláteis (acima de 93%), pela estabilização da emulsão, baixa viscosidade. A mistura de amido modificado (Capsul) e maltodextrina apresentou maior eficiência de encapsulamento do óleo com 94% de retenção de voláteis.

O processo de microencapsulação vem sendo usado para proteger e melhorar a estabilidade de compostos bioativos presentes em alguns sucos de frutas, como açaí e camu-camu (TONON, BARBET e HUBINGER, 2009; DIB TÁXI,

2001). Estes autores avaliaram a influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó produzido por spray-drying. A temperatura do ar de secagem foi estudada de 138 a 202 °C e a concentração de maltodextrina, entre 10 e 30%. O aumento da temperatura resultou em partículas maiores, menos úmidas, mais higroscópicas e com menor retenção de antocianinas. O aumento na concentração de maltodextrina resultou em partículas maiores e menos higroscópicas. Em relação à morfologia, o aumento da temperatura levou à formação de uma maior quantidade de partículas com superfície lisa, fato atribuído à maior transferência de calor e, conseqüentemente, à formação mais rápida de uma membrana ao redor da gota atomizada.

Osório *et al.* (2010) caracterizaram e avaliaram o extrato do suco de goiaba microencapsulado por “spray-drying”. O extrato aquoso de polpa do fruto foi encapsulado com maltodextrina, goma arábica, e suas misturas. A utilização da goma arábica melhorou a fluidez durante o processo de secagem, mas produziu um sabor residual indesejável e diminuiu a estabilidade térmica nos pós microencapsulados finais. Os pós mais promissores na pesquisa foram a maltodextrina e a mistura de maltodextrina e goma arábica, estes apresentaram microcápsulas esféricas, maior estabilidade da estrutura dos microencapsulados e liberação do aroma. A retenção dos compostos voláteis de aroma de goiaba nos pós foi confirmada usando HS-SPME-GC/MS. Devido às suas propriedades sensoriais, os produtos desenvolvidos no estudo a partir de frutos foram inovadores e naturais, podendo ser incorporados em diferentes produtos alimentares.

Balasubramani *et al.* (2015) testaram microencapsulação de óleo resina de alho por secagem por pulverização variando a concentração de óleo resina de alho, de maltodextrina (40%, 50% e 60%) como agente encapsulante e a temperatura de entrada de ar de secagem (180 °C, 200 °C e 220 °C), como parâmetros do processo. A melhor concentração de óleo resina de alho encontrada foi de 10%, a concentração de maltodextrina foi 60% e a temperatura de entrada de ar de secagem de 200 °C, com a máxima eficiência de encapsulação de 81,9%. O pó microencapsulado obtido em condições otimizadas analisado por meio de microscopia eletrônica de varredura apresentou forma esférica com superfície lisa.

Janiszewska, Jedlińska e Witrowa-Rajchert (2014) examinaram a relação entre parâmetros de homogeneização de emulsão com aroma de limão e as propriedades físicas dos pós obtidos. Uma emulsão de 30% de maltodextrina e goma arábica na proporção de 7: 1 em massa de água e aroma foi preparado. A adição de aroma de limão foi de 2, 6 e 10% (w / w). Aumento da adição de aroma causou um aumento na viscosidade. Na forma de pó, com uma quantidade crescente de aroma, foram observadas solubilidade e leveza, independentemente do método de homogeneização, houve aumento na porosidade, tamanho da partícula e uma diminuição da densidade aparente. A mais baixa densidade aparente do pó foi encontrada para uma emulsão contendo 6% de aroma. Os formatos das partículas de pó não diferiram entre si.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para o desenvolvimento de um bioprocesso para produção de aroma frutal por *P. fermentans* foram realizados nos laboratórios do departamento de Engenharia de Bioprocessos, LPBI e LPB II. Contaram também com o apoio do Laboratório de Emulsões (Emultec) e do Laboratório de Análise de Combustíveis (Lacaut), ambos do departamento de Engenharia Química/UFPR. A sequência de estudos fundamentou-se nas etapas do processo conforme mostrado no fluxograma da Figura 2.

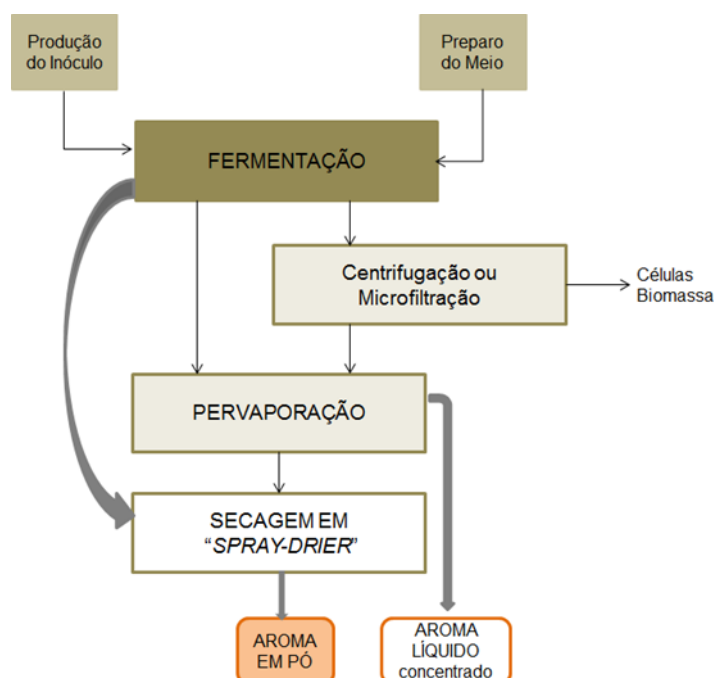


Figura 2: Fluxograma do bioprocesso desenvolvido para produção de aroma frutal

4.1 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

A linhagem *Pichia fermentans* (ITD00165), proveniente e cedida pelo Instituto Tecnológico de Durango/México, previamente isolada e caracterizada bioquimicamente (M. C. Lerma, 2009), foi conservada em tubos inclinados contendo “*Yeast Malt Agar*” (YMA-Himedia) sob refrigeração. Para reativar a cepa procedeu-se a transferência de uma alçada de células contidas em um tubo inclinado para 50 mL de caldo YM (“*Yeast Malt Broth*”- *Himedia*) contido em frasco erlenmeyer 125 mL. O

frasco foi incubado sob agitação em incubadora tipo “*shaker*” a 30°C, 120 rpm por 24 horas. As células foram contadas em câmara de “*Neubauer*”. O volume de inóculo transferido para meio de cultivo foi de acordo com cada experimento.

4.2 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo, inicialmente foi preparado com 50 g/L de melaço de cana, 1g/L de leucina e 5 g/L de sulfato de magnésio, autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

4.2.1 Características do Melaço De Cana

O melaço de cana de açúcar proveniente da Usina São Manoel/ SP foi utilizado como fonte de carbono nas fermentações. A caracterização físico-química do melaço incluiu a determinação do pH, teor de umidade, cinzas, açúcares totais, açúcares redutores e análise elementar (C, N, H, O, S).

A determinação da composição elementar do melaço de cana foi realizada em Analisador CHNS-O Thermo Flash 2000. A determinação de umidade consistiu em pesar aproximadamente 5g de amostra, em cadinhos previamente tarados, e secar em estufa a 105° C por 24 horas (Instituto Adolfo Lutz, 1985). As cinzas foram determinadas a partir de calcinação em mufla a 660°C de aproximadamente 2g da amostra previamente seca em estufa até peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

4.2.2 Sulfato de Magnésio

O sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - VETEC /RJ) foi utilizado no meio conforme estudos anteriores. Este composto foi adicionado ao meio de cultivo devido ao efeito de proteção das células durante a fermentação, (Silva *et al.*, 2012).

4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação do pH

O pH do melão e dos meios fermentados foi medido em potenciômetro digital. A partir de uma solução contendo 5g do melão de cana em 50mL de água deionizada.

As amostragens dos fermentados foram retiradas a cada 6 horas em seguida medidos o pH.

4.3.2 Determinação do teor de açúcares

A quantificação de açúcares totais e redutores foi realizada pelo método de Somogyi-Nelson (1952). Os açúcares redutores dos fermentados foram determinados a partir de 1 mL da solução de amostra convenientemente diluída e 1 mL do reativo A de Somogyi-Nelson. A mistura foi mantida por 10 minutos em banho-maria em ebulição. Após o resfriamento, 1 mL do reativo B de Somogyi-Nelson e 7 mL de água foram adicionados. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os açúcares totais foram determinados seguindo procedimento semelhante, porém submetendo a amostra (1mL) à hidrólise ácida com 2 mL de ácido clorídrico (HCl). A mistura foi levada a banho-maria por 20 minutos e após o resfriamento, foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 40% (p/v). A seguir, procedeu-se de maneira semelhante à dosagem de açúcares redutores. Um tubo contendo água no lugar da amostra foi utilizado como branco do método.

4.3.3 Determinação da biomassa

A biomassa produzida durante a fermentação foi quantificada através do método direto, que consiste na secagem da biomassa produzida pela determinação do peso seco a 105°C.

A biomassa de levedura foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos em centrífuga digital microprocessada modelo CT 6000(CIENTEC-Piracicaba/SP). O sobrenadante foi retirado e a biomassa foi lavada com água destilada. A mistura foi novamente submetida à centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos, este ciclo foi repetido 3 vezes, em tubos “Falcon” previamente secos e tarados. Ao final do último ciclo, os tubos contendo a biomassa foram secos em estufa a aproximadamente 105°C por 24 horas (peso constante). Após resfriamento até temperatura ambiente em dessecador, os tubos foram pesados em balança analítica (BEL Engineering-MARK 210A). O primeiro sobrenadante retirado foi reservado para posteriores dosagens de açúcares totais e redutores conforme item 4.3.2.

A biomassa obtida foi calculada através da equação (1):

$$\text{Biomassa, g/L} = \frac{M_f - M_{\text{tubo}}}{V} \quad (1)$$

onde,

M_f = massa final após secagem do tubo contendo biomassa, em g

M_{tubo} = massa inicial do tubo tarado, em g

V = volume do fermentado, em L

4.3.4 Padronização da Técnica de Microextração em Fase Sólida “SPME”

A análise dos compostos de aroma por microextração em fase sólida (SPME) foi previamente padronizada em relação ao tempo e temperatura de exposição da fibra, utilizando uma solução padrão de acetato de isoamila.

Foram testados tempos de exposição da fibra durante 5, 15, 20 e 30 minutos, e temperaturas de 30, 40 e 55°C. A fibra de SPME foi exposta completamente (1 cm) ao “*headspace*” da amostra contida em frascos “*vials*” de 20 mL com tampas rosqueáveis em teflon e septo de silicone. Os “*vials*” foram dispostos em equipamento com agitador magnético, aquecimento, sensor de temperatura e suporte para “*holder*” (IKA RCT *basic safety control*). Este equipamento possui bloco/suporte para “*vials*” em alumínio para manter ótima transferência de calor durante todo o processo, sem interferências com o campo magnético, assegurando

que as amostras sejam processadas na mesma temperatura e uniformemente misturadas.

As amostras foram preparadas em soluções contendo 1% de cloreto de sódio, conforme recomendação do fabricante (Supelco Inc., Bellefonte, PA,USA), para evitar inchaço e/ou danos na fibra utilizada, com padrão de acetato de isoamila P.A. (SIGMA- ALDRICH) com concentração final de 0,42 µg/L de acetato de isoamila por litro de “*headspace*”.

Tempos de exposição da fibra ao “*headspace*” de 5, 15, 20 e 30 minutos foram testadas a 30°C com 5 mL da solução em frasco “*vial*” de 20 mL. Em seguida realizou-se a exposição da fibra as temperaturas de 30, 40 e 55°C durante 30 minutos com 5 mL de solução padrão de acetato de isoamila. Após a exposição da fibra ao *headspace* esta foi dessorvida diretamente no injetor do CG para análise.

Os resultados obtidos foram submetidos a teste de variância ANOVA sendo as variáveis comparadas por pós-teste de “Tukey” (“*Graph Pad Prism*”).

Determinados a temperatura e tempo de exposição, fez-se uma curva padrão para se determinar a concentração de saturação da fibra (SPME).

4.3.5 Análise dos Compostos Voláteis em CG (Cromatógrafo Gasoso)

Os voláteis produzidos foram quantificados por cromatografia gasosa (CG) a partir da análise do “*headspace*” por microextração em fase sólida (SPME).

A fibra utilizada foi de carboxeno-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 75 µm de espessura de filme, acoplada a suporte para injeção manual “*holder*” (Supelco Inc., Bellefonte,PA,USA).

As amostras do cultivo nos tempos 0, 6, 12, 24 e 28 horas ou até a observação de diminuição na produção de voláteis foram submetidas à análise do “*headspace*” por “SPME”. A exposição da fibra foi de 30 minutos à temperatura de 30°C e a dessorção ocorreu diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso. O volume de amostras do aroma foi de 5 mL em frascos “*vial*” de 20 mL, estes acondicionados em chapa aquecedora com agitação magnética para microextração por SPME (Figura 3). O aroma produzido em pó foi ressuspenso com adição de 0,1g do aroma em pó em 5 mL de solução de NaCl (1%) em frascos “*vial*” de 20 mL e analisados conforme outras amostras.



Figura 3: (A) Aquecedor/ agitador para microextração do aroma por SPME (B) Detalhe do “holder” acoplado ao injetor do CG para dessorção da fibra.

A análise dos voláteis foi realizada em cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GC17A, equipado com coluna HP-DB 5 (30 m x 0,32 mm) e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250 °C. A temperatura do forno foi programada inicialmente a 40°C durante 5 minutos, sendo aumentada a uma taxa de 20°C/min até a temperatura final de 150 °C, mantendo-se durante 4 minutos. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio a uma vazão de 1,5 mL/min, a razão de “split” foi de 1:5 (razão do volume de injeção de uma amostra pelo volume de diluição, que acontece dentro do injetor).

A concentração de voláteis foi calculada a partir de uma curva-padrão de acetato de isoamila, obtida através da análise por SPME. Plotando-se distintas concentrações do padrão versus a área do pico obtido por cromatografia gasosa obteve-se a equação da curva.

A identificação dos compostos por cromatografia foi realizada por comparação do tempo de retenção dos compostos presentes no “headspace” com o tempo de retenção de diferentes padrões puros (SIGMA-ALDRICH) analisados nas mesmas condições. Na Tabela 9, apresentam-se os padrões e seus respectivos tempos de retenção obtidos por CG, conforme descrito anteriormente. Estes padrões foram utilizados para identificação prévia dos compostos produzidos por fermentação.

TABELA 4: Tempos de retenção dos padrões de compostos voláteis obtidos por CG

Padrão	Tempo de retenção (minutos)
Metanol	1,855
Acetaldeído	1,869
Ciclohexano	1,967
Álcool etílico	1,974
2,3-butanodiona	2,526
Acetato de etila	2,670
Hexano	2,764
Ácido acético	3,154
n-butanol	3,208
2-pentanona	3,559
Propionato de etila	4,011
Acetato de propila	4,058
3-metil-1-butanol	4,480
Isobutirato de etila	5,224
1-pentanol	5,375
Acetato de isobutila	5,552
2-hexanona	5,980
2-hexanol	6,084
Acetato de n-butila	6,459
1-hexanol	7,519
Acetato de isoamila	7,695
2-heptanona	7,934
Benzaldeído	9,040
1-heptanol	9,193
2-octanona	9,419
Hexanoato de etila	9,519
2-octanol	9,543
Acetato de hexila	9,696
1-octanol	10,375
1-decanol	12,706

4.3.6 Determinação dos íons presentes no fermentado

Os cátions (Na^+ , K^+ e Mg^{+2}) foram quantificados por cromatografia de íons (Metrohm – 817 Bioscan/761 Compact IC) com coluna catiônica (Metrosep C3 250/4.0). A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido nítrico 5 mM. Os

resultados de concentração foram calculados utilizando solução padrão externa com íons sódio, potássio, magnésio e amônio. As amostras foram analisadas durante 0, 6, 12, 24 e 28 horas de fermentação.

4.3.7 Análise dos compostos de aroma por CG/MS

O processo de identificação dos componentes de aroma foi confirmado, realizando-se a análise em CG Varian 450 acoplado a um detector de massa Varian 320, TQ “*Mass Spectrometer*” e coluna HP-1MS (Agilent J&W, 30 m x 0,25mm e filme de 1 μ m).

O tempo de corrida foi de 21 minutos com injeção manual de 400 μ L de “*headspace*” com seringa “*gas tight*” em CG, temperatura do forno de 40 °C com rampa de 10 °C/min a 200 °C, injetor a 250 °C, “*split*” de 1:2. No espectrofotômetro de massa, a câmara de ionização operou em 250 °C, “*transferline*” a 280 °C, sendo a faixa de varredura de 10 a 300 m/z (massa/carga).

As amostras analisadas foram os aromas líquidos (amostras 1 e 2) que foram aplicados em bebidas, e os aromas em pó (fermentado, aroma com maltodextrina e aroma com mistura de maltodextrina e dextrina). Os aromas na forma de pó (0,1 g) foram ressuspensos em 5 mL de solução de NaCl a 1% .

4.3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Os aromas encapsulados obtidos foram analisados por microscopia de varredura para verificar o formato, superfície e tamanho das microcápsulas com o objetivo de relacionar estes resultados com a capacidade de retenção dos voláteis e também avaliar a eficiência do processo de secagem em “*spray-dryer*”.

As amostras em pó do acetato de etila e do aroma natural concentrado e microencapsulados foram fixadas em suporte “*stube*” com fita dupla face de carbono revestidas/metalizadas com ouro sob atmosfera de argônio em metalizador SCD 30 Balzers. Em seguida, foram analisadas em microscópio de micro varredura Tescan

Vega 3 LMU no Centro de Microscopia Eletrônica-CME/UFPR, verificando-se uniformidade de tamanho e formação de ranhuras na superfície das microcápsulas.

4.3.9 Determinação da viabilidade celular do fermentado e do fermentado bruto em pó

Para a determinação do número de células viáveis foi realizada uma diluição inicial de 1:10, na qual 1 mL das suspensões celulares foi diluído em 9 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,85%). Procedeu-se uma diluição seriada até diluição de 10^{-6} . Em seguida, 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram utilizadas para cultivo em placa de Petri contendo meio YM ágar pelo método “*Pour plate*”. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. As contagens foram realizadas em triplicatas e a média do n° colônias foi utilizada para o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC) /mL para o fermentado líquido de acordo com a equação (2) e para o aroma bruto em pó, equação (3):

(2)

(3)

Onde,

N = média do n° colônias contadas na placa

f = fator de diluição da amostra

4.4 ESTUDO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA

O objetivo deste estudo foi determinar os principais fatores que poderiam influenciar na produção do aroma desejado. Foi utilizado o programa Statistica ® versão 5.0 para delineamento e análise do planejamento experimental. Esta é uma ferramenta utilizada para estudar os efeitos das variáveis de um processo

fermentativo e também estabelece modelos estatisticamente viáveis para expressar as interações entre as variáveis e os resultados (BARROS-NETO *et al.*, 1995).

4.4.1 Primeiro Planejamento Experimental

Visando o estudo das condições do processo de produção do acetato de isoamila por *P. fermentans* em meio à base de melaço de cana, foi utilizado um planejamento experimental fatorial 2^{4-1} com 8 ensaios e 3 repetições no ponto central. Foram estudados neste planejamento a temperatura, o pH, a taxa de inóculo e a agitação. A matriz de experimentos realizados está apresentada na Tabela 5. O experimento foi realizado em erlenmeyers e o meio utilizado continha 50 g/L de melaço de cana, 1 g/L de leucina e 5 g/L de sulfato de magnésio.

Tabela 5: Planejamento experimental fatorial 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central para produção de acetato de isoamila por *P. fermentans* em meio a base de melaço.

Temperatura	pH	Taxa de inóculo	Agitação
+1	+1	+1	+1
+1	+1	-1	-1
+1	-1	+1	-1
+1	-1	-1	+1
-1	+1	+1	-1
-1	+1	-1	+1
-1	-1	+1	+1
-1	-1	-1	-1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Níveis: Temperatura = 30°C (+1); 28 °C (0) e 26 °C (-1); pH = 5,9 (+1); 5,4 (0) e 4,9 (-1), Taxa de Inoculo, em células/mL de meio = 108 (+1); 107 (0) e 106 (-1), e Agitação, em rpm = 140 (+1); 120 (0) e 100 (-1).

4.4.2 Segundo Planejamento Experimental

A composição do meio utilizado no processo foi estudada através de um novo planejamento experimental. Este planejamento foi um fatorial completo 2^3 com 8 ensaios e 3 repetições nos pontos centrais. Nele foram testados: a concentração de melaço de cana, a concentração de L-leucina (Vetec, Rio de Janeiro) e a

concentração de sulfato de magnésio. A matriz formada pode ser observada na tabela (6).

Tabela 6: Planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central para produção de acetato de isoamila por *P. fermentans* em meio a base de melaço .

Melaço de cana	Leucina	Sulfato de magnésio
+1	+1	+1
+1	+1	-1
+1	-1	+1
+1	-1	-1
-1	+1	+1
-1	+1	-1
-1	-1	+1
-1	-1	-1
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Os valores estudados de concentração foram: Melaço de cana = 250 g/L (+1); 150 g/L (0) e 50 g/L (-1), Leucina = 5g/L (+1); 2,5g/L (0) e 0g/L (-1), Sulfato de magnésio: 5g/L (+1); 2,5g/L (0) e 0 g/L (-1).

4.5 EFEITO DA LEUCINA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA

A partir dos resultados obtidos anteriormente em planejamento experimental, também foi investigado o efeito da adição de L-leucina em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio quanto à produção de acetato de isoamila durante fermentação submersa por *Pichia fermentans*. Os meios foram preparados adicionando concentrações de 1g/L e 5g/L de L-leucina em meio contendo 50g/L de melaço de cana e 5g/L de sulfato de magnésio. As fermentações foram realizadas sob agitação de 120 rpm à 30 °C, em incubadora tipo “shaker”. Foi preparado um controle, no qual o meio de cultivo continha apenas melaço de cana e sulfato de magnésio sem adição de L-leucina.

O inóculo foi preparado em caldo YM cultivado em "shaker" a 30°C durante 24 horas e em seguida, 10^7 células/mL foram transferidas para o meio de fermentação. As análises dos compostos de aroma foram realizadas por CG-HS-SPME conforme item 4.3.5, e os resultados foram analisados conforme a concentração obtida de

acetato de isoamila em ppm e submetidos a análise de variância ANOVA, sendo as variáveis comparadas pelo Teste de Tukey (GRAPH PAD PRISM).

4.6 ESTUDOS EM BIORREATOR

O perfil da produção de acetato de isoamila e voláteis totais foi determinado em fermentação submersa durante 28 horas de fermentação com amostragens de 6 em 6 horas até diminuição da produção de acetato de isoamila. O meio de cultivo foi preparado conforme resultados obtidos em estudos anteriores. Neste utilizou-se solução contendo 50 g/L de melaço de cana, 5g/L de leucina e 5g/L de sulfato de magnésio com total de 1,5 L de meio em biorreator de bancada de 2 litros (Figura 4). As condições de cultivo foram: pH inicial 5,5, temperatura de 30 °C, agitação de 120 rpm e aeração nas primeiras 6 horas a 0,5 vvm de ar.



Figura 4: Biorreator de bancada de 2 L utilizado para produção de acetato de isoamila por *P. fermentans*

4.6.1 Efeito da Adição de Leucina e Aeração em Biorreator de Bancada

Foi testada a adição de leucina nas concentrações de 1 g/L e 5 g/L no meio de cultivo em biorreator. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas anteriormente, entretanto a aeração de 0,5 vvm de ar foi interrompida com 12 horas de fermentação e não, com 6 horas. Os resultados foram comparados com a fermentação chamada de controle (sem adição de leucina no meio).

Foram testados os tempos de aeração de 6 e 12 horas durante a fermentação submersa, 1,5 L de meio de cultivo foi preparado com solução de 50g/L de melaço de cana, 5 g/L sulfato de magnésio e 1g/L de leucina. As condições de cultivo foram:

pH inicial 5,5, temperatura de 30°C, agitação de 120 rpm e taxa de inóculo de 10^7 células/mL de meio.

Após as fermentações, os caldos fermentados foram submetidos à centrifugação em centrífuga refrigerada (HITACHI modelo HIMAC CR21E) para retirada das células. O sobrenadante foi analisado e mantido em congelador para posteriores estudos de recuperação dos compostos de aroma por pervaporação. Foram dosados os açúcares redutores e totais, pH, biomassa e concentração de acetato de isoamila nos tempos 0, 6, 12, 24 e 28 horas.

4.6.2 Experimentos em Batelada Alimentada

A fermentação em batelada alimentada foi realizada com o objetivo de manter a produção de acetato de isoamila em níveis máximos durante o cultivo.

A fermentação em biorreator de 2L iniciou-se com 1,5 L de meio (1 g/L de leucina, 50 g/L de melaço de cana e 5g/L de sulfato de magnésio) nas seguintes condições de cultivo: 30°C, pH inicial de 5,2, agitação de 120 rpm, aeração de 0,5 vvm e taxa de inóculo de 10^7 células/mL de meio. Foram realizadas alimentações a cada 6 horas com adição de 0,75 L de meio, completando um total de 18 horas de cultivo. O caldo fermentado também era retirado a cada 6 horas e armazenado sob refrigeração até obtenção de 3L de fermentado.

Os 3L obtidos durante a fermentação em batelada foram microfiltrados em sistema Pellicon (Millipore) com o objetivo da retirada das células do meio de cultivo para posteriores estudos de recuperação dos compostos voláteis de aroma por pervaporação. A filtração foi realizada em condições de baixa temperatura com membrana de 0,22 μm .

4.7 SISTEMA DE PERVAPORAÇÃO

Com o objetivo de concentrar e recuperar compostos voláteis de aroma (principalmente acetato de isoamila) presentes nos fermentados produzidos por *P. fermentans*, o caldo fermentado foi submetido à pervaporação em sistema pervaporador conforme esquematizado na Figura 5.

O módulo de pervaporação (Figuras 5 e 6), disponibilizado pelo Laboratório de Emulsões EMULTEC-UFPR, consiste de um banho termostático (modelo Quimis), bomba de deslocamento positivo (Bomax do Brasil), tanque de alimentação com volume útil de 4 L, célula de permeação, frasco de 1,5 L como suporte para “Cold Trap” (Pyrex Corning) contendo N_2 líquido, bomba de vácuo Boc Edwards modelo RV12 e vacuômetro digital Instrutherm modelo VDR-920.

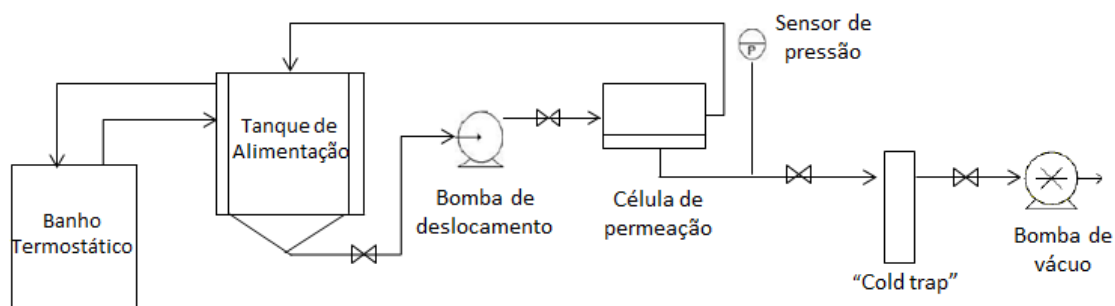


Figura 5: Diagrama do módulo de pervaporação



Figura 6: Módulo de pervaporação do Emultec - UFPR

(1) Banho termostático, (2) Tanque de alimentação, (3) Bomba de deslocamento positivo, (4) Célula de permeação, (5) Frasco suporte para “Cold Trap”, (6) “Cold Trap”, (7) Bomba de vácuo e (8) Vacuômetro digital.

A célula de permeação (Figura 7) consiste em dispositivo metálico como suporte para membrana plana e proporciona um escoamento radial na superfície da membrana. A membrana utilizada foi a PERVAPTM4060 (Sulzer Chemtech AG, Allschwil, Suíça), membrana organofílica polimérica com filme de separação de

polidimetilsiloxano. Esta foi cortada em círculo com diâmetro 8 cm de acordo com tamanho da célula.



Figura 7: Detalhe da célula de permeação utilizada para pervaporação dos compostos de aroma

4.7.1 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Nos estudos de pervaporação foram testadas as temperaturas de 30, 45 e 60°C na alimentação para determinar a influência desta no fluxo do permeado (J) através da membrana e no fator de enriquecimento (β).

O tanque de alimentação foi preenchido com 3L do fermentado produzido durante fermentação submersa por *Pichia fermentans* conforme descrito no item 4.6.

Os fermentados utilizados na pervaporação foram provenientes dos estudos do efeito da adição de leucina, submetidos à um pré-tratamento para retirada das células dos mesmos, foi realizada centrifugação refrigerada (4°C) a 7000 rpm (HITACHI modelo HIMAC CR21E)

O tempo de cada ciclo de operação do sistema de recuperação dos aromas por pervaporação foi definido considerando a diminuição do vácuo de 0 para 1 mmHg, indicando que a quantidade de permeado aumentou dentro do “trap” causando uma obstrução no mesmo diminuindo assim o vácuo.

O “trap” foi mantido em N₂ líquido a -196 °C, sendo que, o vácuo na célula de permeação e do “trap” foi entre 0 e 1 mmHg medida por vacuômetro digital. Foi medido a massa do permeado em aproximadamente 1 hora de pervaporação para determinação do fluxo total durante o processo.

Ao final de cada pervaporação foram determinados fluxo total (J_t) e fluxo parcial de cada componente (J_i) do permeado, usando a equação (4):

$$J = \frac{W}{S \cdot t} \quad (4)$$

Onde,

J= fluxo do permeado, g/ m². h

W = massa do permeado, em g.

S= área da membrana em contato com o líquido em m².

t = tempo de pervaporação, em horas.

O fator de enriquecimento (β) foi calculado conforme Equação 5 para cada temperatura como indicativo da seletividade da membrana.

$$\beta = w_p/w_f \quad (5)$$

Onde,

w_p = concentração do componente no permeado

w_f = concentração do componente na alimentação

4.8 SECAGEM E MICROENCAPSULAMENTO

A secagem e microencapsulamento do aroma foram realizadas em “*spray-drier*” Labplant modelo ST05. As condições de secagem foram: Temperatura (T) de entrada do ar de 150 °C, vazão do ar 57m³/h, vazão de alimentação 390 mL/h. O bico atomizador utilizado possuía diâmetro de 0,5mm.

Com o objetivo de definir os agentes encapsulantes mais adequados foram testadas formulações com padrão de acetato de etila (>99,5%, Vetec). As formulações foram preparadas adicionando 15 mL de acetato de etila em 100 mL da emulsão preparada com adição do agente encapsulante em água sob agitação magnética. Após definir melhor agente encapsulante, realizaram-se testes com aroma natural (fermentado e aroma concentrado/permeado) em emulsão com agente encapsulante conforme tabela 7.

Os agentes encapsulantes testados foram: dextrina (amido modificado “*snow flake 6131*” fornecido pela Corn Products,Brasil), maltodextrina Mor Rex 1920 (Corn Products,Brasil), e goma arábica em pó pura (Synth, Brasil). Na Tabela 7 constam as 7 formulações inicialmente propostas para obtenção do aroma em pó.(GOULA e

ADAMOPOULOS, 2010; YOSHII, SOOTTITANTAWAT, LIU, 2001; GHARSALLOUI, 2007).

Tabela 7: Formulações de compostos de aroma (acetato de etila) e aroma natural com diferentes agentes encapsulantes

Formulação	1	2	3	4	5	6	7
Agente	20%	20%	30%	15%	20 %	20%	15%
Encapsulante	dextrina	goma arábica	maltodextrina	maltodextrina e 15% dextrina	dextrina	dextrina	maltodextrina e 15% dextrina
Alimentação			15% acetato de etila		100 mL fermentado	35% permeado*	35% permeado*

*Aroma natural líquido concentrado após pervaporação

As amostras após secagem foram ressuspensas (0,1 g do pó seco foi ressuspensado em 5 mL de solução de NaCl a 1%) e analisadas em CG conforme metodologia descrita no ítem 4.3.5. O aroma natural produzido por fermentação submersa por *Pichia fermentans* e concentrado por pervaporação foi seco e microencapsulado após a escolha do melhor agente encapsulante. Os resultados foram analisados conforme cálculo da eficiência de encapsulação e características das microcápsulas (tamanho e formação de ranhuras).

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada (Equação 6) conforme a concentração de aroma ou acetato de etila presente nas microcápsulas em comparação com a concentração destes inicialmente utilizado para secagem (Rocha *et al.*,2012).

$$EE(\%) = \frac{C(\text{aroma pó})}{C(\text{alimentação})} \times 100 \quad (6)$$

Onde,

C =concentração do composto de aroma, em ppm

4.9 APLICAÇÃO DO AROMA NATURAL CONCENTRADO EM BEBIDAS

O aroma natural obtido por fermentação foi aplicado em refrigerante à base de açúcar e em coquetel (bebida mista com gás tipo “Ice”), ambas desenvolvidas pela empresa Duas Rodas Industrial Ltda. (Jaraguá do Sul, SC).

As amostras (1 e 2) de aroma foram obtidas por fermentação e concentradas por pervaporação.

A amostra 1 aroma com maior concentração de acetato de isoamila, (alíquota de permeados obtidos nas primeiras 6 horas de pervaporação, esta possuía maior concentração de ésteres, principalmente o acetato de isoamila.).

A amostra 2, aroma com menor concentração de acetato de isoamila (alíquota de permeados obtidos até o final do processo de 13 horas de pervaporação.)

Estas amostras foram enviadas a empresa Duas Rodas e mantidas congeladas até aplicação do produto nas bebidas.

4.9.1 Preparação da Amostra

As amostras foram aplicadas em refrigerante a base de açúcar (Fórmula de aplicação nº 17619/000) e coquetel / bebida mista com gás (Fórmula de aplicação nº 16264/001), ambos na dosagem 1,0 %.

Cerca de 25 mL de cada amostra, a temperatura de 25 ± 2 °C, foram servidas em copos plásticos de 50 mL e identificados com uma combinação de 3 números aleatórios.

4.9.2 Teste Perfil Sensorial

A análise sensorial foi realizada na empresa Duas Rodas Industrial Ltda, onde sete avaliadores treinados receberam as amostras e as caracterizaram nos aspectos aparência, odor e sabor. O perfil sensorial foi estabelecido por discussão e consenso do painel de avaliadores treinados em conjunto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA UTILIZADO NAS FERMENTAÇÕES

Os resultados obtidos para a composição do melaço de cana utilizado foram umidade de 23%, cinzas 4,87% e pH igual a 5,4 (Tabela 8). Comparados com resultados obtidos de Feltrin *et al.* (2000), a composição principalmente em relação ao teor de cinzas, é inferior ao obtido pelo autor (9,98%, conforme Tabela 1). Como este subproduto é obtido por centrifugação a partir da fabricação de açúcar proveniente da cana de regiões diferentes, variações na sua composição podem ocorrer.

Tabela 8: Composição físico química do melaço de cana

Componente	Teores
Umidade	23,02 % m/m
Cinzas	4,87 % m/m
pH	5,4
Açúcares Total	44
Açúcares Redutores	12
Sólidos Totais	70°Brix

Na análise elementar, o teor de nitrogênio foi de 1,9%, de carbono 31,23% e hidrogênio de 7,45% (Tabela 9). Verifica-se que o meio de cultivo contendo 50 g/L deste melaço a relação C:N foi de 16,4. Rijswijk *et al.* (2015) sugeriram que para as espécies de *Pichia* a formação de ésteres pode desempenhar um papel importante no modo de crescimento quando houver limitação de nitrogênio.

Tabela 9: Análise elementar do melaço de cana

Elemento	Teores (%)
Nitrogênio	1,9
Carbono	31,23
Hidrogênio	7,45
Enxofre	0

5.2 ESTUDOS DAS VARIÁVEIS QUE PODEM INFLUENCIAR NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

5.2.1 Planejamento Experimental 1

No primeiro planejamento, no qual foram estudadas as variáveis taxa de inóculo, agitação, temperatura e pH, observa-se que não houve variável estatisticamente significativa para a produção de acetato de isoamila por fermentação submersa por *Pichia fermentans* nos níveis testados. O Diagrama de Pareto apresentado na Figura 8 indica que apesar das variáveis não apresentarem significância na produção do componente de aroma, existe uma tendência para as variáveis. Pela análise, com o aumento temperatura e agitação, dentro da faixa estudada, há o favorecimento da produção de acetato de isoamila. Menor taxa de inoculo, favoreceria a produção de voláteis. Em relação ao pH inicial do meio, observou-se que valores acima de 5,8 a tendência seria de diminuir a produção de voláteis.

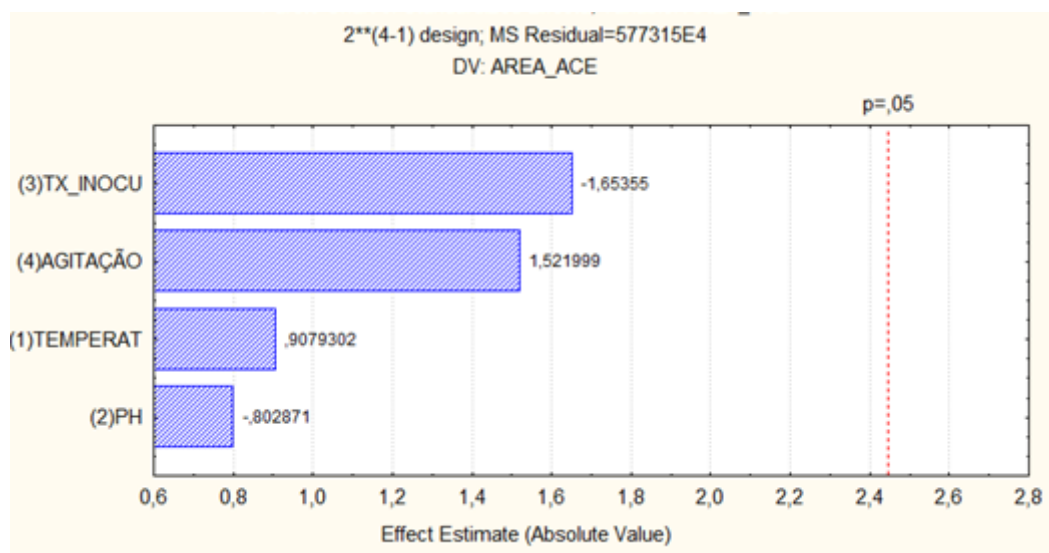


Figura 8: Diagrama de Pareto do primeiro planejamento experimental fatorial 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central

5.2.2 Planejamento Experimental 2

Conforme diagrama de Pareto (Figura 9) a única variável significativa foi a concentração de leucina em relação à produção de acetato de isoamila, porém há uma tendência de que menores concentrações do melão de cana favoreçam a produção de acetato de isoamila (figura 9, 10 e 11).

A L-leucina foi utilizada como fonte de N e funcionou como precursor de ésteres, pois conforme Pereira (2007), os aminoácidos de cadeia ramificada são importantes precursores na biossíntese de compostos aromáticos.

Durante a utilização destes aminoácidos, a reação inicial que se processa é conhecida como degradação enzimática de Strecker, no qual ocorrem transaminações e descarboxilações semelhantes àquelas que ocorrem durante o escurecimento não enzimático.

Os compostos de aroma importantes em alimentos são 2-metilpropanol e 3-metilbutanol (álcoois primários e secundários) derivados da redução de aldeídos provenientes dos aminoácidos valina e leucina pela degradação de Strecker. Diversos microrganismos, dentre estes as leveduras podem modificar a maioria dos aminoácidos de maneira similar.

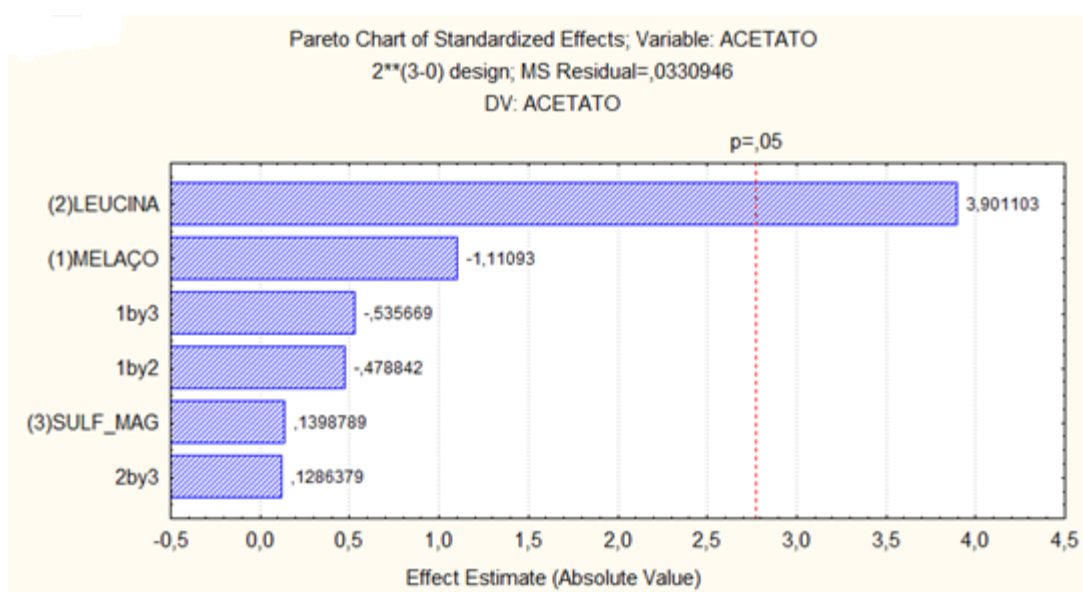


Figura 9: Diagrama de Pareto para o segundo planejamento experimental fatorial completo 2³ com 3 repetições no ponto central

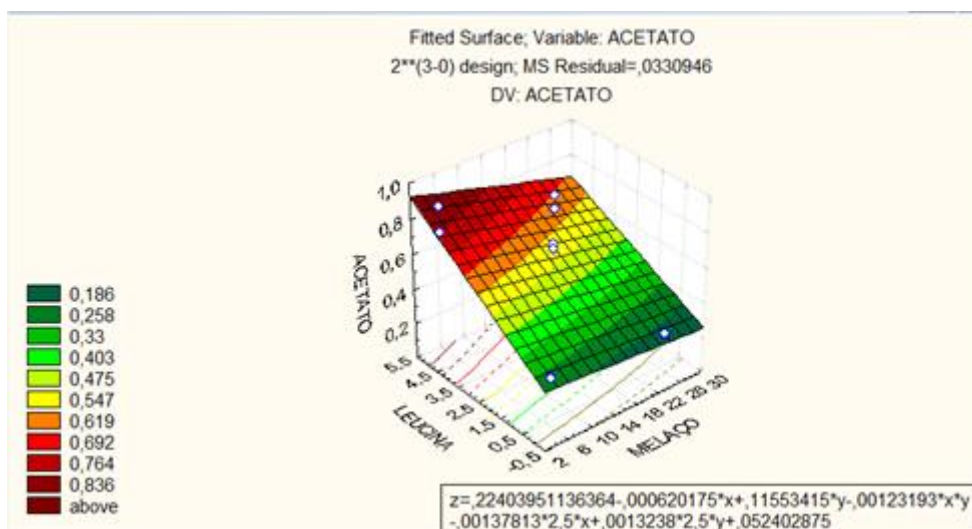


Figura 10: Superfície de resposta – Influência da leucina e melação de cana na produção de acetato de isoamila

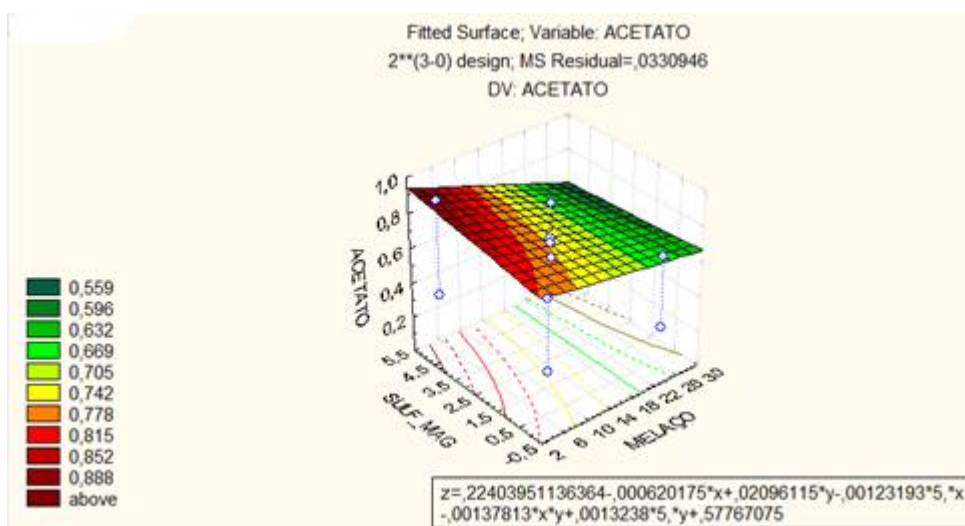


Figura 11: Superfície de resposta – Influência do sulfato de magnésio e do melação de cana na produção de acetato de isoamila.

5.3 EFEITO DA LEUCINA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA POR FERMENTAÇÃO EM FRASCOS

A L-leucina foi adicionada ao meio de cultivo como possível fonte de N para crescimento do microrganismo e também como provável precursor para produção dos compostos de aroma.

Conforme Garde-Cerdá e Ancín-Azpilicueta (2008) meios de cultivo pobres em nitrogênio e amônio podem influenciar negativamente a formação de aromas durante a fermentação do vinho, muitas vinícolas costumam adicionar fontes de aminoácidos sintéticos para melhorar o buquê ou aroma da bebida.

Segundo estudos de Sanna *et al.* (2012), a cepa *Pichia fermentans* 726 produz um subproduto, álcool isoamílico, através da assimilação da leucina, pelas vias de Ehrlich. Este é um precursor importante para formação de acetato de isoamila, principal componente do aroma natural produzido neste estudo.

As fermentações realizadas em triplicata foram analisadas por HS-SPME em CG conforme metodologia.

Foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 10, Figura 12): 11,08 ppm de acetato de isoamila nos experimentos: (1) sem adição de leucina; 19,21 ppm, (2) com adição de 1g/L de leucina e 22,21 ppm de acetato de isoamila, (3) com adição de 5g/L de leucina. Estes resultados foram obtidos em 12 horas de fermentação com *P. fermentans*. A amostra com 5g/L de leucina apresentou maior produção de acetato de isoamila, cerca de 50% a mais que a amostra sem adição de leucina. Com 1g/L de leucina o aumento na produção foi de 42% em 12 horas de fermentação.

Tabela 10: Produção de acetato de isoamila durante as fermentações submersas em erlenmeyers

Experimentos	Leucina (g/L)	Acetato de Isoamila (ppm)
1	0	11,08 ± 3,4
2	1	19,21± 0,6
3	5	22,21± 0,1

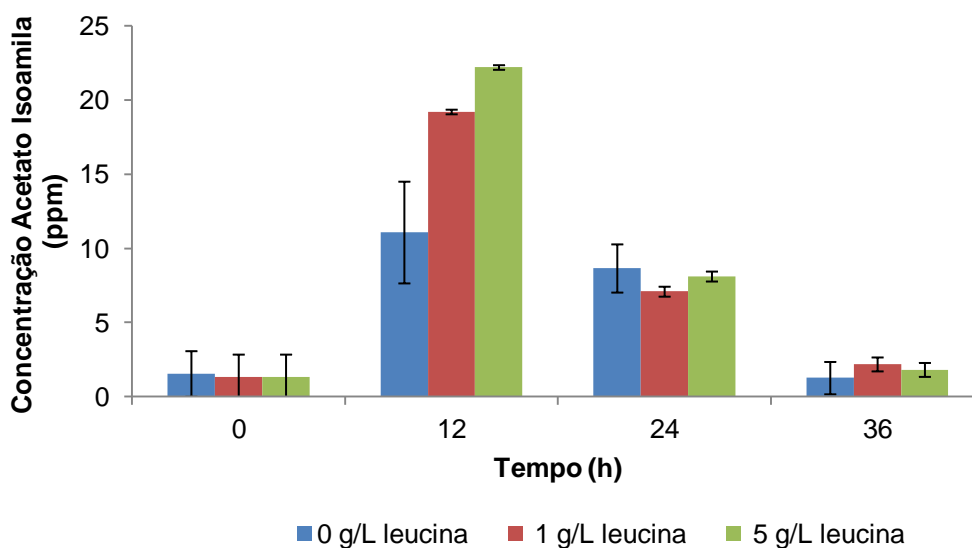


Figura 12: Influência da adição de leucina na produção de acetato de isoamila por *P.fermentans* cultivado em meio à base de melaço de cana em frascos

Os resultados do teste Anova (tabela 11) mostraram diferença significativa entre os grupos ($P=0,0013$), sendo considerado significativo para $P<0,05$. Foi realizado o pós-teste de Tukey (*GraphPad Prism 5*) para verificar a diferença significativa entre as amostras fermentadas contendo leucina e sem adição de leucina.

As amostras contendo 1g/L de leucina e 5g/L de leucina não apresentaram diferença significativa entre si para produção de acetato de isoamila no tempo 12h de fermentação (Tabela 11). Para as fermentações seguintes em biorreator, optou-se pela adição de leucina ao meio de cultivo, porém ainda foram testadas as concentrações de 1 e 5g/L com objetivo de definir melhores condições em maior escala de produção de acetato de isoamila.

Tabela 11: Tabela Anova “one way” com pós teste de Tukey gerada por GraphPad

Análise de Variância				
Valor de P	0,0013			
Diferença entre as médias estatisticamente significativa para (P < 0,05)	Sim			
Número de grupos	3			
F	24,57			
R quadrado	0,8912			
Tabela ANOVA	SS	df	MS	
Tratamento (entre as colunas)	250500000	2	125300000	
Residual (nas colunas)	305900000	6	50990000	
Total	281100000	8		
Teste Tukey's por múltiplas comparações	Significado	q	Significância	95% CI de dif.
	Dif.		P < 0.05	
sem leucina vs 1g/L leucina	-9122	6,997	Sim	-14780 to -3465
sem leucina vs 5g/L leucina	-12490	9,580	Sim	-18150 to -6832
1g/L leucina vs 5g/L leucina	-3367	2,583	Não	-9024 to 2289

5.4 INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E ADIÇÃO DE LEUCINA EM BIORREATOR DE BANCADA

Considerando os resultados obtidos nos experimentos em frascos, realizaram-se fermentações em biorreator de 2L com o objetivo de aumentar a escala de produção e estudar a influência da concentração de leucina e da aeração em biorreator.

Os experimentos foram realizados com 1,5 L de meio em biorreator de 2L contendo 1g/L de leucina, 5g/L de sulfato de magnésio e 50 g/L de melaço de cana. O biorreator operou com aeração de 0,5 vvm durante as primeiras 6 horas, pH inicial 5, temperatura de 30°C, 120 rpm, e inóculo de 10^7 cel/mL de meio de cultivo. Nestas condições obteve-se máxima produção de acetato de isoamila em 6 horas de fermentação (13,15 ppm). O teor de açúcares totais que era inicialmente de 18,9 g/L baixou para 14,51 g/L em 6 horas e ao final de 28 horas diminuiu para 9,44 g/L, já o teor de açúcares redutores diminuiu de 6,3 g/L inicial a 0,19 g/L em 12 horas de fermentação e, 0,12 g/L em 28 horas de fermentação.

Os resultados obtidos pelo perfil de voláteis totais e de acetato de isoamila foram: maior produção de acetato de isoamila (13,15 ppm) e voláteis totais (15,54 ppm) em 6 horas de fermentação submersa por *P. fermentans* sendo 84,62% do total de voláteis produzidos de acetato de isoamila (Figura 13).

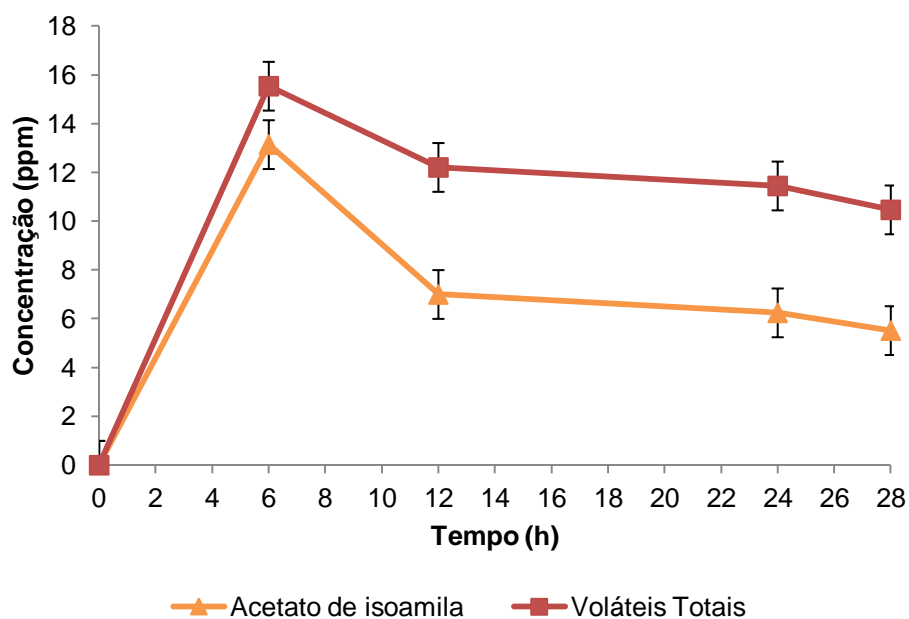


Figura 13: Perfil da produção de voláteis totais e acetato de isoamila durante a fermentação por *P. fermentans*

O crescimento máximo observado da biomassa (Figura 13) foi em 12 horas de fermentação (0,82 g/L a 0,77 g/L), em 12 e 24 horas, respectivamente em seguida baixou para 0,58 g/L em 28 horas.

O pH manteve-se em torno de 5,0 durante as 28 horas de fermentação submersa (Figuras 14 e 15).

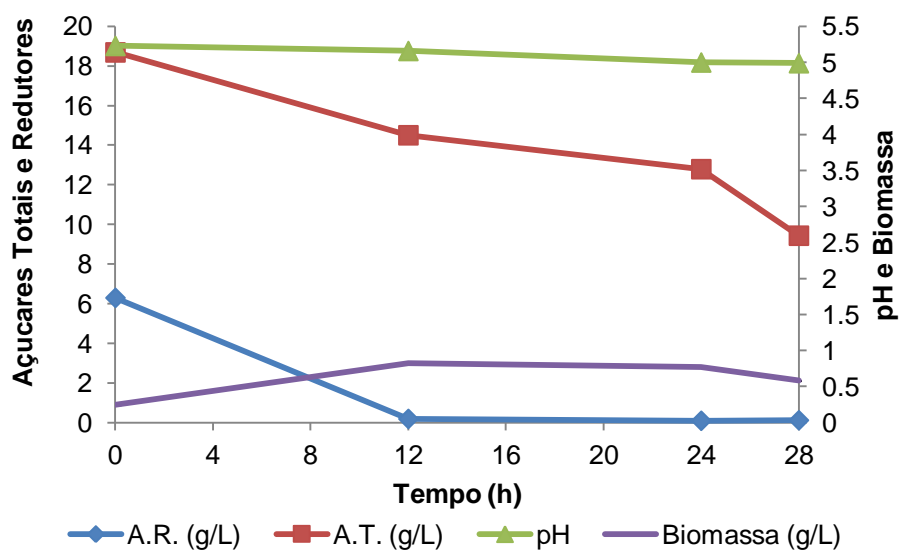


Figura 14: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa por *Pichia fermentans*

No segundo experimento, o cultivo foi realizado com meio contendo 1g/L de leucina, 5g/L de sulfato de magnésio e 5g/L de melaço de cana, mas agora com 12 horas de aeração a 0,5 vvm. As demais condições permaneceram e as mesmas foram mantidas (30°C, 120 rpm, 1,5 L de meio, inóculo de 10^7 cel/mL). Os resultados foram de 12,65 ppm de acetato de isoamila em 6 horas de fermentação, e o teor de açúcares totais foi de 22,7 a 21,0 g/L em 6 horas e ao final de 28 horas de 18,2 g/L. Já o teor de açúcares redutores foi de 6,3g/L a 0,15 g/L em 12 horas de fermentação.

O crescimento da biomassa foi máximo em 12 horas (1,2 g/L) de fermentação e se manteve constante ao redor de 1,0 g/L em 28 horas. O pH não sofreu variações e manteve-se em torno de 5, durante as 28 horas de fermentação submersa (Figuras 15 e 16).

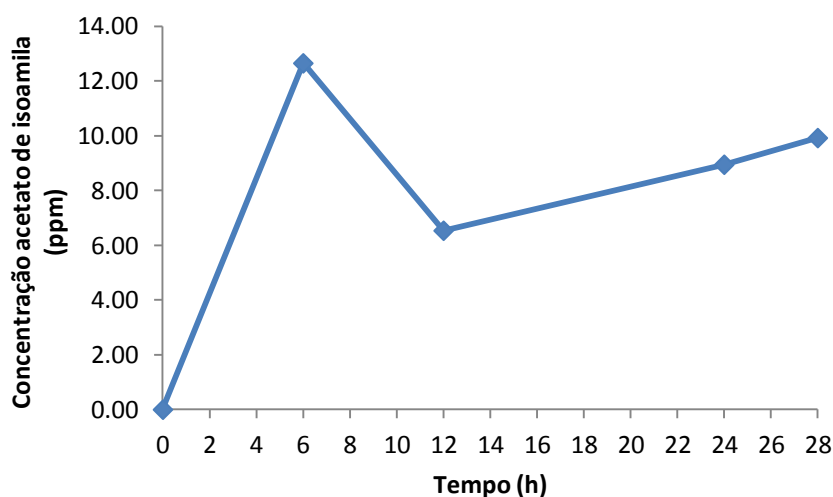


Figura 15: Perfil da produção de acetato de isoamila durante a fermentação submersa por *Pichia fermentans*

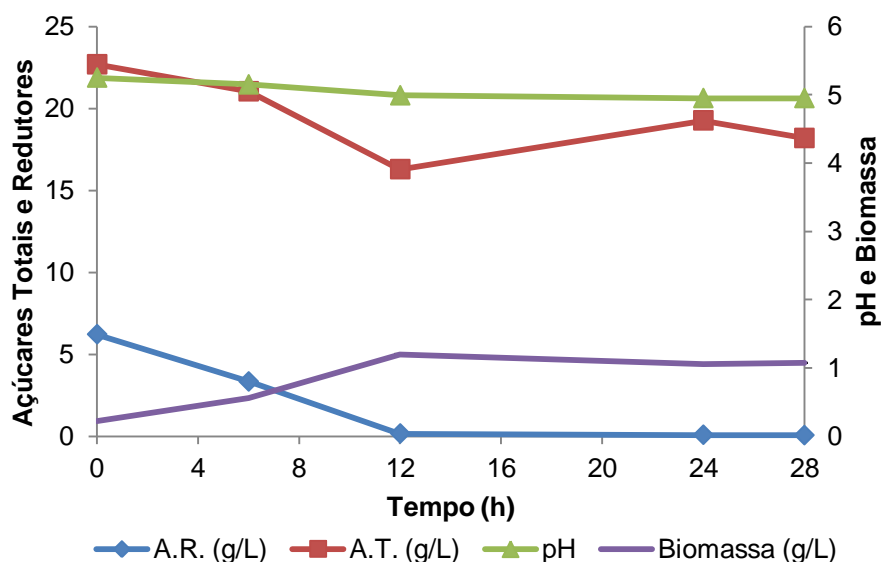


Figura 16: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa(2) por *Pichia fermentans*

No terceiro experimento, as condições do cultivo foram em meio contendo 5g/L de leucina, 5g/L de sulfato de magnésio e 50g/L de melação de cana. A aeração foi mantida durante 12 horas (0,5 vvm), assim como as demais condições de temperatura, agitação e taxa de inoculo. Os resultados encontrados foram 11,26 ppm de acetato de isoamila em 6 horas de fermentação, com teor de açúcares totais de 24,8 a 22,1 g/L em 6 horas e ao final de 28 horas de 16,6 g/L, já o teor de açúcares redutores foi de 6,1 a 0,76 g/L em 12 horas de fermentação. O crescimento máximo observado da biomassa foi 1,07 g/L em 28 horas de fermentação. O pH inicial e final foi 5,2 e 4,95, respectivamente (Figuras 17 e 18).

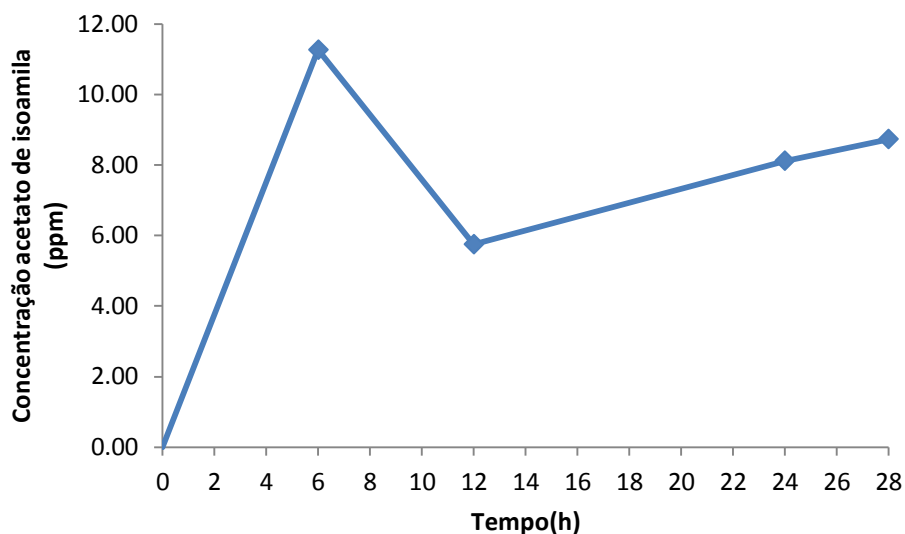


Figura 17: Perfil da produção de acetato de isoamila durante a fermentação submersa por *Pichia fermentans*

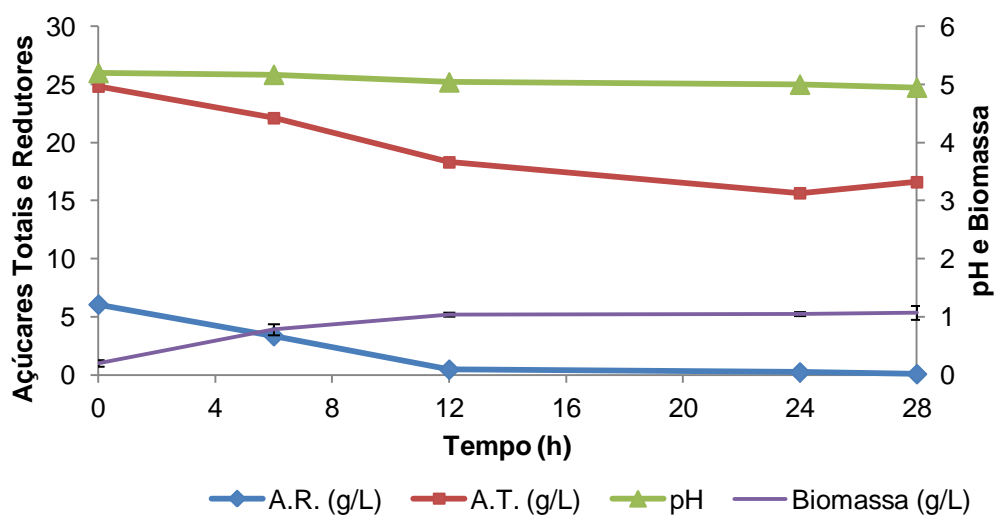


Figura 18: Teor de açúcares totais (A.T.) e redutores (A.R.), produção de biomassa e pH, durante 28 horas de fermentação submersa (3) por *Pichia fermentans*

Todas as fermentações para este estudo de aeração e efeito da leucina em biorreator apresentaram produção máxima de acetato de isoamila em tempo de 6 horas de fermentação (Figura 19). O pH foi praticamente constante em 5,0 durante toda a fermentação. O teor de açúcares redutores inicial foi aproximadamente de 6,0 g/L e diminuiu para 1,38 g/L em 12 horas de fermentação.

Conforme análise de Anova com pós-teste de Tukey, não houve diferença significativa entre os experimentos 1 e 2, no qual a diferença nas fermentações era o tempo de aeração de 6 e 12 horas (Tabelas 13 e 13.1).

O tempo de aeração não influenciou a produção de acetato de isoamila por *P. fermentans* em biorreator (Tabela 12 e Figura 19).

Houve diferença significativa entre os experimentos 1 e 3, 2 e 3, ou seja, a adição de leucina influenciou a produção de acetato de isoamila durante a fermentação, conforme resultados obtidos na fermentação em erlenmeyers (Tabelas 13 e 13.1).

Porém, em biorreator a menor concentração de leucina (1g/L) no meio indicou uma condição com maior produção de acetato de isoamila. Essa foi a concentração escolhida para produção de aroma de banana por fermentação submersa em biorreator.

Tabela 12: Produção de acetato de isoamila por FS_m em biorreator com adição de leucina e aeração forçada

FS _m	Leucina (g/L)	Tempo de Aeração (h)	Acetato de Isoamila (ppm)
1	1	6	13,5
2	1	12	12,65
3	5	12	11,26

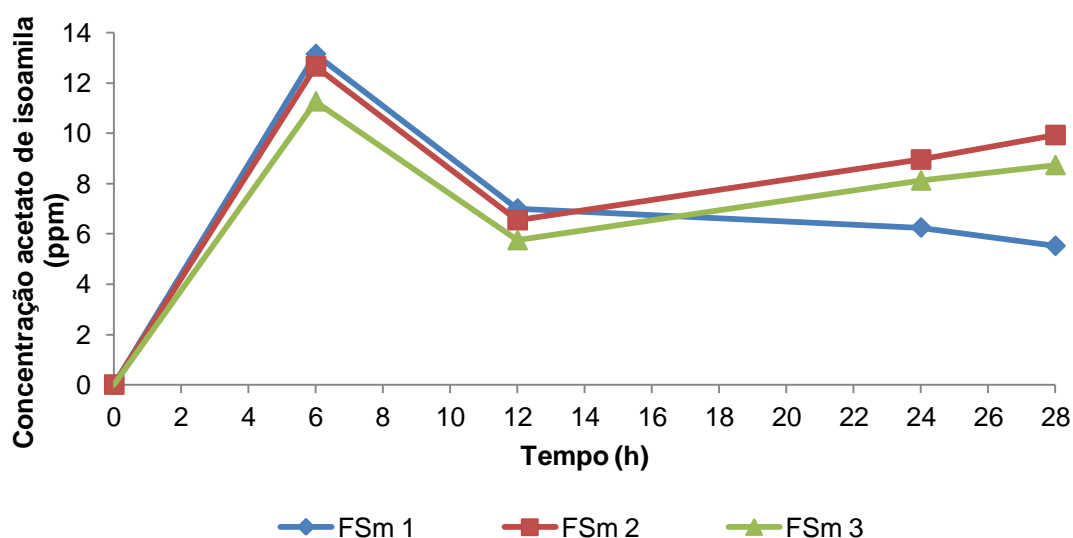


Figura 19: Comparação do perfil da produção de acetato de isoamila durante as fermentações variando aeração e concentração de leucina

Tabela 13: Tabela Anova “one way” com pós- teste de “Tukey” gerada por “Graph Pad Prism”

ANOVA					
F					19,49
Valor P					0,0024
Diferença entre as médias estatisticamente significativa para (P < 0,05)					Sim
R quadrado					0,8666
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Tratamento (entre colunas)	52,07	2	26,03	F (2, 6) = 19,49	P = 0,0024
Residual (nas colunas)	8,014	6	1,336		
Total	60,08	8			

Tabela 13.1 Tabela Anova “one way” com pós- teste de Tukey

Teste Tukey por múltiplas comparações	Diferença		
	significativa	95% CI de dif,	Significativo
F _{Sm} 1 vs. F _{Sm} 2	-2,034	-4,930 p/ 0,8609	Não
F _{Sm} 1 vs. F _{Sm} 3	3,771	0,8761 p/ 6,667	Sim
F _{Sm} 2 vs. F _{Sm} 3	5,806	2,910 p/ 8,701	Sim

5.5 Experimentos em batelada alimentada

A fermentação em batelada alimentada foi realizada com o objetivo de manter a produção máxima de acetato de isoamila durante um período mais longo durante a fermentação. A alimentação de meio contendo (melaço de cana 50g/L, leucina 1g/L e sulfato de magnésio 5g/L) foi realizada de 6 em 6 horas como indicam as flechas do gráfico demonstrado na Figura 20. Adicionaram-se 750 mL de meio a cada 6 horas até completar 3 litros de fermentado. O fermentado foi microfiltrado em sistema Pellicon conforme já descrito (item 4.6.2), para retirada das células e logo em seguida, concentrado por pervaporação. Conforme Figura 20 esta fermentação seguiu os padrões das fermentações anteriores em relação à produção de acetato de isoamila (12,33 ppm) em 6 horas de fermentação. A estratégia de alimentação não atendeu às expectativas de que o aroma se mantivesse em parâmetros máximos por mais tempo mesmo com a suplementação do meio de cultura.

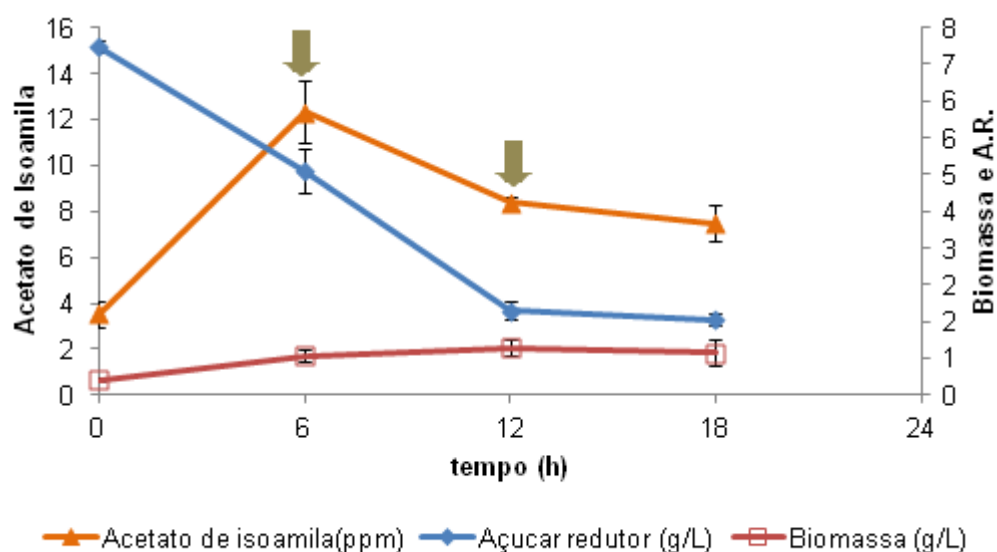


Figura 20: Teor de açúcares redutores, concentração de biomassa e produção de acetato de isoamila durante fermentação submersa em batelada alimentada

5.5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO POR SPME

As temperaturas testadas de exposição da fibra SPME ao “*headspace*” da solução padrão de acetato de isoamila foram: 30, 40 e 55°C. Conforme o teste Anova com pós-teste de “*Tukey Graphpad Prism*” (Tabela 14, 14.1 e 14.2), os resultados obtidos da concentração de acetato de isoamila, não apresentaram diferença significativa entre si. Optou-se pela utilização de 30°C, pois esta é a temperatura utilizada durante a fermentação submersa.

Tabela 14: Tabela Anova “one way” com pós teste de “*Tukey*” gerada por “*GraphPad Prism*”

Resumo ANOVA	
F	0,005111
Valor P	0,001701
Resumo valor P	ns
Diferença entre as médias estatisticamente significativa para (P < 0,05)	Não
R quadrado	0,9949

Tabela 14.1: Tabela Anova gerada por “*Graph Pad Prism*”

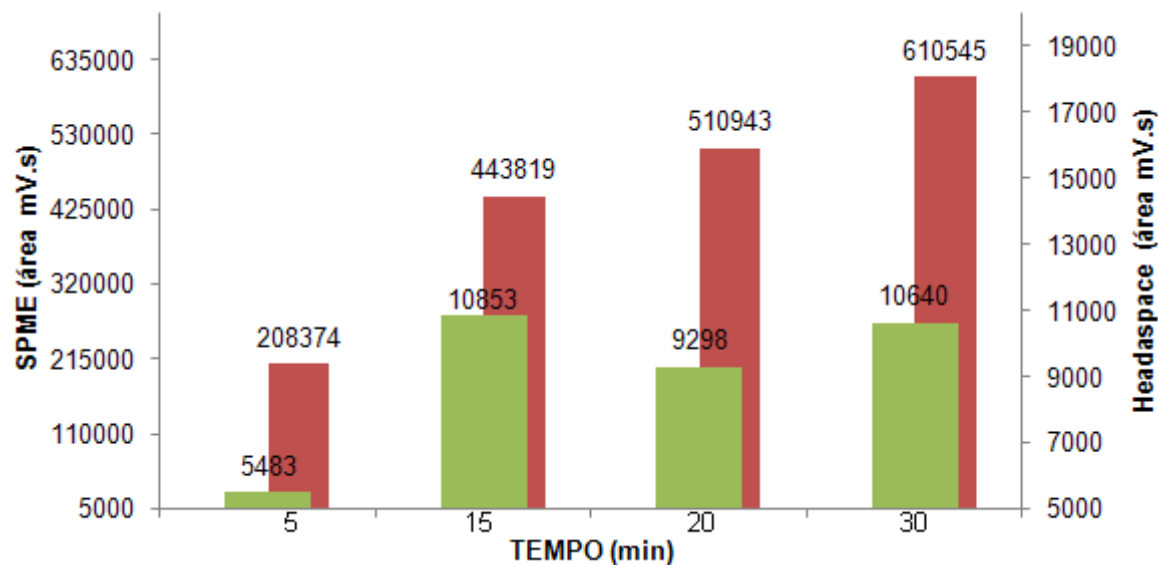
Tabela ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor de P
Tratamento (entre colunas)	4336000	2	2168000	F (2, 6) = 0,005111	P = 0,9949
Residual (nas colunas)	2545000000	6	4,24E+08		
Total	2549000000	8			

Tabela 14.2: Comparação múltipla por método de Tukey

Teste de Tukey de comparações múltiplas	Diferença		
	Significativa	95% IC da dif,	Significativo
30°C vs. 40°C	-873,7	-52471 p/ 50724	Não
30°C vs. 55°C	826,3	-50771 p/ 52424	Não
40°C vs. 55°C	1700	-49897 p/ 53297	Não

A temperatura para microextração em fase sólida (SPME) foi definida em 30 °C e em seguida foram testados os tempos de exposição da fibra (5,15,20 e 30 minutos) ao “*headspace*” da solução padrão de acetato de isoamila . O melhor tempo de exposição foi de 30 minutos a 30 °C. A SPME é extremamente eficiente qualitativamente e quantitativamente em relação ao “*headspace*” (Carvalho *et al*, 2014). Quantitativamente a sensibilidade na detecção de acetato de isoamila foi aproximadamente 60 vezes maior que na extração direta do “*headspace*” (Figura 21), ou seja, a área do pico foi maior na extração por HS-SPME que as obtidas na extração direta do “*headspace*”, considerando que a área obtida é diretamente proporcional à concentração do componente presente no “*headspace*”.

O tempo de saturação da fibra foi determinado construindo uma curva (Figura 22) variando-se o tempo de exposição com temperatura e concentração constantes. A partir de 30 minutos de exposição observou-se que não houve alteração significativa na área do pico produzido no CG que deveria ser diretamente proporcional a concentração de acetato de isoamila (em 30 min a área foi de 610.545mV e em 40 min, 615.947mV). Com este tempo de exposição, considera-se que a fibra estava saturada, ou seja, atingiu a máxima capacidade de adsorver os compostos voláteis presentes no “*headspace*” da amostra padrão.



■ HS-SPME ■ "Headspace"

Figura 21: Comparação da microextração de acetato de isoamila por HS-SPME/CG em diferentes tempos de exposição da fibra ao componente de aroma nas mesmas condições de concentração e temperatura com análise por HS/CG

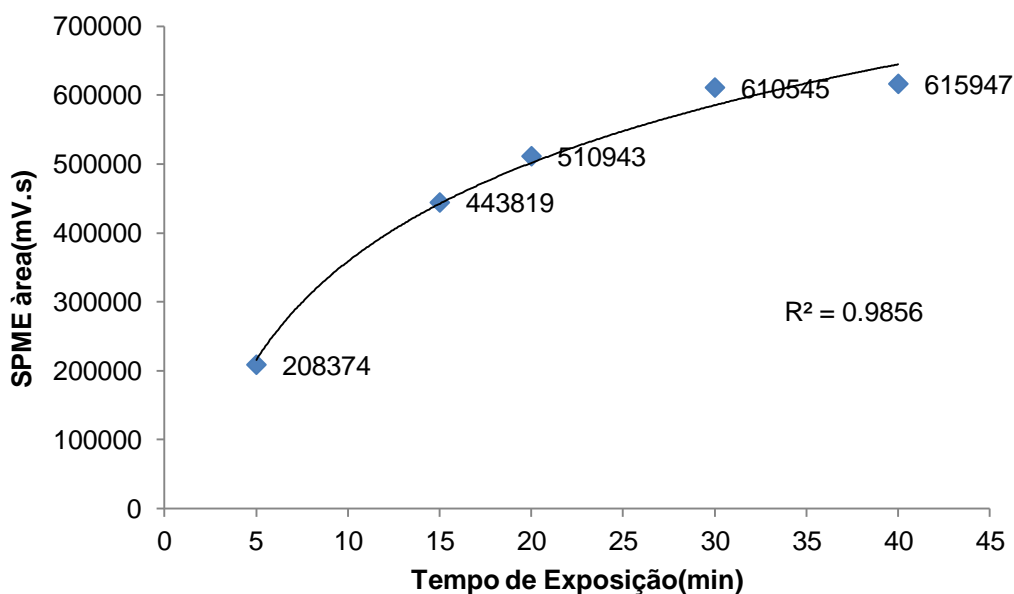


Figura 22: Curva de saturação da fibra SPME em relação ao tempo de exposição da mesma ao "headspace"

Os resultados de todas as análises realizadas por HS-SPME/CG foram reportados a partir da curva construída para o acetato de isoamila, a exposição da fibra foi a 30°C durante 30 minutos em frasco "vial" de 20 mL.

Plotando a concentração em ppm pela área do pico obtido no cromatograma, foi possível obter a equação da curva, no qual y é a área encontrada e x a

concentração em ppm As amostras muito concentradas foram diluídas para que a área não ultrapasse 1.000.000, devido a relação área x concentração para HS/SPME não ser linear (Figura 23).

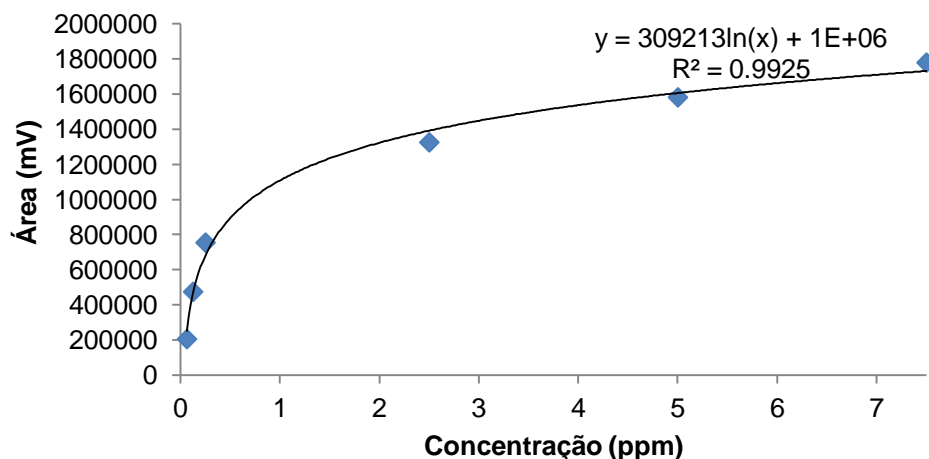


Figura 23: Curva padrão de acetato de isoamila conforme análise realizada por HS-SPME/CG

5.6 ANÁLISE DO FERMENTADO EM CROMATÓGRAFO DE ÍONS

O melaço de cana, principal, componente do meio de cultivo para fermentação submersa, é rico em açúcares não redutores (sacarose) e redutores (glicose) conforme Feltrin *et al.* (2000), este subproduto também contém macro e micronutrientes como potássio, nitrogênio e fósforo (Tabela 1). Através da análise por cromatografia de íons, o íon potássio foi detectado em maior concentração em relação aos demais íons presentes (Figura 24), o que já era esperado devido a composição do próprio melaço de cana. O magnésio foi adicionado ao meio como possível protetor celular. Sua concentração foi determinada ao longo da fermentação para verificar uma possível utilização do mesmo pelas células. O íon amônio e o sódio foram detectados, sendo estes componentes do melaço.

Os resultados obtidos mostraram que os teores de potássio e magnésio diminuíram nas primeiras 12 horas, sendo que houve uma queda brusca nos valores de potássio presente no meio de fermentação nas primeiras 2 horas com valores de 1324 mg/L para 727 mg/L e o magnésio diminuiu de 1010 mg/L para 630 mg/L nas primeiras 12 horas de fermentação. A concentração de amônio inicial foi de 20 para

13 mg/L em 2 horas e a partir de 12 horas o amônio presente no melaço foi diminuiu a zero (0) (Figura 24).

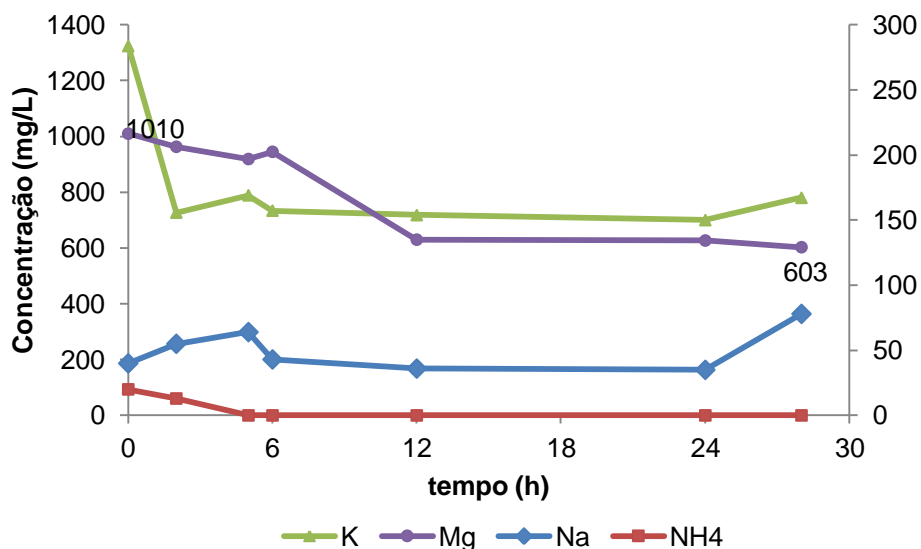


Figura 24: Perfil de Íons analisados em cromatógrafo de íons durante 28 horas de fermentação submersa por *Pichia fermentans*

Conforme Silva *et al.* (2012) o sulfato de magnésio adicionado ao meio parece proteger as células da levedura durante a fermentação, este mecanismo ocorre pela diminuição da permeabilidade da membrana plasmática quando ocorre aumento da concentração de álcool no meio. Estes autores testaram a suplementação do meio de cultivo com uréia, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e extrato de levedura, e a conclusão do trabalho foi que a adição de sulfato de magnésio e uréia foram importantes para melhorar o desempenho da levedura *Pichia stipitis* durante a fermentação. Na presente pesquisa o sulfato de magnésio adicionado ao meio de cultivo também foi importante para a proteção das células pois durante a fermentação o etanol é produzido, junto com os outros compostos de aroma, este é tóxico para as células, mesmo assim não houve queda significativa de biomassa durante o cultivo.

5.7 RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO AROMA NATURAL POR PERVAPORAÇÃO

5.7.1 Estudos da Influência da Temperatura de Alimentação

O tanque do módulo de pervaporação foi carregado com 3L do fermentado previamente centrifugado conforme item 4.6.1 para retirada das células. Realizaram-se testes para determinar a influência da temperatura no fluxo do permeado (J) e no fator de enriquecimento (β) com objetivo de determinar comportamento da membrana perante a solução de alimentação.

As condições de pervaporação foram fixadas conforme Raisi, Aroujaliana, Kaghazchi, 2008, segundo estes autores a temperatura de alimentação é muito importante na pervaporação devido à influência na solubilidade e difusão dos componentes na membrana. A primeira temperatura da alimentação testada foi 30°C, a pressão de vácuo foi mantida constante em vácuo absoluto, vazão constante de 118 L/h e concentração da mistura constante na alimentação. Para testes de temperatura de alimentação de 45 e 60°C as mesmas condições de operação foram mantidas.

Os seguintes resultados para o fluxo e fator de enriquecimento (β) foram observados: maior fluxo total (J_t) e fluxo individual dos componentes (J_i) foi sob temperatura de 60°C (Figura 25). O que está de acordo com os resultados obtidos por Raisi *et al.* (2008). Maior fluxo total e individual de voláteis foi a temperatura de 60°C, devido a taxa de difusão dos componentes individuais que estão permeando aumentarem em altas temperaturas levando a fluxos elevados de permeação.

Outra razão para o aumento do fluxo com aumento da temperatura de alimentação é a difusividade, a viscosidade e a permeabilidade dos compostos de aroma. Além disso, como a pressão de vapor de equilíbrio das moléculas que estão permeando varia com a temperatura, a força motriz do processo é influenciada pela temperatura de alimentação. Qualquer aumento na pressão de vapor do componente puro afeta o equilíbrio líquido-vapor, devido à elevação da temperatura da alimentação, resultando em um elevado fluxo de permeação.

Assim, a temperatura de alimentação afeta as características de permeação através da membrana e a força motriz do processo (Figura 25).

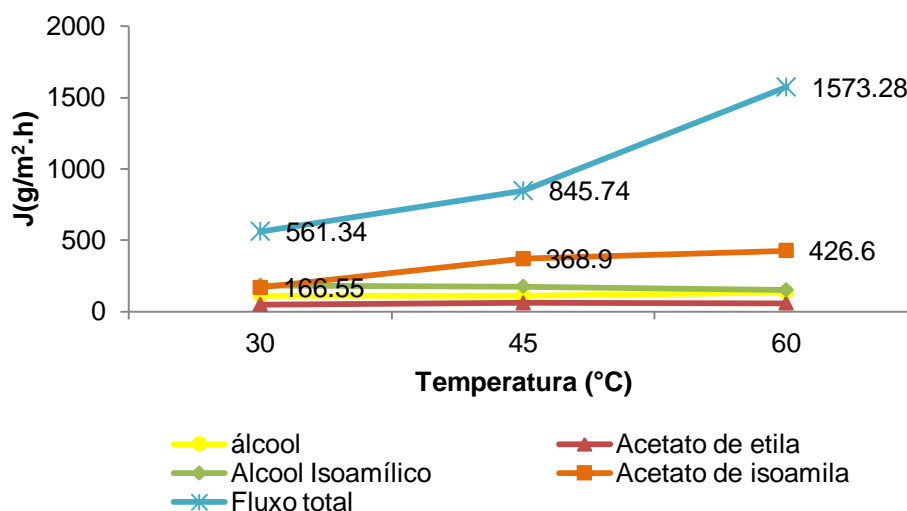


Figura 25: Fluxo total e fluxo individual dos componentes, produzidos durante fermentação por *P. fermentans*, durante processo de pervaporação

O fluxo do acetato de isoamila foi 1,15 vezes maior a 60°C comparado a temperatura de 45°C. Considerando o fator de enriquecimento (β) para o acetato de isoamila, um dos componentes mais importantes no aroma global de banana.

A temperatura de alimentação escolhida para este processo de pervaporação foi 45°C (Figura 26). De acordo com Weschenfelder *et al.* (2015) o efeito da temperatura na seletividade depende da mudança na sorção dos compostos orgânicos, da sua difusão através da membrana bem como da afinidade química com o polímero da membrana. Conforme Isci *et al.* (2006), a seletividade da membrana em conjunto com o fluxo determinam o desempenho do processo de pervaporação. Segundo, Trifunovic *et al.* (2006), os componentes de aroma menos voláteis, são mais sensíveis a variação de pressão e tem menor força para permear pela membrana quando comparados aos compostos mais voláteis.

No presente trabalho, entre os componentes mais voláteis estavam o acetato de etila, álcool etílico, acetato de propila, álcool isoamílico e acetato de isoamila (Tabela 15) com fator de enriquecimento (β) de 0,74, 1,44 e 0,74 para acetato de isoamila nas temperaturas de alimentação de 30,45 e 60 °C, respectivamente (Figura 26).

Tabela 15: Ponto de ebulição dos compostos voláteis

Componente	Ponto de ebulição a 760 mmHg (°C)
Acetato de etila	77
Álcool etílico	78,65
Acetato de propila	102
Álcool Isoamílico	132
Acetato de isoamila	142

Fonte: <http://webbook.nist.gov/chemistry>

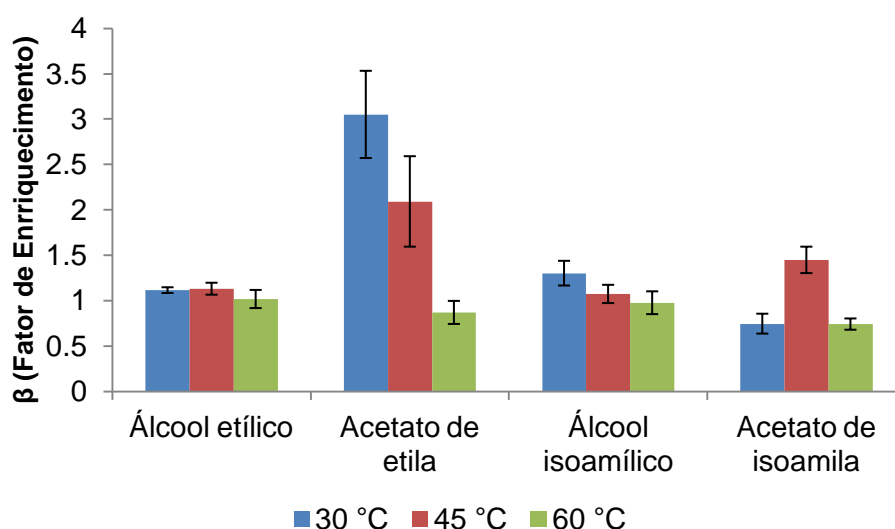


Figura 26: Efeito da temperatura sobre o fator de enriquecimento da membrana de separação dos componentes de aroma

A temperatura de 45 °C foi a mais adequada para alimentação do pervaporador.

No segundo experimento de pervaporação a solução de alimentação do tanque do módulo de pervaporação foi previamente microfiltrado conforme item 4.6.2 para retirada das células do fermentado bruto, pois segundo Martinez *et al.*(2013), compostos não voláteis presentes na alimentação podem interferir negativamente na pervaporação.

Neste experimento as condições de alimentação foram 45°C, alto vácuo, vazão de alimentação de 118 L/h.

Durante 6 horas de pervaporação o fluxo total médio foi de 960,86g/m².h (Figura 27), 1,14 vezes maior que o fluxo total obtido anteriormente (Figura 25). Porém, a concentração do acetato no permeado foi baixa devido a concentração na

alimentação, 2,97 ppm, enquanto no ensaio anterior, estava em 7,49 ppm. Isto ocorreu, provavelmente devido ao processo de microfiltração em membranas planas (sistema Pellicon) a que foi submetido o fermentado para retirada das células. Sendo um processo não refrigerado pode ter causado perda dos compostos voláteis de aroma.

O tempo de operação da membrana também parece ter interferido negativamente no processo, pois o fator de enriquecimento (β) igual a 1,29 foi 1,72 vezes menor quando comparados com o β da pervaporação anterior (2,22), ambos a mesma temperatura (Figura 27). Sendo o fator de enriquecimento um dos indicativos da afinidade da membrana para o acetato de isoamila, o tempo de operação da membrana pode ter prejudicado a permeação dos compostos de aroma.

Neste estudo a concentração na alimentação do composto de interesse pode ter interferido na permeação do produto, bem como o tempo de uso da membrana. Provavelmente a microfiltração foi uma etapa de “*downstream*” desnecessária, pois houve perdas de massa por volatilização de compostos de interesse na alimentação do pervaporador.

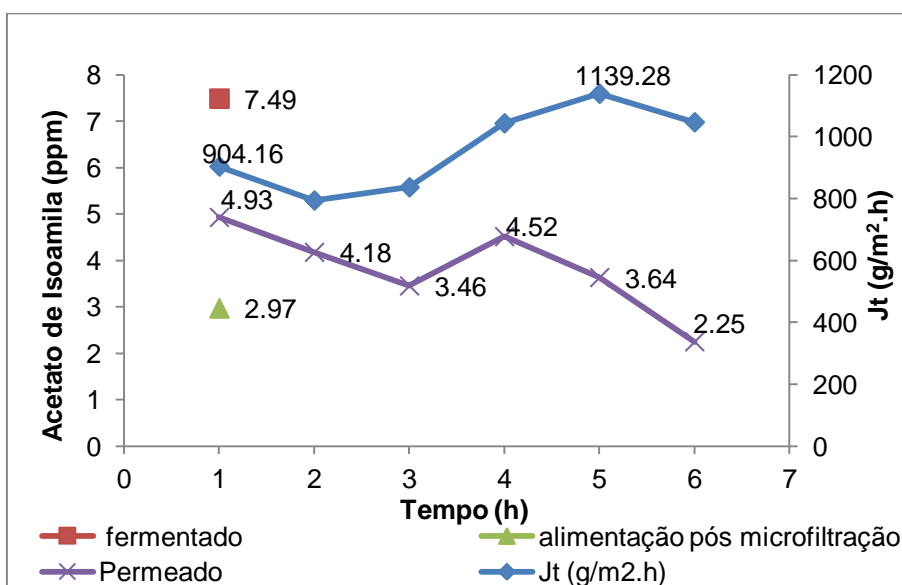


Figura 27: Influência da microfiltração na concentração de acetato de isoamila e fluxo total durante pervaporação,

No terceiro e último experimento de pervaporação, a membrana foi substituída com o objetivo de obter aroma com maior concentração de acetato de isoamila, e verificar a quantidade de ciclos de pervaporação que poderiam ser

realizados com a mesma membrana nas condições pré-determinadas. Nesta etapa o fermentado bruto não passou por tratamento prévio para retirada de células. Foram realizados 13 ciclos de pervaporação com duração de aproximadamente 1 hora cada 1.

A Figura 28 mostra que em 13 horas de pervaporação o fluxo total médio foi $943,54 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$ valores similares aos obtidos nas pervaporações anteriores ($845,44$ e $960,86 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$) houve queda do fluxo total nas primeiras 3 horas através da membrana de $1257,18 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$ para $886,32 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$, o que significa uma queda de 38%. Após este período, a membrana atingiu equilíbrio e o fluxo total se manteve aproximadamente constante.

O fluxo total observado nos três experimentos de pervaporação foi praticamente constante, indicando que o tempo de uso da membrana nas condições testadas não prejudica o fluxo total, porém diminui o fluxo parcial do componente acetato de isoamila (Figura 25, 27 e 28).

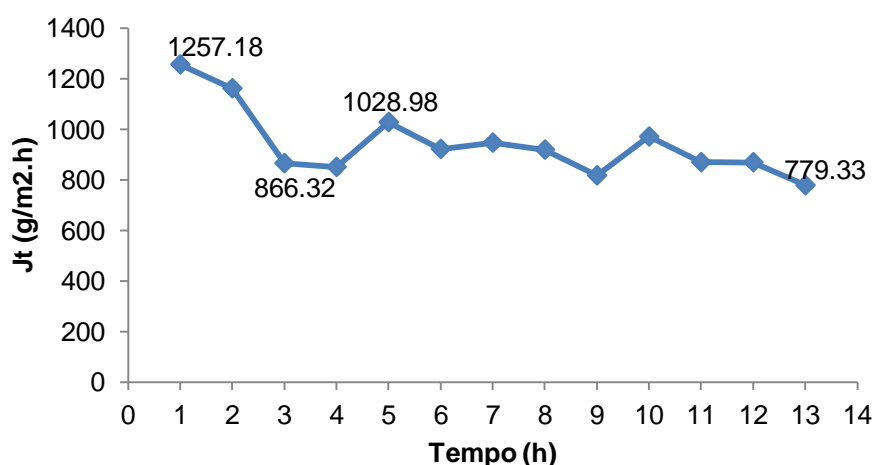


Figura 28: Fluxo total através da membrana durante 13 horas de pervaporação

A concentração de acetato de isoamila obtida no aroma natural pervaporado foi de $61,82 \text{ ppm}$ durante a primeira hora de recuperação. Nas primeiras 6 horas de processo (Figura 29) recuperou-se uma média de $40,29 \text{ ppm}$ no permeado com β de $4,40$ para acetato de isoamila a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Nas 6 horas seguintes a concentração média de acetato de isoamila no permeado foi $16,10$ e o β de $1,82$, ou seja, o fator de enriquecimento foi $2,41$ vezes maior no início do processo.

Observou-se que a concentração de acetato de isoamila na alimentação diminuiu somente nas últimas 3 horas de pervaporação, esta foi praticamente

constante, bem como o fluxo total na membrana. Portanto, pode ser afirmado que o processo aconteceu em regime permanente.

Estes estudos demonstraram que a membrana Pervap 4060 (Sulzer) possui melhor rendimento de recuperação e concentração do acetato de isoamila nas primeiras 6 horas de pervaporação, nas condições testadas. Neste último experimento de pervaporação o aroma foi concentrado com apenas uma etapa de processo “*downstream*”, facilitando assim o processo de concentração do aroma natural líquido, ou seja, o pré-tratamento do fermentado bruto (centrifugação ou microfiltração) para retirada das células aparentemente não tem influência direta no processo de pervaporação.

Olmo *et al.* (2014) quando pervaporaram cervejas (Special Beer e Reserve Beer) para concentração de acetato de isoamila (1,25 e 2,23 ppm, respectivamente), chegaram a 40,47 e 31,83 ppm nas primeiras 2 horas de pervaporação, 17,92 e 22,62 em 4 horas, 11,01 e 19,79 em 6 horas e no final da pervaporação, 8 horas, 0 e 16,91 ppm de acetato de isoamila. A concentração do éster foi maior na cerveja “Reserve” porque esta é mais aromática do que a “Special”. A recuperação do acetato de isoamila foi diminuindo a cada ciclo de pervaporação devido à diminuição do composto na alimentação com o tempo, o fluxo também diminuiu com aumento do tempo e este estava diretamente correlacionado a concentração inicial da alimentação. Para evitar a influência da concentração inicial, o fator de enriquecimento (β) de cada componente foi avaliado, no trabalho o acetato de etila teve maior fator de enriquecimento em relação ao acetato de isoamila e álcool isobutílico, e o que influenciou o fator de enriquecimento foi à interação entre soluto e a membrana. Estes autores selecionaram uma membrana com forte hidrofobia, dificultando a passagem de compostos polares, tais como etanol contra substâncias menos polares tais como os responsáveis pelo aroma da cerveja (acetato de isoamila e acetato de etila). Comparando os resultados destes autores com os obtidos neste trabalho, o fator de enriquecimento foi maior para o acetato de isoamila, enquanto na recuperação do aroma da cerveja o β foi maior para o acetato de etila (Figuras 26, 27 e 28), considerando que a membrana utilizada neste trabalho possui os mesmos princípios, porém não é exatamente a mesma, nesta pesquisa utilizou-se a membrana PERVAP 4060 SULZER enquanto para pervaporação das cervejas utilizaram uma membrana da empresa PERVATECH.

Martinez *et al.* (2013), quando recuperaram compostos voláteis de caldo de caranguejo, determinou o efeito de substâncias não voláteis na alimentação do pervaporador. O cloreto de sódio (NaCl) por exemplo, pode ter efeito positivo na solução de alimentação como “*salting out*”, este pode concentrar mais os compostos voláteis em solução aquosa facilitando a permeação. Porém, concentrações de sais na solução de alimentação podem aumentar a densidade e a viscosidade e causar incrustações que podem penetrar na estrutura da membrana. Este efeito negativo pode ter ocorrido neste trabalho, pois a solução de alimentação era constituída basicamente de melaço de cana, subproduto que contém macro e micronutrientes, como: sódio, potássio, amônio e magnésio (Figura 24), além de outros componentes não voláteis presentes no meio de cultivo. A ocorrência de incrustações na membrana pode ter interferido na difusão dos componentes através da mesma. Esta camada de incrustações no lado da alimentação na membrana pode ser visualizada na Figura 30, no qual a membrana intacta antes da pervaporação apresenta brilho (C) e após utilização, apresentou coloração marrom (D). Esses efeitos podem ter limitado o desempenho da membrana Pervap™4060 em relação a recuperação do acetato de isoamila no aroma frutal natural (Figura 29).

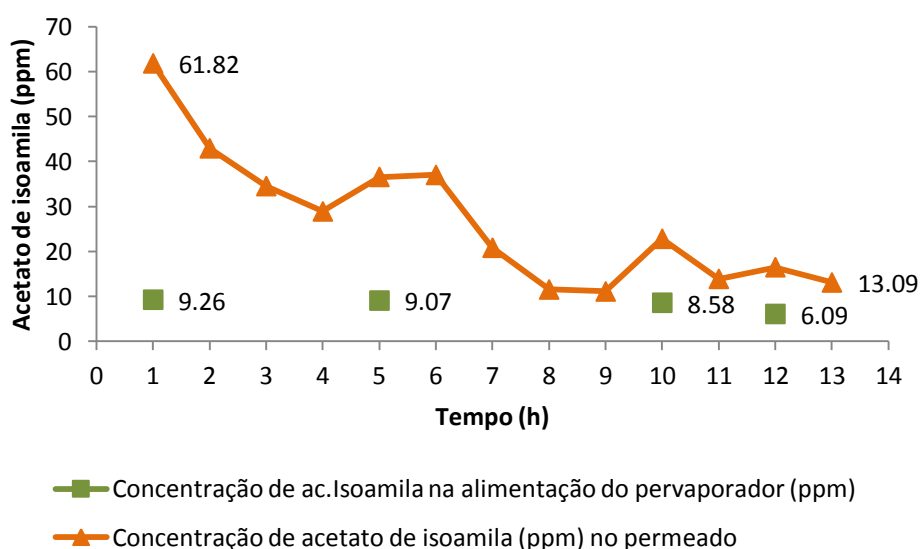


Figura 29: Perfil da concentração do componente de aroma, acetato de isoamila, na alimentação e no permeado durante o processo de recuperação por pervaporação

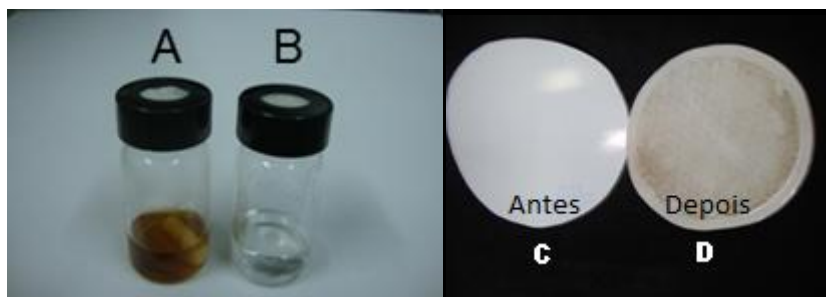


Figura 30: Aspecto das amostras e da membrana antes e após o processo de pervaporação. Onde (A) é a amostra da alimentação (fermentado bruto) e (B) a amostra do aroma natural líquido (permeado); (C): membrana PERVAP 4060 antes da pervaporação; (D): membrana depois do processo de recuperação

5.8 EFICIÊNCIA DE MICROENCAPSULAÇÃO

A eficiência da microencapsulação dos compostos (acetato de etila e aroma natural) foi determinada conforme metodologia através da concentração dos componentes voláteis medidos por SPME-CG, no qual foram comparadas a concentração na alimentação do “*spray drier*” com a concentração dos compostos em pó (acetato de etila e aroma natural) das diferentes formulações conforme tabela 6 no item 4.8.

Os resultados obtidos (Figura 31) demonstraram que os melhores agentes encapsulantes, considerando maior concentração final no pó ressuspendidos, foram dextrina (amido modificado) e a mistura de dextrina com maltodextrina (formulação 1 e 4, respectivamente). As concentrações foram de 73,49 e 72,58 ppm de acetato de etila, porém o rendimento em pó foi muito baixo 10,66% para as formulações 1 e 4. A concentração de acetato de etila na formulação 2 (goma arábica) foi de 34,76 ppm e rendimento em pó de 20,2% e por último a formulação 3 (maltodextrina) apresentou menor rendimento em pó de 6,66% e concentração de 25,11 ppm de acetato de etila (Figura 31).

A partir dos resultados obtidos nos testes utilizando o acetato de etila (P.A., Vetec), os agentes encapsulantes dextrina e maltodextrina foram os mais eficientes para retenção de compostos de aroma. Estes foram utilizados para encapsulação do aroma natural obtido por fermentação. Foram testados na microencapsulação o aroma produzido por fermentação sem nenhum processo “*downstream*” chamado de fermentado neste trabalho e o aroma recuperado e concentrado por pervaporação chamado de permeado.

Os resultados obtidos foram: concentração de 9,86 ppm de acetato de isoamila em formulação 6 (dextrina) com rendimento em pó de 18,56% e 7,90 para formulação 7 (dextrina e maltodextrina) e rendimento em pó de 26,1%. Em relação a concentração de acetato de isoamila no pó, o melhor agente encapsulante para o permeado (aroma natural concentrado) foi a dextrina e comparando estes com o produto fermentado em pó, o fermentado com dextrina foi a formulação que apresentou menor concentração de acetato de isoamila, 3,2 ppm e rendimento em pó de 39,5%, (Figura 31).

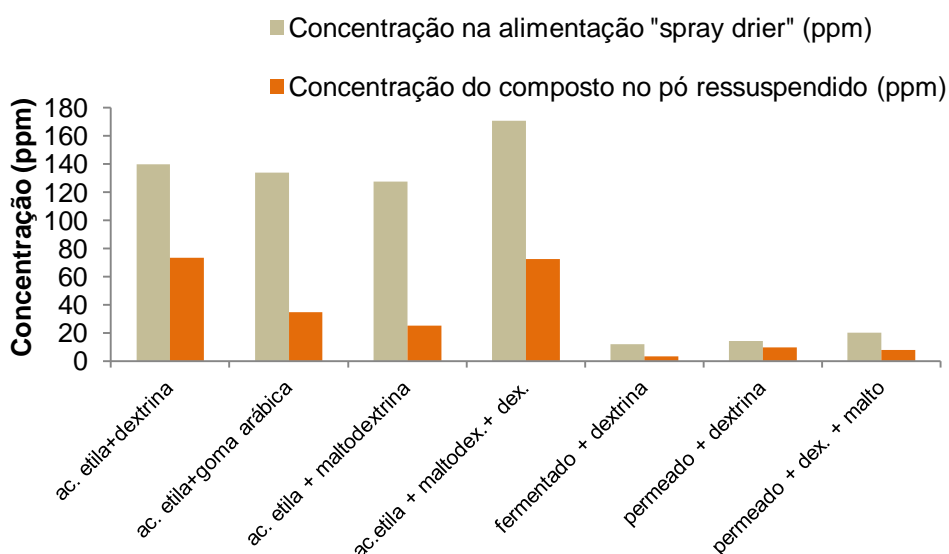


Figura 31: Concentração dos compostos de aroma (acetato de etila e acetato de isoamila) conforme as formulações estudadas para posterior secagem do aroma frutal
Formulações conforme tabela 7 no item 4.8.

Em relação à eficiência de encapsulação para o acetato de etila os melhores agentes encapsulantes foram: dextrina (52,46%), maltodextrina com dextrina (42,46%), goma arábica (25,92%), e por último a maltodextrina (19,68%). Dentre as amostras com aroma natural concentrado a melhor eficiência foi para dextrina com 68,95%, em seguida a mistura dos agentes encapsulantes maltodextrina com dextrina, cuja eficiência foi de 39,33%. Na Tabela 16 estão apresentadas as características das formulações e dos encapsulados em pó obtidos. Quanto ao fermentado (aroma bruto) a eficiência da dextrina como agente encapsulante foi 26,45%. Aburto *et al.* (1998) identificaram como os melhores agentes encapsulantes do óleo essencial de laranja, o amido modificado (dextrina) com retenção de voláteis maior que 93%, goma arábica (85%) e maltodextrina (80%). No presente estudo, o

melhor agente encapsulante também foi o amido modificado dextrina “*Snow flake*”, porém com retenção de 68,95% de acetato de isoamila. Os resultados do trabalho de Aburto *et al.* (1998) referem-se ainda a eficiência de retenção do óleo essencial de laranja de 94% quando foi utilizada mistura de amido modificado e maltodextrina (10% e 36%, respectivamente). Nesta pesquisa, a mistura de 15 % de amido modificado com 15 % de maltodextrina resultou numa eficiência de encapsulação de 33,9%.

De acordo com os resultados (Tabela 16) a maltodextrina foi o agente encapsulante que apresentou a mais baixa eficiência de encapsulação (19,68%) resultado abaixo do obtido por Balasubramani *et al.* (2015) No encapsulamento de óleo resina de alho (81,9%). Uma das razões para isto ter ocorrido foi devido a concentração testada (30%) ter sido 2 vezes menor, que a concentração utilizada por Balasubramani *et al.* (2015) (60%). Outra razão para o resultado inferior foi a diferença na temperatura de ar de entrada (150 °C) também mais baixa que a temperatura da utilizada pelo autor (200 °C).

Nos estudos citados observou-se uma variação nos resultados apresentados quanto à eficiência de encapsulação destes agentes encapsulantes, certamente, porque outros parâmetros influenciam nesta metodologia de secagem, como diferentes características e quantidade do composto de aroma adicionada a emulsão, ou seja, proporção do núcleo e material de parede, temperatura de entrada e de saída de ar no “*spray dryer*” durante a secagem (Janiszewska *et al.*, 2014). Por exemplo, em uma solução de maltodextrina com um grau de DE de 5 (10%, p/p) foi mostrado por Jouquand *et al.* (2004) que a retenção dos compostos voláteis dependia da hidrofobicidade do aroma. O aumento de temperatura (de 60 para 80 °C) favorecia os coeficientes de partição (K) de compostos de aroma (cetona, hexanal, butanoato de etila e 1-hexanol) em soluções de polissacarídeo. No mesmo estudo, em uma solução de β -ciclodextrina, variações de temperatura produziram efeitos diferentes sobre a retenção de compostos de aroma e pode revelar diferenças na natureza da interação com o agente encapsulante.

Tabela 16: Características da emulsão e das microcápsulas produzidas por “spray drier” de acetato de etila e do aroma natural

Fórmulação	1	2	3	4	5	6	7
Ag. encapsulante	dextrina	goma arábica	maltodextrina	maltodextrina + dextrina	dextrina	dextrina	maltodextrina + dextrina
Composto			acetato de etila		fermentado	permeado*	permeado*
Teor de sólidos da emulsão (%)	20	20	30	30	20	20	30
Eficiência da encapsulação (%)	52,46	25,92	19,68	42,46	26,45	68,95	39,33
Média do tamanho das partículas (diâmetro µm)	7,0	8,66	10,66	10,33	12,33	9,16	10,5

*permeado: aroma natural líquido concentrado por pervaporação

5.8.1 Análise por microscopia eletrônica de Varredura

Os pós produzidos por secagem por pulverização normalmente apresentam partículas com características esféricas e lisas. Estas são desejáveis porque há maior retenção de sabor (menos área de superfície proporção relativa: volume), densidades de massa superior (melhor embalagem do pó) e melhor fluxo. De acordo com OSÓRIO *et al.* (2010), esferas lisas são desejáveis para a estabilidade dos ingredientes encapsulados, e para a liberação controlada. Além disso, as imperfeições da superfície ocorrem quando há uma lenta formação de crosta na superfície das partículas durante a secagem das gotículas pulverizadas. A presença de “dentes” tem um efeito adverso sobre as propriedades de fluxo do produto. O pó encapsulado com maltodextrina por Balasubramani *et al.* (2015) apresentou microcápsulas com estruturas de forma esférica com superfície lisa e sem ranhuras quando analisadas por microscopia eletrônica de varredura, indicando boa retenção de compostos ativos (81,9%) e encapsulamento.

Na análise por microscopia eletrônica, as microcápsulas obtidas neste trabalho não se apresentaram na forma de partículas lisas. As únicas amostras que apresentaram poucas partículas esféricas e lisas foram a formulação 4, ou seja a amostra de acetato de etila com 15 %dextrina e 15% de maltodextrina (Figura 32-7) e a formulação 2, acetato de etila com goma arábica (Figura 32-6). Nestas formulações, a retenção de compostos voláteis foi de 42,46% e 25,92%,

respectivamente. Conforme figuras abaixo, todas as amostras apresentaram partículas com tamanhos variando entre 2 a 25 μm e ranhuras na superfície.

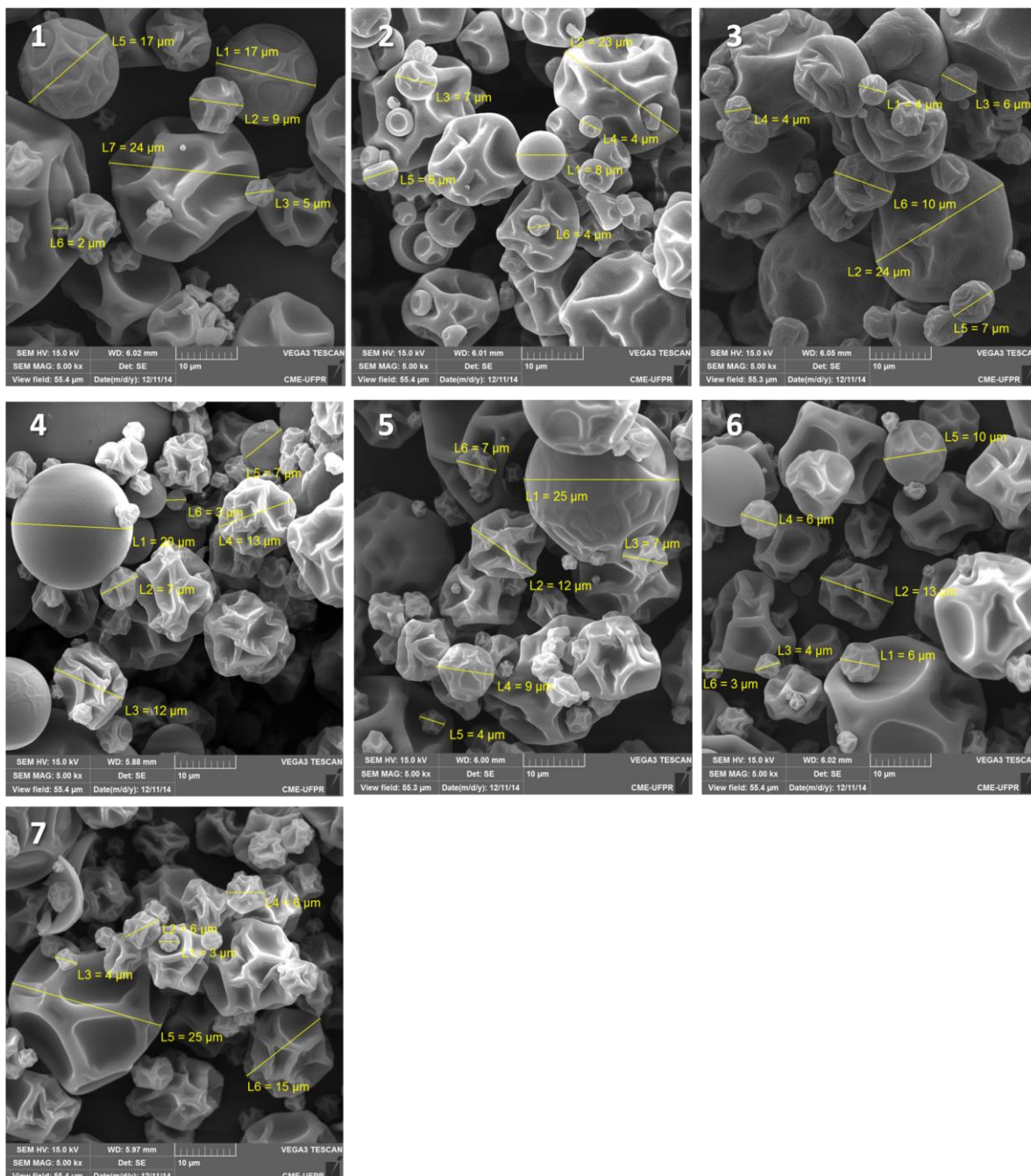


Figura 32: Microcápsulas de acetato de etila e aroma natural obtido por fermentação usando distintos agentes encapsulantes

Onde: 1) Acetato de etila/Dextrina , 2) Acetato de etila/goma arábica, 3)Acetato de etila/Maltodextrina, 4) Acetato de etila/ Dextrina e Maltodextrina, 5) Aroma natural bruto/ Dextrina , 6) Aroma Natural/ Dextrina, 7) Aroma Natural/Dextrina e Maltodextrina

5.8.2 Aspecto dos Aromas Obtidos em Pó

As formulações do aroma frutal em pó apresentaram as seguintes características: formulação 1 apresentou-se pó com aspecto amarelado, mais denso, isto devido as células ainda presentes no fermentado bruto seco com dextrina, (frasco 1). Os outros pós obtidos com aroma natural concentrado apresentaram-se como pós de aspecto fino, de cor branca como se observa nos frascos 2 e 3 da Figura 33.



Figura 33: Aspecto das formulações contendo aroma natural: 1) fermentado com dextrina, 2) permeado com dextrina e 3) permeado com maltodextrina e dextrina

5.8.3 Viabilidade

O número de células viáveis no fermentado líquido foi de $3,3 \times 10^6$ células/mL e no aroma em pó (fermentado em pó) foi de 5×10^4 células/g de pó. Certamente devido ao processamento da amostra em “spray-dryer” a viabilidade diminuiu em relação ao fermentado líquido que foi mantido a 4°C e na sequência submetido à pervaporação a 45°C. No processo de secagem a amostra entrou em contato com temperaturas de até 150°C, tornando algumas células inviáveis.

Considerando que a produção brasileira de cervejas especiais vem aumentando significativamente e que os “starters” (leveduras fermentadoras) são ingredientes fundamentais para esta produção, vislumbra-se uma nova aplicação para o produto obtido neste trabalho. A *P. fermentans* tem sido utilizada em fermentações naturais ou adicionadas como cultura de arranque para melhorar a qualidade de produtos industrializados, aumentando o aroma frutal em vinhos, cafés, outras bebidas fermentadas e assim gerando produtos de qualidade e de características inovadoras. A obtenção do aroma natural em pó com células viáveis

de *Pichia fermentans* pode ser um destes produtos para a indústria de alimentos, pois além da liberação de aroma de frutas este pode funcionar como fermento, e poderá ser testado em cervejarias, panificação, entre outros setores da indústria alimentícia.

5.8.4 Estabilidade determinada dos aromas em pó após 3 meses de estoque

As amostras foram ressuspensas e analisadas em CG por HS-SPME conforme metodologia, aparentemente todas as amostras apresentaram estabilidade em relação à concentração de acetato de isoamila microencapsulados, houve uma queda de 13,18% no aroma microencapsulado com dextrina, 6,07% para o aroma em mistura de dextrina e maltodextrina e 13,75% para o fermentado microencapsulado com dextrina (Tabela 17). Conforme Pham-Hoang (2013) os aromas são moléculas muito instáveis. Quando estes compostos voláteis obtidos por técnica de microencapsulação em pó, tornam-se mais estáveis e funcionais, pois podem ter sua liberação controlada. Fatores importantes para controlar a estabilidade das microcápsulas são: a temperatura de armazenamento e atividade da água, estas influenciam diretamente na estabilidade de compostos microencapsulados.

Nesta pesquisa o estudo de estabilidade demonstrou que em três meses a retenção dos voláteis se manteve praticamente estável em relação ao pó obtido inicialmente, apesar da temperatura de armazenamento e atividade de água não terem sido medidas.

Tabela 17: Teste de estabilidade em relação à concentração de acetato de isoamila microencapsulado

Aroma microencapsulado com:	Concentração (ppm) Acetato de isoamila inicial	Concentração (ppm) Acetato de isoamila 3 meses de prateleira
Dextrina	9,86	8,56
Dextrina e Maltodextrina	8,40	7,89
Fermentado com dextrina	3,20	2,76

5.9 PERFIL SENSORIAL DO AROMA FRUTAL

O refrigerante a base de açúcar contendo o aroma natural produzido por fermentação (amostra 1), e analisado pela empresa Duas Rodas Industrial Ltda. apresentava-se como um líquido turvo amarelo intenso. Na análise sensorial observou-se que seu odor possuía notas fermentadas, de fruta passada e cozida, remetendo a banana, e com suaves notas fúseis e amadeiradas, que lembraram cachaça. Gosto doce, com notas alcoólicas, fermentadas, fúseis e de fruta passada. Apresentou suave sabor residual fenólico (remédio) e gosto amargo.

O refrigerante a base de açúcar com aroma (amostra 2), também se apresentava como um líquido turvo amarelo intenso. Odor com suaves notas fermentadas, alcoólicas, de fruta passada e cozida. Apresentou odor com notas fúseis e doces. Sabor alcoólico, com gosto doce, notas frutais e fermentadas, que remetem a cidra.

O coquetel / bebida mista com gás com aroma (amostra 1), era um líquido turvo amarelo, com odor alcoólico, com suaves notas fermentadas, frutais e oxidadas. Sabor alcoólico, com gosto ácido e suave amargo. Apresentou suaves notas fermentadas e cítricas, que lembram albedo. Com sabor residual oxidado.

O coquetel/ bebida mista com gás com aroma (amostra 2), líquido turvo amarelo, possuía odor intenso, com notas fermentadas e cítricas. Sabor alcoólico, com intenso gosto amargo e suave ácido. Apresentaram suaves notas fermentadas e cítricas. Com suave sabor residual oxidado.

Conforme avaliadores/aromistas da empresa Duas Rodas Industrial Ltda., os aromas apresentaram variações de perfil sensorial de acordo com a aplicação. Visto que no refrigerante foram descritas notas frutais, que remeteram a banana e notas fúseis, características de cachaça. Na aplicação em coquetel/bebida mista, foram detectadas notas cítricas, que lembraram albedo e cidra. O perfil sensorial dos aromas avaliados foi considerado inadequado para a aplicação em refrigerante e coquetel/bebida mista, principalmente pela presença de notas fermentadas e sabor residual. Os relatórios/ laudos da análise sensorial realizada na empresa encontram-se no Anexo I.

Os compostos voláteis encontrados no aroma natural por HS-SPME/CG em maior concentração foram acetato de isoamila (odor frutado de banana passa) nas

amostras 1 e 2, (20,017 e 11,89 ppm), com 66,66% e 49,54% em relação ao total de componentes de aroma, respectivamente. Acetato de propila (odor frutado etéreo, banana) no aroma 1(1,475 ppm) e álcool isoamílico (1,315 ppm) e no aroma 2 a concentração de álcool isoamílico foi de 2,791 ppm (Tabela 18). Somente um componente volátil diferente foi detectado no aroma 2 (2-heptanona), componente de aroma com odor doce frutado de coco.

Tabela 18: Perfil de compostos voláteis do aroma nas amostras 1 e 2 analisados por HS-SPME-CG

*T.R. (min)	Composto	C.A.S.	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração
			(ppm)	(%)	(ppm)	(%)
			Amostra (1)	Amostra (1)	Amostra (2)	Amostra (2)
1.829	Acetaldeído	75-07-0	0,16	0,52	0,53	2,21
1.974	Etanol	64-17-5	3,29	10,97	4,06	16,91
2.238	N.I.	-	0,01	0,04	0,04	0,16
2.297	N.I.	-	0,02	0,05	-	-
2.623	Acetato de etila	141-78-6	2,26	7,48	2,76	11,51
2.941	N.I.	-	0,06	0,19	0,08	0,34
3.854	N.I.	-	0,01	0,03	0,01	0,03
3.902	N.I.	-	0,01	0,04	0,02	0,09
4.291	Acetato de propila	109-60-40	1,47	4,91	0,01	0,06
4.357	Álcool isoamílico	123-51-3	1,31	4,38	2,79	11,63
5.114	Isobutirato de etila	97-62-1	0,04	0,14	0,16	0,69
5.738	2-hexanona	591-78-6	0,01	0,02	0,01	0,03
7.426	1-hexanol	111-27-3	0,02	0,06	0,06	0,24
7.683	Acetato de isoamila	123-92-2	20,02	66,66	11,89	49,54
7.826	2-heptanona	110-43-0	0,99	3,29	1,33	5,56
8.240	N.I.	-	0,01	0,03	-	-
8.956	N.I.	-	0,09	0,32	0,11	0,47
Voláteis Totais		-	30,03	100	24	100

TR: tempo de retenção; VT: voláteis totais; NI: não identificado

Os aromas obtidos por fermentação apresentaram as seguintes características: o fermentado considerado aroma bruto de coloração âmbar devido ao meio de cultivo utilizado melaço de cana (1), após concentração por pervaporação o aroma apresentou-se transparente e líquido (2) com forte odor etéreo devido à concentração dos compostos voláteis, em seguida este foi seco com agente encapsulante em “*spray-drier*” apresentou-se na forma de pó fino branco (3) (Figura 34).



Figura 34: Aspecto do aroma natural produzido por fermentação, Onde: 1) Aroma natural bruto ou fermentado; 2) Aroma natural líquido concentrado ou permeado; 3) Aroma natural em pó.

5.10 COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG/MS

Os componentes de aroma acetato de isoamila e álcool isoamílico foram identificados em todas as amostras. Alguns componentes de aroma foram identificados por CG/MS e não apareceram nas análises de CG/FID. As amostras de aroma em pó apresentaram uma quantidade menor de componentes de aroma em relação às amostras de aroma na forma líquida devido à secagem deste material por “*spray-drier*” este método pode ter degradado alguns componentes como acetaldeído, etanol, 1-propanol, entre outros (Tabela 19). A presença de água nas amostras concentradas por pervaporação, também podem ter interferido na composição da amostra analisada. Observou-se maior concentração de álcool isoamílico quando comparada ao acetato de isoamila inicialmente quantificado por CG/FID.

Tabela 19: Compostos presentes nos aromas produzidos por fermentação submersa por *Pichia fermentans*.

Composto	Amostra 1	Amostra 2	Aroma pó (dextrina)	Aroma pó fermentado	Aroma pó (dexmalto)*
acetaldeído	+	+	-	-	-
etanol	+	+	-	-	-
Isobutiraldeído	+	-	-	-	-
1 propanol	+	+	-	-	-
acetato de etila	+	+	+	+	-
Isobutil álcool	+	+	-	-	-
3 metil butanal	+	+	-	-	-
Butiraldeído	+	-	-	-	-
Álcool isoamílico	+	+	+	+	+
3 metil ácido butanóico	+	+	+	-	-
acetato de isoamila	+	+	+	+	+
1 butanol, 3 metil butanoato	+	+	+	-	-
2 etil 1 hexanol	+	+	-	-	-
Acetafenona	-	-	+	-	-
N.I.	-	-	-	+	-

* (+): componente identificado no aroma, (-): componente não identificado no aroma, N.I.: composto não identificado por CG FID e por CG/MS, (dexmalto)*: amostra seca com a mistura dos agentes encapsulantes dextrina e maltodextrina.

O aroma (amostra 2) foi o produto que apresentou maior aceitabilidade quando aplicados em bebidas por aromistas treinados da empresa Duas Rodas (Figura 35) sendo que todos os cromatogramas das amostras de aroma analisadas em CG/MS apresentaram o espectro do acetato de isoamila (Figura 36).

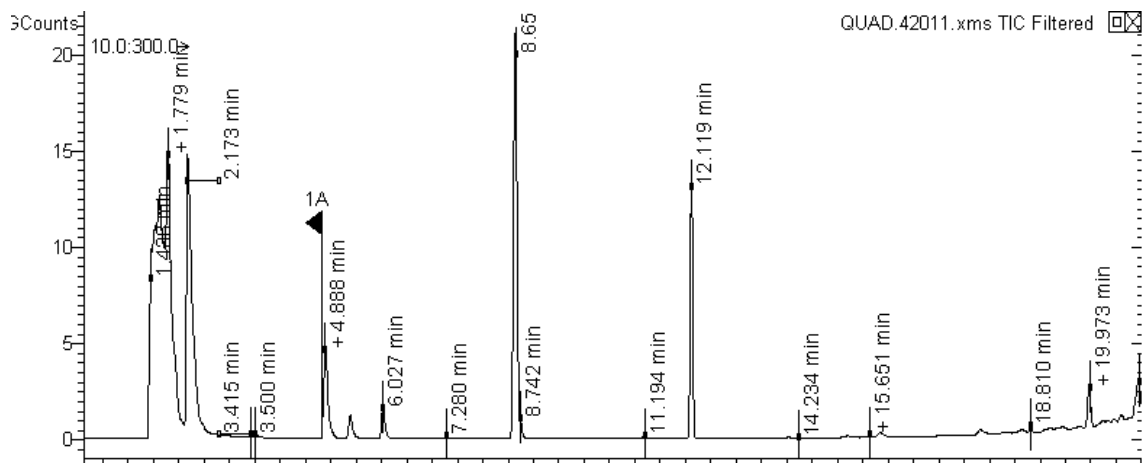


Figura 35: Cromatograma gerado por CG/MS do aroma natural líquido (amostra 2)

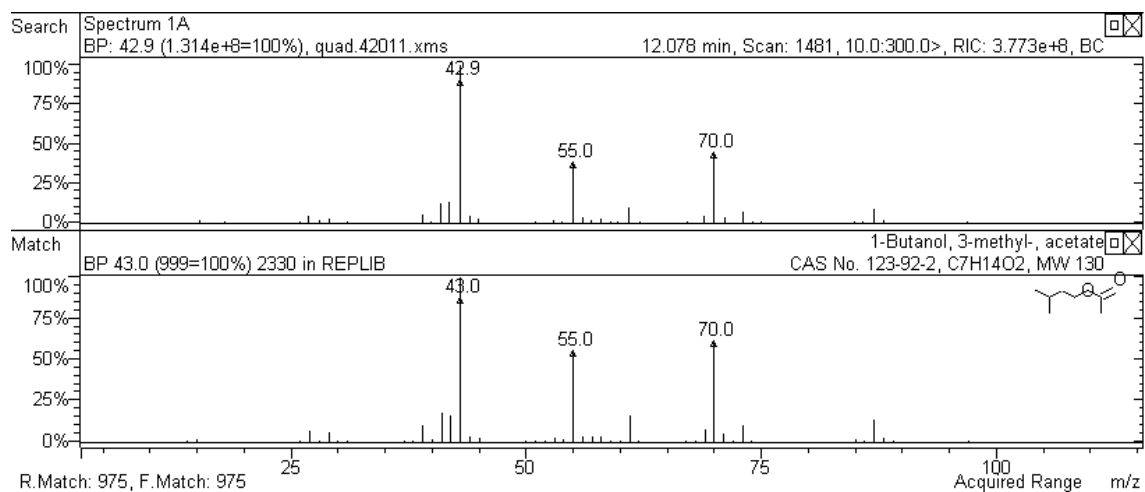


Figura 36: Espectro de massa do acetato de isoamila gerado por CG/MS do aroma natural líquido (amostra 2)

6 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados foi possível desenvolver um processo de produção de aroma natural por fermentação submersa, recuperar e concentrar aroma de banana por pervaporação.

A pervaporação foi uma metodologia eficiente para concentração e recuperação dos compostos de aroma produzidos neste trabalho, sendo um processo promissor, pois este além de concentrar os compostos de aroma presentes no fermentado, facilitou processos “downstream” devido à pureza do produto final já que o líquido que entra em contato com a membrana não passa através da mesma.

A membrana escolhida atendeu as expectativas para concentração do acetato de isoamila, com maior seletividade para este como sendo o principal componente do aroma de banana.

Também foi possível secar e microencapsular o aroma natural utilizando agente encapsulante em “spray-dryer”, o melhor agente encapsulante foi a dextrina para o aroma natural sendo ainda necessário realização de mais estudos de estabilidade e formulação do produto final para melhorar a eficiência de encapsulação do aroma e estabilidade para posterior aplicação comercial.

O aroma natural fermentado em pó, que não passou por processo de pervaporação, apresentou concentração mais baixa de acetato de isoamila, porém apresentava células viáveis de *Pichia fermentans*. Este pode ser mais um produto promissor para a indústria alimentícia, podendo ser utilizado como aromatizante e “starter” de fermentações.

O aroma frutal líquido quando testado em bebidas atendeu às expectativas quanto aroma frutal de banana, pois apresentaram notas frutais que remetem a banana, porém foram considerados inadequados para aplicação em refrigerante e bebida tipo “ice” devido notas fermentadas e sabor residual.

REFERÊNCIAS

- ABURTO L.C., TAVARES D.Q., MARTUCCI E.T. Microencapsulação de Óleo Essencial de Laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18 no.1, 1999.
- ALBUQUERQUE M.G.E., EIRO M., TORRES C., NUNES B.R., REIS M.A.M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. **Journal of Biotechnology**, v.130, p.411-421, 2007.
- ALPENDURATA, M. F, Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis, **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14, 2000.
- APINTANAPONG, M, NOOMHORM, A. The use of spray-drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.95-102, 2003.
- ASIKIN Y, TAKAHASHI M, MISHIMA T, MIZU M, TAKARA K, WADA K, Antioxidant activity of sugarcane molasses against 2,20 -azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced peroxy radicals. **Food Chemistry**, v.141, p. 466-472, 2013.
- BALASUBRAMANI P., PALANISWAMY P.T., VISVANATHAN R., THIRUPATHI V., SUBBARAYAN A, MARAN J.P. Microencapsulation of garlic oleoresin using maltodextrin as wall material by spray drying. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 210-217, 2015.
- BARROS NETO B., SCARMINIO IS, BRUNS RE. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.299p.
- BEEKWILDER J, WOLSWINKEL R, JONKER H, HALL R, DE VOS CH, BOVY A. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. **Applied Environ Microbiol**, v.72, n.8, 5670-2, 2006.
- BENGTSSON S, PISCO A.R, REIS M.A.M, LEMOS P.C. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. **Journal of Biotechnology**, v.145, p. 253-263, 2010.
- BLUEMKE W, SCHRADER J. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. **Biomolecular Engineering**, v.17, p 137-142, 2001.
- CARLQUIST M, GIBSON B, KARAGUL YUCEER Y, PARASKEVOPOULOU A, SANDELL M, ANGELOV A I, GOTCHEVA V, ANGELOV A D, ETSCHMANN M, BILLERBECK GM, LIDÉN G. Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts - a mini-review. **Yeast**, v. 32, n.1, p.123-43, 2015.

CAPUTO L., QUINTIERI L., BARUZZI F., BORCAKLI M., MOREA M. Molecular and phenotypic characterization of *Pichia fermentans* strains found among Boza yeasts. **Food Research International**, v. 48, p755-762, 2012.

CARVALHO D.S, BOGUSZ S.J, DIONISIO A P, MAROSTICA M. J, GODOY H.T, PASTORE G. M. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions to determine fruity aroma compounds produced by *Neurospora sitophila*. **Analytical Methods**, v.6, p.7984-7988, 2014.

CATARINO M, FERREIRA A, MENDES A. Study and optimization of aroma recovery from beer by pervaporation. **Journal of Membrane Science** v.341, p.51-59, 2009.

CAZETTA M.L., CELLIGOI M.A.P.C, BUZATO J.B., SCARMINO I.S, SILVA R.S.F.. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry**, v.40, p.747-751, 2005.

CHIAPPINI C. C. Aromas naturais produzidos por microrganismos. Food Ingredients Brazil, v.4, 2008. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/55.pdf>. Acesso em: 22/3/2015.

CLEMENTE-JIMENEZ J.M, MINGORANCE-CAZORLA L. MARTINEZ-RODRIGUEZ S, LAS HERAS-VAZQUEZ F.J. RODRIGUEZ-VICO F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology** 98 301-308, 2005

DAS D, CHARUMATHI D, DAS N. Combined effects of sugarcane bagasse extract and synthetic dyes on the growth and bioaccumulation properties of *Pichia fermentans* MTCC 189. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, p.497-505, 2010.

DIB TAXI C.A. **Suco de camu-camu (Myrciaria dúbia) microencapsulado obtido através de secagem por atomização**. Campinas, 2001, 172 p. Tese (Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP).

DOMIZIO P, ROMANI C, LENCIONI L, COMITINI F, GOBBI M, MANNAZZU I, CIANI M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p.170-180, 2011.

DOMIZIO P., LIU Y, BISSON L.F, BARILE D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. **Food Microbiology**, v.43, p. 5-15, 2014.

FEHÉR E, MAJOR B, BÉLAFI-BAKÓ K, GUBICZA L. Semi-continuous enzymatic production and membrane assisted separation of isoamyl acetate in alcohol ionic liquid biphasic system. **Desalination**, v. 241, p.8-13, 2009.

FELTRIN V P; ERNANI S.S.A, PORTO C.S, TORRES R.C.O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43, 2000.

FREITAS I, PINON N, MAUBOIS J-L, LORTAL S, THIERRY. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. **International Journal of Food Microbiology**, v.129 37-42, 2009.

GARDE-CERDAN T, ANCIN-AZPILICUETA C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT**, v.41, p. 501-51,2008.

GHARSALLAOURI A; ROUDART G; CHAMBIN O; VOILLEY A; SAUREL R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GOULA A.M; ADAMOPOULOS K.G. A new technique for spray drying orange juice concentrate. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 342-351, 2010.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G. Spray drying of tomato pulp in de humidified air: II. The effect on powder properties, **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.

HABERT C.A, BORGES C.P, NOBREGA R. Processos de separação por membrana. **Série Escola Piloto de Engenharia Química**, COPPE/RJ, 2006.

HAOXIN LI, ZHENGWU JIANG, XIAOJIE YANG, LONG YU, GUOFANG ZHANG, JIANGUO WU, XIANGYONG LIU. Sustainable resource opportunity for cane molasses: use of cane molasses as a grinding aid in the production of Portland cement. **Journal of Cleaner Production**, p. 1-9, 2015.

HOREMAN A.P. Alimentos e Bebidas (2011) Disponível em: http://www.alimentosebebidas.com.br/a_revista/edicoes/ab14_dupla.pdf Acesso em : 12/08/2011.

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 Reseach International**, v. 34. p. 277-282, 2001.

ISCI A, SAHIN S, SUMNU G. Recovery of strawberry aroma compounds by pervaporation. **Journal of Food Engineering**, v75, p.36 - 42, 2006.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 13299:2003. Sensory analysis -Methodology - **General guidance for establishing a sensory profile**. 2003.

JANISZEWSKA E, JEDLIŃSKA A, WITROWA-RAJCHERT D. Effect of homogenization parameters on selected physical properties of lemon aroma powder. **Food and Bioproducts Processing**, v.94, p.405-413, 2014

JOUQUAND C, DUCRUET V, GIAMPAOLI P. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. **Food Chemistry**, v.85, p. 467-474, 2004.

KATAOKA H, LORD H, PAWLISZYN J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 36-62, 2000.

LALOU S, MANTZOURIDOU F, PARASKEVOPOULOU A, BUGARSKI B, LEVIC S, NEDOVIC V. Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.97, v.21, p. 9397- 407, 2013.

LIU Z-Q, ZHOU J-H, ZENG Y-L, OUYANG X-L; The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor **Fungal Biology**, v.116, p.769-777, 2012.

LUIS P, DEGRÈVE J, BRUGGEN B. Separation of methanol-n-butyl acetate mixtures by pervaporation: Potential of 10 commercial membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 429, p.1-12, 2013.

MADENE A, JACQUOT M, SCHER J, DESOBRY S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.1-21, 2006.

MANTZOURIDOU F, PARASKEVOPOULOU A. Volatile Bio-ester Production from Orange Pulp-Containing Medium Using *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Bioprocess Technology**, v.6, p.3326-3334, 2013.

MARTÍNEZ R, SANZ M.T, BELTRÁN S. Concentration by pervaporation of brown crab volatile compounds from dilute model solutions: evaluation of PDMS membrane. **Journal of Membrane Science**, v.428, p.371-379, 2013.

MATTOS I. L. e QUEIROZ R. R. U. Pervaporação: Uma técnica de separação contínua não cromatográfica. **Química Nova**, n.21, v.2, p. 202-205, 1998.

NIEMISTO J, KUJAWSKI W, KEISKI R. Pervaporation performance of composite poly (dimethyl siloxane) membrane for butanol recovery from model solutions. **Journal of Membrane Science**. v. 434, p. 55-64, 2013.

OLMO A, BLANCO C. A, PALACIO L, PRÁDANOS P, HERNÁNDEZ A. Pervaporation methodology for improving alcohol-free beer quality through aroma recovery. **Journal of Food Engineering**, v.133, p.1-8, 2014.

OSIMANI A, GAROFALO C, AQUILANTI L, MILANOVIĆ VESNA, CLEMENTI FRANCESCA. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. **International Journal of Food Microbiology** v.194, p. 62-70, 2015.

OSORIO C, FORERO D.P, CARRIAZO J.G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research International**, v. 44, Ed 5, p.1174-118, 2011.

PHAM-HOANG B. N, ROMERO-GUIDO C, PHAN-THI H, WACHÉ Y. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.97, p. 6635-6645, 2013.

PARVEZ A.M., LUIS P., OOMS T, VREYSEN S, VANDEZANDE P, DEGREVE J, BRUGGEN B. Separation of ethyl acetate–isooctane mixtures by pervaporation and pervaporation-based hybrid methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p.252-262, 2012.

PEREIRA C. D A. **Produção de metabólitos voláteis frutais por *kluveromyces marxianus* em fermentação submersa em meio à base de melão de soja.** Curitiba, 80 p. Dissertação (Mestrado) - Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PEREIRA G.V.M, SOCCOL V. T, PANDEY A, MEDEIROS ABP, LARA J.M.R.A., GOLLO A. L., SOCCOL C. R. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v.188, p. 60-66, 2015.

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

RAISI A, AROUJALIAN A, KAGHAZCHI T. Multicomponent pervaporation process for volatile aroma compounds recovery from pomegranate juice. **Journal of Membrane Science**, v.322, p. 339-348, 2008.

RIJSWIJCK IM, DIJKSTERHUIS J, WOLKERS-ROOIJACKERS JC, ABEE T, SMID EJ. Nutrient limitation leads to penetrative growth into agar and affects aroma formation in *Pichia fabianii*, *P. kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.32, n.1, p. 89-101, 2015.

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.

SANNA M.L, ZARA S., ZARA G., MIGHELI Q., BUDRONI M., MANNAZZU I. *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. **Fungal Biology**, v. 116, p. 769 - 777, 2012.

SANNA ML, ZARA G, ZARA S, MIGHELI Q, BUDRONI M, MANNAZZU I. A putative phospholipase C is involved in *Pichia fermentans* dimorphic transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840 344-349, 2014.

SHIGA H, YOSHI H, NISHIYAMA T. Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. **Drying Technology**, v.19, p.1385 -1395, 2001.

SILVA J P A, MUSSATTO S I, ROBERTO I C, TEIXEIRA J A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v.37, p.259-265, 2012.

SIMON BENGTSSON, ANA R. PISCO MARIA A.M. REIS, PAULO C. LEMOS. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. **Journal of Biotechnology**, v.145, p. 253-263, 2010.

STRINGINI M, COMITINI F, TACCARI MANUELA, CIANI MAURIZIO. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. **Food Microbiology**, v.26, p. 415-420, 2009.

THE FREEDONIA GROUP. **World Flavors & Fragrances**. United states of America, 2012.

TONON, R. V., BRABET, C., HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 444-450, 2009.

THIYAGARAJAN R., RAVI S., P. K. BHATTACHARYA. Pervaporation of methyl-ethyl ketone and water mixture: Determination of concentration profile. **Desalination**, v.277, p.178-186; 2011.

TRIFUNOVIC O, LIPNIZKI F, TRÄGÅRDH G. The influence of process parameters on aroma recovery by hydrophobic pervaporation. **Desalination**, v.189, p.1-12, 2006.

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

WESCHENFELDER T. A, LANTIN P, VIEGAS M. C, CASTILHOS F, SCHEER AGNES P. Concentration of aroma compounds from an industrial solution of soluble coffee by pervaporation process. **Journal of Food Engineering**, v.159, p.57-65, 2015.

XIA J, XU Z, XU H, LIANG J, LI S, FENG X. Economical production of poly (e-L-lysine) and poly(L-diaminopropionic acid) using cane molasses and hydrolysate of streptomyces cells by *Streptomyces albulus* PD-1. **Bioresource Technology**, v.164, p.241-247, 2014.

XU K, XU P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v.153, p.23-29, 2014.

YONATHAN A, MAKOTO T, TAKASHI M, MASAMI M, KENSAKU T, KOJI W. Antioxidant activity of sugarcane molasses against 2,20 –azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced peroxy radicals. **Food Chemistry**, v.141, p 466-472, 2013.

YOSHII, H., SOOTTITANTAWAT, A., LIU, X.D. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum Arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.2, p.55-6, 2001.

ZHANG C, YANG L, BAI Y, GU J, SUN Y. ZSM-5 filled polyurethaneurea membranes for pervaporation separation isopropyl acetate from aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, v.85, 8-16, 2012.

ZHANG D, FENG X, ZHOU Z, ZHANG Y, XU H. Economical production of poly(L-glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. **Bioresource Technology**, v.114, p. 583-588, 2012.

ZHU C, SHI J, JIANG C, LIU Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**,v.50, p.125-132, 2015.



RELATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL

DATA: 05/02/2015

PRODUTO AVALIADO: Aroma natural produzido por fermentação

AMOSTRAS AVALIADAS:

- Refrigerante a base de açúcar com Aroma 1 - Data de fabricação: 11/01
Lote de controle: 890000011211
- Refrigerante a base de açúcar com Aroma 2 - Data de fabricação: 12/01
Lote de controle: 890000011212
- Coquetel / bebida mista com gás com Aroma 1 - Data de fabricação: 11/01
Lote de controle: 890000011213
- Coquetel / bebida mista com gás com Aroma 2 - Data de fabricação: 12/01
Lote de controle: 890000011214

OBJETIVO: Avaliação do perfil sensorial.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

As amostras foram aplicadas em refrigerante a base de açúcar (Fórmula de aplicação nº 17619/000) e coquetel / bebida mista com gás (Fórmula de aplicação nº 16264/001), ambos na dosagem 1,0 %, por APP.

Cerca de 25 mL de cada amostra, a temperatura de 25 °C ± 2 °C, foi servido em copos plásticos de 50 mL e identificados com uma combinação de 3 números aleatórios.

METODOLOGIA - TESTE PERFIL SENSORIAL:

Sete avaliadores treinados receberam as amostras e as caracterizaram nos aspectos aparência, odor e sabor. O perfil sensorial por consenso foi estabelecido por discussão do painel de avaliadores treinados sentados ao redor de uma mesa.

RESULTADOS:

- Refrigerante a base de açúcar com Aroma 1 - Data de fabricação: 11/01
Líquido turvo amarelo intenso. Odor com notas fermentadas, de fruta passada e cozida, remetendo a banana, e com suaves notas fúseis e amadeiradas, que lembram cachaça. Gosto doce, com notas alcoólicas, fermentadas, fúseis e de fruta passada. Apresentou suave sabor residual fenólico (remédio) e gosto amargo.



- Refrigerante a base de açúcar com Aroma 2 - Data de fabricação: 12/01
Líquido turvo amarelo intenso. Odor com suaves notas fermentadas, alcoólicas, de fruta passada e cozida. Apresentou odor com notas fúseis e doces. Sabor alcoólico, com gosto doce, notas frutais e fermentadas, que remetem a cidra.
- Coquetel / bebida mista com gás com Aroma 1 - Data de fabricação: 11/01
Líquido turvo amarelo. Odor alcoólico, com suaves notas fermentadas, frutais e oxidadas. Sabor alcóolico, com gosto ácido e suave amargo. Apresentou suaves notas fermentadas e cítricas, que lembram albedo. Com sabor residual oxidado.
- Coquetel / bebida mista com gás com Aroma 2 - Data de fabricação: 12/01
Líquido turvo amarelo. Odor intenso, com notas fermentadas e cítricas. Sabor alcóolico, com intenso gosto amargo e suave ácido. Apresentaram suaves notas fermentadas e cítricas. Com suave sabor residual oxidado.

CONCLUSÃO:

Os aromas apresentaram variações de perfil sensorial de acordo com a aplicação. Visto que no refrigerante foram descritas notas frutais, que remeteram a banana e notas fúseis, características de cachaça. Na aplicação em coquetel / bebida mista, foram detectadas notas cítricas, que lembraram albedo e cidra.

O perfil sensorial dos aromas avaliados foi considerado inadequado para a aplicação em refrigerante e coquetel / bebida mista, principalmente pela presença de notas fermentadas e sabor residual.

REFERÊNCIAS:

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 13299:2003. Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile.** 2003.

CAROLINE MOTTA
AFS - ANÁLISE FÍSICO SENSORIAL
ANALISTA SENSORIAL - AFS
FONE: (55) 47 3372-9210 /
RAMAL: 9126
www.duasrodas.com

LUCÍLA VICARI
AFS - ANÁLISE FÍSICO SENSORIAL
ANALISTA SENSORIAL - AFS
FONE: (55) 47 3372-9210 /
RAMAL: 9126
www.duasrodas.com

SERGIO S. KULICZ DA SILVA
AFS - ANÁLISE FÍSICO SENSORIAL
LABORATORISTA
FONE: (55) 47 3372-9210 /
RAMAL: 9126
www.duasrodas.com