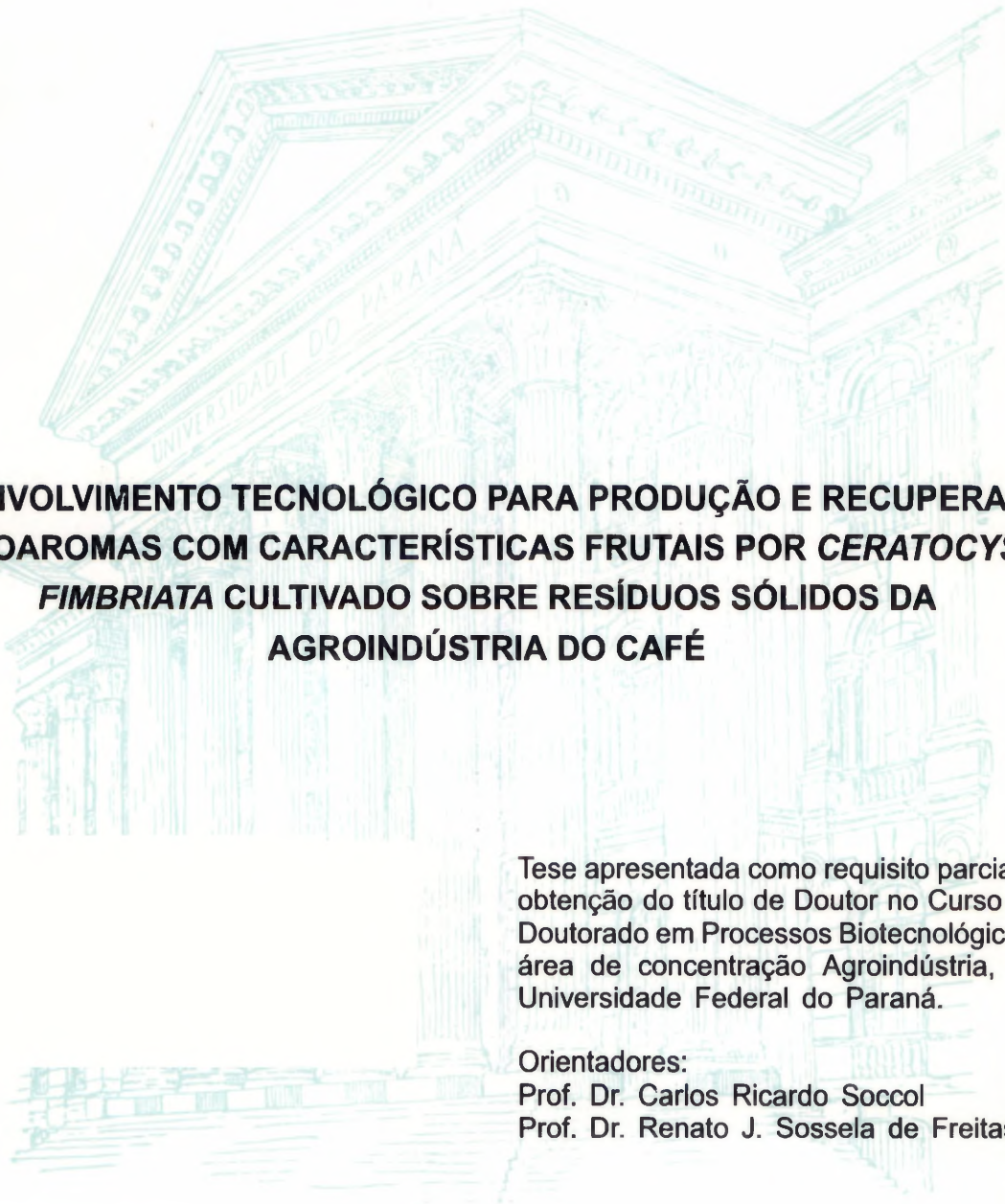


ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS



**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO
DE BIOAROMAS COM CARACTERÍSTICAS FRUTAIS POR *CERATOCYSTIS
FIMBRIATA* CULTIVADO SOBRE RESÍDUOS SÓLIDOS DA
AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor no Curso de
Doutorado em Processos Biotecnológicos,
área de concentração Agroindústria, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadores:
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Prof. Dr. Renato J. Sossela de Freitas

CURITIBA

2003

ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO
DE BIOAROMAS COM CARACTERÍSTICAS FRUTAIS POR *CERATOCYSTIS*
FIMBRIATA CULTIVADO SOBRE RESÍDUOS SÓLIDOS DA
AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor no Curso de
Doutorado em Processos Biotecnológicos,
área de concentração Agroindústria, da
Universidade Federal do Paraná.

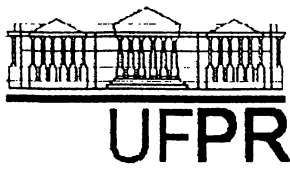
Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Prof. Dr. Renato J. Sossela de Freitas

CURITIBA

2003



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos dezoito dias do mês de setembro de 2003 no Auditório do CESEC Centro Politécnico da UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias, coordenador do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a décima sexta Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do curso Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Geraldo Lippel Sant'Anna Jr (UFRJ), Gláucia Maria Pastore (UNICAMP), Renato João Sossela de Freitas (UFPR), Carlos Ricardo Soccol (UFPR), Luiz Augusto Meleiro (UFPR), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR) Às 9:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata Adriane Bianchi Pedroni Medeiros a fazer a apresentação da Tese intitulada: "**Desenvolvimento Tecnológico Para a Produção e Recuperação de Bioaromas com Características Frutais por *Ceratocystis fimbriata* Cultivado sobre Resíduos da Agroindústria do Café**". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a argüição, a banca atribuiu os seguintes conceitos: Prof^o Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr; A, Prof^a Dra. Gláucia Maria Pastore; A, Prof^o Dr. Carlos Ricardo Soccol; A, Prof^o Dr. Luiz Augusto Meleiro A; Prof^o Dr. Renato João Sossela de Freitas; A. Prof^a Dra Luciana Porto de Souza Vandenberghe; A.

A média obtida resultou na A do candidato, (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

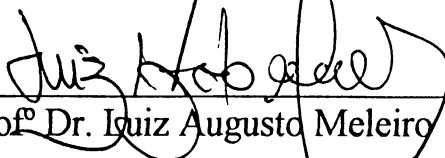
Curitiba, 18 de setembro de 2003.



Prof^o Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr



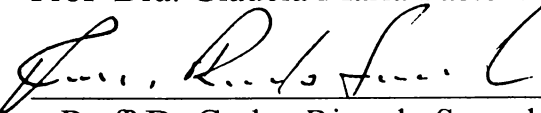
Prof^o Dr. Renato João Sossela de Freitas



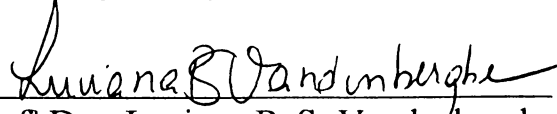
Prof^o Dr. Luiz Augusto Meleiro



Prof^a Dra. Gláucia Maria Pastore



Prof^o Dr Carlos Ricardo Soccol



Prof^a Dra. Luciana P. S. Vandenberghe

Com amor...

Para Luiza, Luiz Paulo e toda
minha família!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, apoio, incentivo incessante e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Renato Sossela de Freitas, pelas orientações e conselhos que sempre que solicitados foram cordialmente me dispensados.

À professora e amiga Dra. Luciana Vandenberghe, pelas correções e crítica das idéias deste documento.

Ao “Institut de Recherche pour le Development” (IRD), em especial ao Dr. Sevastianos Roussos e Dr. Pierre Christen, pela disponibilidade de desenvolver parte deste trabalho em seus laboratórios durante minha estada em Marselha, França.

À Mitiyo, Débora, Cristiane, Flávera, Giovana, Letícia, Cristina e demais colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela agradável convivência proporcionada diariamente durante os últimos três anos de pesquisas.

Ao Bruno, Guilherme e Juliana, na condição de estagiários, pela contribuição e seriedade dedicadas a este trabalho.

À CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 AROMAS	3
2.2 ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE AROMAS E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	4
2.3 VIAS DE PRODUÇÃO DE AROMAS	7
2.3.1 Biosíntese.....	8
2.3.2 Biotransformação	8
2.3.3 Enzimas.....	9
2.4 COMPOSTOS AROMÁTICOS PRODUZIDOS BIOTECNOLOGICAMENTE	10
2.4.1 Álcoois.....	11
2.4.2 Ésteres.....	12
2.4.3 Lactonas.....	16
2.4.4 Terpenos	17
2.5 <i>CERATOCYSTIS FIMBRIATA</i>	18
2.6 CASCA DE CAFÉ E BAGAÇO DE MANDIOCA	19
2.7 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	21
2.7.1 Variáveis do Processo de FES.....	22
2.7.2 Vantagens e Desvantagens da FES.....	25
2.7.3 Aplicações da Fermentação no Estado Sólido	25
2.8 RECUPERAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 MICRORGANISMOS.....	32
3.1.1 Manutenção das Cepas	33
3.1.2 Preparo do Inóculo	33
3.2 SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS	33
3.2.1 Preparo dos Substratos.....	34
3.2.2 Caracterização Físico-Química	35
3.3 SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS	35
3.4 ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO	36
3.5 FERMENTAÇÃO EM BIORREATORES TIPO COLUNAS	38
3.5.1 Equipamento de Incubação Estático para FES.....	39
3.6 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR EM ESCALA SEMI-PILOTO	40
3.7 ANÁLISE DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS	42
3.7.1 Quantificação dos Voláteis Produzidos	42
3.7.2 Identificação dos Compostos	43
3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS	44
3.8.1 Determinação do pH.....	44
3.8.2 Determinação da Umidade Final.....	44
3.8.3 Determinação de Açúcares Redutores e Totais	45
3.8.4 Determinação da Biomassa Produzida	45
3.8.5 Análise Respirométrica.....	45
3.9 RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS POR ADSORÇÃO	51
3.10 CONDENSAÇÃO DIRETA EM N ₂ LÍQUIDO	52

3.11	ENCAPSULAMENTO DOS AROMAS	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	55
4.2	SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS	55
4.3	OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM FRASCOS	58
4.4	EFEITO DA LUMINOSIDADE SOBRE A PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS	61
4.5	FERMENTAÇÃO EM COLUNAS AERADAS	61
4.6	FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR	71
4.7	RECUPERAÇÃO DE AROMAS POR ADSORÇÃO	74
4.8	RECUPERAÇÃO DE AROMAS POR CONDENSAÇÃO DIRETA EM “TRAP” CRIOGÊNICO	76
4.9	ENCAPSULAMENTO DE AROMAS POR “SPRAY-DRYING”	77
5	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DAS CEREJAS DE CAFÉ PELAS VIAS SECA E ÚMIDA.....	19
FIGURA 2: FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DE RAÍZES DE MANDIOCA.....	20
FIGURA 3: MICROFOTOGRAFIA DO CULTIVO EM LÂMINA SOBRE PDA DO FUNGO <i>C. FIMBRIATA</i> CBS 374.83.....	32
FIGURA 4: DESENHO ESQUEMÁTICO DE EQUIPAMENTO DE INCUBAÇÃO EM COLUNAS AERADAS.....	40
FIGURA 5A: BIORREATOR CILÍNDRICO COM CAPACIDADE PARA 3 KG DE CASCA DE CAFÉ UTILIZADO PARA FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	41
FIGURA 5B: ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR E DISPOSITIVOS AUXILIARES.....	41
FIGURA 6: CURVA PADRÃO DE ETANOL OBTIDA NO INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO DE 0 A 20 $\mu\text{L/L}$	43
FIGURA 7: APARATO DE DESSORÇÃO PARA COLUNAS ADSORVENTES.....	51
FIGURA 8: SISTEMA DE CONDENSAÇÃO DIRETA DOS VOLÁTEIS.....	52
FIGURA 9: SPRAY-DRIER UTILIZADO NA SECAGEM DOS AROMAS ENCAPSULADOS.....	53
FIGURA 10: EVOLUÇÃO DOS VOLÁTEIS TOTAIS PRODUZIDOS POR CBS374.83 SOBRE A CASCA E POLPA DE CAFÉ COM E SEM TRATAMENTO TÉRMICO.....	56
FIGURA 11: EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CO_2 E CONSUMO DE O_2 POR <i>C. FIMBRIATA</i> CBS 374.83 SOBRE CASCA DE CAFÉ EM FES EM FRASCOS.....	57
FIGURA 12: EVOLUÇÃO DOS VOLÁTEIS TOTAIS PRODUZIDOS POR CBS146.53 SOBRE A CASCA E POLPA DE CAFÉ COM E SEM TRATAMENTO TÉRMICO.....	58
FIGURA 13: DIAGRAMA DE EFEITOS DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO 2^{41} PARA EXPERIMENTOS EM FRASCOS ERLNMEYER.....	59
FIGURA 14: CINÉTICA DO CULTIVO EM FRASCOS DE <i>C. FIMBRIATA</i> SOBRE CASCA DE CAFÉ EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PH E CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE.....	60
FIGURA 15: CULTIVO EM FRASCOS DE <i>C. FIMBRIATA</i> SOBRE CASCA DE CAFÉ EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE.....	61
FIGURA 16: DIAGRAMA DE EFEITOS DE PARETO PARA PLANEJAMENTO 2^3 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	62
FIGURA 17: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO 3^2 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	63
FIGURA 18: FES EM COLUNAS COM CASCA DE CAFÉ COM E SEM LEUCINA.....	65
FIGURA 19A: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS E BIOMASSA, CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	67
FIGURA 19B: EVOLUÇÃO DA VARIAÇÃO DE UMIDADE, PH E ATIVIDADE DE ÁGUA EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	68
FIGURA 20: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE CO_2 E CONSUMO DE O_2 NA SAÍDA DA COLUNA DE FERMENTAÇÃO.....	69
FIGURA 21: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA E DAS CONCENTRAÇÕES DE CO_2 E DE O_2 NA SAÍDA DA COLUNA DE FERMENTAÇÃO.....	71
FIGURA 22A: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE AROMAS, TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES E BIOMASSA DURANTE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR CILÍNDRICO.....	72
FIGURA 22B: EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA, TEOR DE UMIDADE E PH DURANTE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR CILÍNDRICO.....	72

FIGURA 23: EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ E O ₂ DURANTE FES DE <i>C. FIMBRIATA</i> EM BIORREATOR.....	74
FIGURA 24: RECUPERAÇÃO DE VOLÁTEIS POR ADSORÇÃO DURANTE FES POR <i>C. FIMBRIATA</i> SOBRE CASCA DE CAFÉ.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DE MATERIAIS ADSORVENTES UTILIZADOS PARA RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	28
TABELA 2: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^{+1}	37
TABELA 3: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^2	38
TABELA 4: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^3 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	38
TABELA 5: TEMPOS DE RETENÇÃO PARA COMPOSTOS PADRÕES.....	43
TABELA 6: COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS.....	55
TABELA 7: ANOVA PARA PLANEJAMENTO 3^2 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO.....	63
TABELA 8: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM 30% DE GLUCOSE.....	64
TABELA 9: COMPOSIÇÃO DO “HEADSPACE” DO CULTIVO DE <i>C. FIMBRIATA</i> EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM 30% DE GLUCOSE COM E SEM LEUCINA.....	66
TABELA 10: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	67
TABELA 11: PARÂMETROS CINÉTICOS ESTIMADOS EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	70
TABELA 12: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM BIORREATOR.....	73
TABELA 13: COMPOSTOS RECUPERADOS POR ADSORÇÃO EM DISTINTOS MATERIAIS DURANTE FERMENTAÇÃO EM COLUNAS PELO FUNGO <i>C. FIMBRIATA</i> SOBRE A CASCA DE CAFÉ.....	75
TABELA 14: COMPOSTOS RECUPERADOS POR CONDENSAÇÃO EM DISTINTOS MATERIAIS DURANTE FERMENTAÇÃO EM COLUNAS PELO FUNGO <i>C. FIMBRIATA</i> SOBRE A CASCA DE CAFÉ.....	76
TABELA 15: COMPOSTOS PRESENTES NO “HEADSPACE” DO PÓ OBTIDO POR ATOMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO CONTENDO OS VOLÁTEIS PRODUZIDOS EM COLUNAS.....	77

RESUMO

A agroindústria do café gera subprodutos como a casca de café em grandes quantidades. Esses resíduos constituem um grave problema ambiental uma vez que são pouco aproveitados. Neste trabalho foram testados resíduos da agroindústria do café com o objetivo de produzir aromas com características frutais via fermentação no estado sólido (FES). A produção de aromas por FES foi estudada em diferentes sistemas. Na fase inicial do trabalho, o fungo *Ceratocystis fimbriata* foi cultivado em sistema estático sem aeração em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Este estudo possibilitou a seleção do melhor substrato e da melhor cepa. Numa etapa seguinte, foram otimizadas as variáveis do processo como umidade, pH, adição de glucose e complementação com solução salina. A otimização das variáveis físicas e nutricionais do processo foi realizada através de uma técnica baseada no emprego de planejamento de experimentos. A produção de aromas em sistema aerado tipo colunas de fermentação foi estudada através do cultivo do fungo sob distintas taxas de aeração. Um biorreator cilíndrico tipo tambor horizontal projetado e desenvolvido no Laboratório de Processos Biotecnológicos foi utilizado para produção de aromas em escala semi-piloto por *Ceratocystis fimbriata* em FES. A casca de café mostrou-se um substrato sólido adequado para a produção de aromas frutais. O melhor resultado foi obtido no cultivo de *C. fimbriata* em casca de café suplementada com 30% de glucose ou equivalente de solução de melaço de cana-de-açúcar, com 65% de umidade inicial e pH igual a 6,0. Foram detectados doze compostos através da análise do “headspace” por cromatografia gasosa. Identificaram-se nove compostos entre os quais etanol, acetaldeído, acetato de etila e isoamil acetato. A maior concentração de voláteis totais obtida em colunas foi 32 $\mu\text{mol/L/gMS}$. Em experimentos no biorreator atingiu-se a concentração de 145 $\mu\text{mol/L/gMS}$. Acetato de etila foi o composto detectado em maior quantidade. A sua presença e a de outros ésteres caracterizaram o aroma frutal dos cultivos. Estudos através da análise respirométrica do microrganismo revelaram que a produção de voláteis é parcialmente associado ao crescimento microbiano. Os compostos voláteis produzidos foram recuperados utilizando diferentes técnicas. Realizou-se a adsorção em carvão ativado e em resinas Amberlite XAD2 e Tenax durante a fermentação em colunas. O melhor resultado referente à recuperação dos voláteis foi obtido com a resina Tenax, com a qual recuperou-se 67,2 $\mu\text{mol/L/h}$ de voláteis totais. Com a condensação direta dos voláteis em “trap” criogênico, recuperou-se 1095,51 $\mu\text{mol/L/h}$. Com a técnica de recuperação de voláteis microencapsulados por secagem em “spray-drier” obteve-se uma concentração de 8,29 $\mu\text{mol/L}$.

ABSTRACT

Coffee husk is an agro-industrial residue of the Brazilian agriculture industrialization of coffee. This residue constitutes a serious environmental problem due to its inefficient utilization. In this work, the production of fruity aromas by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation, using coffee husk as substrate, was studied. The results showed the feasibility of using coffee husk as substrate to produce fruity aroma. In order to test the influence of the process parameters on the culture to produce volatile metabolites, statistical experimental designs were performed. The parameters studied were pH, addition of glucose, initial water content and salt solution. At the beginning, the experiments were performed in Erlenmeyer flasks filled with coffee husk at 30 °C, with 30% of glucose, 65% of initial water content and pH 6.0. Twelve compounds have been separated by gas chromatography headspace analysis and nine were identified, among them: ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate and isoamyl acetate. The major volatile compound in the headspace was ethyl acetate. Total volatiles concentration reached 32 $\mu\text{mol/L/g}$. Using the bioreactor, the concentration was 145 $\mu\text{mol/L/g}$. *Ceratocystis fimbriata* cultivated on coffee husk displayed a fruity odour due to the production of considerable amounts of isoamyl acetate and ethyl acetate. It was observed a relation between the respirometric activity of *Ceratocystis fimbriata* and the volatiles production. The volatiles metabolites released by the culture columns containing coffee husk, were trapped on adsorbent tubes packed with activated carbon, Amberlite XAD2 and Tenax. The total amount of volatiles recuperated by adsorption reached a concentration of 67.2 $\mu\text{mol/L/h}$ using Tenax. Using a cryogenic trap for directed condensation of the volatile compounds, 1095.51 $\mu\text{mol/L/h}$ of volatile compounds were obtained. The maximum concentration of total volatile by microencapsulation was 8.29 $\mu\text{mol/L}$.

1 INTRODUÇÃO

Os componentes de um aroma são obtidos tradicionalmente pela extração de matérias-primas vegetais ou por síntese química. A indústria de alimentos, influenciada pela preocupação do consumidor em relação às características nutricionais de sua dieta e pela procura por aditivos naturais, vem estudando como alternativa a produção biotecnológica de aromas com a utilização de microrganismos e/ou enzimas (CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUIA, 1994; CHEETAM, 1996).

O aumento na utilização de aromatizantes direciona as empresas de alimentos à procura de fontes de produção alternativas. As rotas convencionais de síntese química e o isolamento de plantas continuam sendo viáveis, mas a produção biotecnológica se desenvolve como opção atrativa, pelo fato dos aromas serem considerados substâncias naturais nas legislações dos Estados Unidos e da Comunidade Européia. Além disto, os aromas produzidos por microrganismos e/ou enzimas oferecem vantagens em relação à extração tradicional: alta especificidade dos produtos finais, garantia de suprimento durante todo o ano e a possibilidade de utilização de matérias-primas alternativas, como por exemplo resíduos industriais.

Outra justificativa para o desenvolvimento de pesquisas que tornem viáveis a produção biotecnológica de aromas é a riqueza de matérias orgânicas e resíduos da agroindústria do café e seu potencial poluente. O Brasil é o primeiro produtor mundial de café: 28,14 milhões de sacas de 60 quilos beneficiadas na safra de 2001/2002. A safra de 2002/2003 é estimada em 44,69 milhões de sacas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2002). Como no caso de outras atividades industriais, o beneficiamento dos grãos de café gera quantidades consideráveis de resíduos. Segundo dados fornecidos por indústrias beneficiadoras de café, a cada 40 kg de café cereja originam-se 19 kg de polpa, confirmando dados apresentados por ROUSSOS *et al.* (1995) e MASSON *et al.* (1984), especificando que 50% do peso do café é resíduo (polpa) gerado no processamento dos grãos de café por via úmida. No processo adotado no Brasil, a via seca, também é gerada grande quantidade de subprodutos sendo que as cascas constituem

50% do fruto (SILVA *et al.*, 2000). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se utilizar estes resíduos como substratos para processos biotecnológicos e ao mesmo tempo solucionar problemas ambientais (SOCCOL, 2001). Na tentativa de se agregar valor ou biotransformar os resíduos da industrialização do café, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da UFPR. Através da fermentação no estado sólido (FES) são produzidas biomoléculas de interesse comercial, fungos comestíveis, hormônios vegetais e ácidos orgânicos. Biotransformando os compostos tóxicos do resíduo do café, pode-se utilizá-lo diretamente na alimentação animal (BRAND *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2001; MACHADO, 2002).

O objetivo geral do presente trabalho foi utilizar a casca de café (*Coffea arabica*) como substrato sólido na biosíntese de aromas frutais naturais pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* por fermentação no estado sólido.

Dentre os objetivos específicos do trabalho estão: caracterizar e quantificar dos metabólitos voláteis que constituem o aroma frutal; explorar o potencial da casca de café como substrato para biosíntese de aromas; utilizar diferentes técnicas para a recuperação dos compostos voláteis; produzir aromas por FES em biorreatores tipo colunas aeradas e em biorreator em escala semi-piloto; estudar o comportamento respirométrico do fungo *Ceratocystis fimbriata* durante a produção de aromas e a recuperar os compostos voláteis por adsorção, condensação e encapsulamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AROMAS

BERGER (1995) define aroma como a combinação das sensações de sabor e odor produzidas por uma substância ingerida. A sensação de odor é desencadeada por misturas complexas de moléculas de várias classes químicas e que, mesmo em traços de concentração, são detectadas por células receptoras do epitélio olfativo dentro da cavidade nasal. Os mensageiros do sentido do sabor interagem com receptores localizados na língua, identificando quatro impressões básicas: doce, salgado, ácido e amargo. Também percebidas na cavidade oral, mas transmitidos para o cérebro por neurônios não específicos e trigeminal, são as sensações de pungência, frio e quente. O aroma é definido por CHRISTEN (1995) como a fração volátil percebida por receptores localizados nas fossas nasais. O aroma é uma percepção olfato-gustativa. Os compostos odoríferos, designados por aromas, são moléculas orgânicas de baixo peso molecular (inferior a 400 Daltons), cuja tensão de vapor à pressão atmosférica e à temperatura ambiente é suficientemente alta para que estas moléculas encontrem-se na atmosfera parcialmente no estado de vapor e possam, através do contato com a mucosa olfativa, provocar um estímulo (RICHARD & MULTON, 1992).

Aromas e fragrâncias são muito importantes para as indústrias. A diferença entre as definições sugere que fragrância é o termo reservado a compostos voláteis com aplicações nas indústrias de perfumes e cosméticos, enquanto que aromas são aplicados exclusivamente em alimentos (JANSSENS *et al.*, 1988).

Um componente aromático dificilmente encontra-se puro num alimento, normalmente faz parte de uma mistura complexa de moléculas voláteis que interagem entre si; apesar disto, em certos casos a impressão é de que existe uma substância predominante, como por exemplo a vanilina (baunilha) e o benzaldeído (amêndoa) (OHLOFF, 1977). TRESSL & JENNINGS (1972) identificaram os principais constituintes do aroma de banana: acetato de etila, etanol, acetato de propila, acetato de isobutila, butirato de etila,

butirato de isobutila, 3-metil-butil acetato (acetato de isoamila), entre outros.

A intensidade e a qualidade de um aroma não são necessariamente determinados pelos componentes presentes nas maiores concentrações. O olfato humano é bastante sensível. Alguns compostos podem ser detectados em concentrações molares de 10^{-18} (MONTEIRO, 1984). O limiar de percepção de uma substância é denominado “threshold”, sendo chamado de absoluto, quando o provador percebe algum sabor ou odor mas não consegue identificá-lo, ou de reconhecimento, quando a diferença percebida é descrita. Somente pode ser considerada como substância aromática aquela cuja concentração no alimento é superior ao seu “threshold” absoluto. Não é correto afirmar que um composto quimicamente puro possui lugar privilegiado numa mistura de constituintes aromáticos unicamente porque seu “threshold” em solução aquosa a 20°C é mais baixo do que o dos demais constituintes da mistura. Este valor mínimo de percepção absoluta nos alimentos depende de diversos fatores: da pressão de vapor dos compostos voláteis, da temperatura do alimento, de sua composição e das interações dos aromas com lipídios, proteínas e carboidratos, os quais afetam diretamente a dispersão destes na fase gasosa. Portanto, o “threshold” deve ser analisado com bastante prudência, percebendo-se nestes dados indicações de ordem de grandeza (RICHARD & MULTON, 1992).

2.2 ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE AROMAS E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Aromas e fragrâncias são extremamente importantes para as indústrias de alimentos, rações, cosméticos, produtos farmacêuticos e químicos. A maioria dos aromas disponíveis no mercado são produzidos por síntese química (84%) ou extração de óleos essenciais e aromas a partir de plantas.

Milhares de toneladas por ano de aromas não-voláteis, tais como adoçantes e acidulantes, são produzidos por via biotecnológica, enquanto bioprocessos para obtenção de compostos voláteis vêm sendo utilizados há pouco tempo. Processos em maior escala estão

operando para produzir alguns compostos como ésteres carboxílicos e benzóicos, incluindo lactonas e vanilina (CHEETHAM, 1996).

A biotecnologia oferece muitas vantagens em relação à extração tradicional (a partir de plantas) para a produção de aromas:

- os produtos podem ser legalmente reconhecidos como naturais;
- os produtos finais apresentam alta especificidade;
- o suprimento é garantido, porque o processo não fica submetido às safras, às variações no tempo (que influenciam de maneira significativa a qualidade do aroma e o seu rendimento) e aos problemas econômicos/políticos do país;
- permite trabalhar com matérias-primas alternativas, como resíduos de indústrias alimentícias.

Apesar de existirem diferentes processos microbiológicos capazes de produzir aromas, o número de aplicações comerciais continua limitado, pois os baixos rendimentos inviabilizam sua aplicação. O fato de um determinado meio de cultivo apresentar forte e agradável aroma não implica necessariamente que aquele microrganismo seja capaz de produzir em grande escala. Além disso, a recuperação dos compostos representa outra etapa delicada. Contudo, isto é compensado pelo preço dos compostos aromáticos naturais que é de 10 a 100 vezes mais alto do que o de aromas sintéticos. Segundo WELSH *et al.* (1989), a produção industrial de uma substância aromática por microrganismos só é economicamente viável se o valor de mercado estiver entre duzentos e quinhentos dólares/kg.

A obtenção de aromas naturais também apresenta problemas de custo e de produção. Determinados óleos e compostos aromáticos puros, isolados de plantas, estão disponíveis a preços acima de cinco mil dólares o quilo. Por exemplo, a 4-decalactona sintética, aroma de impacto em pêssegos, custa aproximadamente cento e cinquenta dólares/kg, enquanto que a mesma substância extraída de fonte natural custa seis mil dólares/kg. Outra desvantagem da utilização de plantas como fontes naturais de aromas é a forte dependência de fatores dificilmente controláveis, como a influência do tempo e o risco

de doenças. Certos países apresentam restrições à importação de plantas e materiais provenientes de regiões tropicais ou subtropicais, devido à instabilidade política destas regiões e pelo risco da transmissão de pragas/doenças (JANSSENS *et al.*, 1992).

Um inconveniente envolvendo a aplicação comercial da biotecnologia é a volatilidade e baixa polaridade de alguns compostos aromáticos, o que dificulta a separação do meio de cultivo. Devido aos efeitos inibitórios e tóxicos que certas substâncias acarretam aos microrganismos, é importante manter a concentração das mesmas em baixos níveis no meio de cultivo. Além disto, novos produtos devem ser analisados por entidades governamentais antes de serem reconhecidos como naturais e este procedimento pode ser demorado, encarecendo-os.

JANSSENS *et al.* (1992) citam processos biotecnológicos industriais já utilizados por grandes empresas na produção de aromas. Alguns exemplos são: a produção de 4-decalactona, que envolve a bioconversão do óleo de rícino, composto por 80% de ácido ricinoléico, pela levedura *Yarrowia lipolytica*, com rendimento de 6 g/L; o uso na Inglaterra de fermentadores de 30 mil litros na produção de (R)- δ -dodecanolida, aroma de manteiga, que é empregado na fabricação de margarinas; ácido butírico e butirato de etila produzidos microbiologicamente, pois *Clostridium butyricum* converte glicose em condições anaeróbicas a ácido butírico, em concentrações que atingem 1% a 2 % do meio de cultivo; a esterificação com etanol originando butirato de etila, um importante aroma frutal obtido com custo de produção biotecnológica da ordem de cento e oitenta dólares/kg, enquanto que o isolamento deste composto a partir do suco de frutas tem o custo de cinco mil dólares/kg. O butirato de etila produzido sinteticamente custa somente quatro dólares/kg.

O significado do termo “natural” varia entre países. No Brasil, os aromas estão sob responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As condições gerais de elaboração, classificação e designação de aromatizantes são contempladas no Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas - Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999. Os aromas são substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Os aromas podem ser

obtidos por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais - produtos de origem animal ou vegetal - normalmente utilizados na alimentação humana. Contêm substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimático, etc.). São classificados como aromatizantes/ aromas naturais e compreendem:

- Óleos essenciais;
- Extratos;
- Bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas;
- Substâncias aromatizantes/ aromas isolados.

Nos Estados Unidos, o termo “aroma natural” inclui não somente os derivados de vegetais e animais, mas também aqueles obtidos por processos fermentativos e enzimáticos. Segundo a “Food and Drug Administration” (FDA), o aroma natural deve ser produzido a partir de matérias-primas naturais e o produto final deve ser idêntico àquele encontrado na natureza (ARMSTRONG *et al.*, 1989). Quando o aroma for produzido por microrganismos, estes devem estar reconhecidos na FDA como seguros ao consumo ou GRAS (“Generally Recognized As Safe”) (ARMSTRONG *et al.*, 1989).

2.3 VIAS DE PRODUÇÃO DE AROMAS

A idéia da produção de aromas via processos microbiológicos remonta da observação da produção de odores agradáveis nos meios de cultivo. O primeiro artigo publicado abrangendo este assunto foi escrito por OMELIANSKI (1923). Este autor percebeu que a qualidade aromática de um meio de cultivo evoluía com o tempo, pelo acúmulo de um metabólito ou pela degradação de metabólitos iniciais, como por exemplo a esterificação dos ácidos acético e butírico. O mesmo artigo agrupa os microrganismos como fazendo parte do que o autor especificou como “grupo dos produtores de aromas, citando diferentes pesquisadores que descreveram culturas produtoras de aromas entre 1889 e 1914.

Os microrganismos que são capazes de produzir aromas geralmente sintetizam uma variedade muito complexa de substâncias em diferentes meios de cultivo. Dentre os compostos químicos formados podem ser citados os seguintes grupos: álcoois, ésteres, lactonas, terpenos, carbonilas, ácidos, aldeídos e cetonas.

Os processos biotecnológicos envolvidos na síntese de compostos aromáticos podem ser classificados em dois grupos: microbiológicos e enzimáticos. Os métodos microbiológicos são subdivididos em biosíntese e biotransformação; o primeiro refere-se à produção de compostos químicos através de células (fermentação ou metabolismo secundário), enquanto que a biotransformação refere-se ao uso de células microbianas na execução de modificações específicas ou interconversões de estruturas químicas (WELSH *et al.*, 1989).

2.3.1 Biosíntese

A biosíntese de aromas também é conhecida como síntese *de novo*, e significa produção de aromas pela fermentação de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos. Microrganismos são produtores potenciais de substâncias aromáticas e a formação destes compostos foi elucidada por GROSS & ASTHER (1989):

- determinados compostos odoríferos apresentam ação anti-fúngica, favorecendo a competição do microrganismo frente a outros;
- em certos casos os compostos aromáticos são indutores de germinação, crescimento de micélio ou frutificação;
- a síntese destes metabólitos pode ser feita a partir de substâncias nocivas ao próprio microrganismo, com a função de detoxificação do meio.

2.3.2 Biotransformação

A partir de substratos específicos, diferentes reações são executadas por microrganismos na produção de aromas, tais como: oxidação, redução, reações hidrolíticas, formação de novas ligações C-C e reações de degradação. Terpenos são os principais

substratos estudados nessas bioconversões.

A biotransformação de compostos pode ter duas finalidades (ARMSTRONG *et al.*, 1989): a transformação de determinadas substâncias de baixo valor comercial em aromas. Por exemplo, a habilidade do fungo *Aspergillus niger* em converter a naringina, componente encontrado no suco de frutas cítricas responsável pelo sabor amargo, em naringenina, sua forma sem amargor; e o aumento nos rendimentos, resultando produtos finais opticamente ativos, como na produção de L-mentol. Em 1989, o mercado deste terpeno era de aproximadamente 3 mil toneladas por ano e dependia da extração tradicional de tecidos vegetais, os quais apresentam rendimento de 40% na conversão de L-mentona a L-mentol. Como alternativa, vem sendo proposta a extração da L-mentona da planta que seria posteriormente convertida, através da atividade de desidrogenases de diferentes microrganismos (como a bactéria *Pseudomonas putida* e a levedura *Rhodotorula minuta*). Este sistema apresenta resultados de conversão de 100% de L-mentol opticamente ativo (ARMSTRONG *et al.*, 1989; JANSSENS *et al.*, 1992).

Ésteres de cadeia curta também podem ser produzidos pela bioconversão de um precursor apropriado, como etanol por exemplo. O óleo de fúsel, composto basicamente de 3-metilbutanol, 2-metilbutanol e isobutanol, pode ser transformado pela levedura *Hansenula mrakii*, nos acetatos correspondentes com rendimentos elevados, por exemplo 90% para o 3-metilbutil acetato (JANSSENS *et al.*, 1992).

2.3.3 Enzimas

Os processos enzimáticos utilizados na obtenção de aromas envolvem a hidrólise de determinados compostos, porém, sem o desenvolvimento microbiano. Por exemplo, a maturação forçada de queijos com a adição de enzimas bacterianas faz com que um queijo, que normalmente demoraria um ano para desenvolver seu aroma, mature em seis semanas.

Os fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas usadas para hidrolisar a parede celular das plantas e liberar o conteúdo desta. Esta extração enzimática elimina a

necessidade do processamento térmico, o qual destrói ou altera os componentes aromáticos. Pectinase, celulase e hemicelulase de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* são as enzimas mais comumente utilizadas para aumentar a eficiência da extração durante o processamento da fruta, do vegetal, do cereal ou do suco (ARMSTRONG *et al.*, 1989).

Faz-se necessária a distinção entre as pesquisas que visam obter produtos complexos, com características próximas às naturais, daquelas que procuram obter moléculas isoladas. A primeira tendência consiste na tentativa de imitar a natureza e desenvolver um processo, composto de um ou mais microrganismos/ enzimas, de maneira a recriar *in vitro* um aroma complexo detectado num fruto ou numa planta. A segunda tendência busca obter o maior rendimento possível de um ou dois compostos característicos importantes que podem ser utilizados para reforçar os extratos de plantas superiores empregados usualmente. A escolha entre estes dois conceitos determina essencialmente a metodologia que será utilizada: *in vivo*, na qual um microrganismo geneticamente modificado é usado no próprio alimento que se deseja aromatizar, ou *in vitro*, obtidos através de biosíntese e bioconversões (DELEST, 1992 citado por SOARES, 1998).

2.4 COMPOSTOS AROMÁTICOS PRODUZIDOS BIOTECNOLOGICAMENTE

Os compostos organolépticos derivados de microrganismos, na sua maioria, são metabólitos produzidos em pequenas concentrações. Estes compostos possuem baixo “threshold” e são detectados cromatograficamente em partes por milhão (ppm – $\mu\text{L/L}$). Qualitativa e quantitativamente os compostos secretados pelos microrganismos são influenciados diretamente pela cepa, pela presença de atividades enzimáticas específicas, pela composição química do meio de cultivo e pelo controle do pH, da temperatura, da idade do inóculo e da atividade de água (a_w)¹ do substrato.

O aroma percebido em determinado meio de cultivo pode ser produzido durante a fase de crescimento ou na fase de esporulação, como no caso das cepas de *Trichoderma*

¹ a_w : atividade de água é a umidade relativa da atmosfera gasosa em equilíbrio com o substrato.

viride, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium decumbens*, sendo que esta última só é possível nas fermentações em estado sólido (LATRASSE *et al.*, 1985).

Além do interesse pelos aromas frutais, existem estudos para produção de aromas naturais relacionados com o sabor “tostado” ou de “carne cozida” para aplicação em microondas (ARMSTRONG *et al.*, 1989).

2.4.1 Álcoois

Álcoois desempenham papel modesto e muitas vezes indireto na composição dos aromas, mas também podem atuar como precursores de compostos, por exemplo aldeídos ou ésteres.

Diferentes álcoois são encontrados nos cultivos de leveduras, predominantemente: etanol, álcoois de óleo fúsel (propanol, isobutanol, álcool amílico e isoamílico) e fenil etil álcool. Nos cultivos de fungos filamentosos são encontrados predominantemente: metil-3-butanol, butanol, isobutanol, pentanol, hexanol, octanol-3, octen-3-ol, octen-2-ol e fenil etanol, sendo que uma parte tem origem no metabolismo de aminoácidos, como leucina, valina, isoleucina e fenilalanina (WELSH *et al.*, 1989).

Quando determinados aminoácidos são adicionados nos meios de cultivos de leveduras, estes compostos sofrem uma transaminação seguida de descarboxilação, resultando no ceto ácido e correspondente aldeído. O aldeído, por sua vez, é reduzido pela enzima álcool desidrogenase em álcool contendo um carbono a menos do que o aminoácido, sendo o propanol uma exceção (WELSH *et al.*, 1989).

SHULLER & KARGI (1992) resumem rotas metabólicas da fermentação de açúcares por bactérias, sendo que o piruvato é uma chave metabólica. Na maioria dos casos, este composto é formado a partir da glicólise, contudo, existem rotas alternativas. A mais comum destas rotas é a *Entner-Doudoroff*, importante na fermentação da glicose pela bactéria *Zyomonas*. Nesta caso, a bactéria produz um mol de adenosina trifosfato (ATP)

por mol de glicose; este baixo rendimento energético força mais glicose a ser convertida em etanol e menos à produção de biomassa. Já as leveduras utilizam a glicólise para produzir piruvato, que fornece o rendimento de 2 mol de ATP por mol de glicose.

O acetaldeído é um aldeído de baixo peso molecular que desempenha papel importante no aroma de iogurtes e de algumas frutas. O álcool 1-octen-3-ol é o composto volátil encontrado em maior quantidade em cogumelos e foi identificado no Cogumelo de Paris (*Agaricus bisporus*). Contudo, o odor de cogumelos cozidos está relacionado à presença de 1-octen-3-ona. Apesar deste ser o composto mais significativo, outros também foram identificados e parecem estar relacionados à presença de compostos alifáticos com 8 carbonos: octanol, 3-octanol, 2-octen-1-ol, 3-octanona, 1-octen-3-ona, juntamente com benzil álcool, benzaldeído, hexanol e 3-metil-butanol e ésteres dos ácidos fórmico, acético e propiônico (LATRASSE *et al.*, 1985).

2.4.2 Ésteres

Ésteres representam um importante grupo de aromas tipicamente encontrados em frutas em concentrações entre 1 e 100 ppm (JANSSENS *et al.*, 1992).

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta, como acetatos, propionatos e butiratos. Pode-se citar como exemplos o butirato de etila e o acetato de isoamila, que são encontrados nos aromas de morango e de banana (MACEDO & PASTORE, 1997).

A presença de ésteres, como acetato de etila e acetato de butila, em meios de cultivo tem sua formação admitida como tradutora de um metabolismo de detoxificação através do qual o microrganismo impede o acúmulo de compostos tóxicos, como ácidos graxos de cadeia curta e álcoois de fusel. A produção de acetatos acontece como uma forma de detoxificação do meio através da conversão de ácido acético e de álcoois superiores

(LATRASSE *et al.*, 1985).

Duas rotas metabólicas podem ser seguidas na formação de ésteres: alcoólise de compostos de Acyl-CoA e esterificação direta de um ácido orgânico. A primeira rota é percebida predominantemente em leveduras e a segunda em fungos filamentosos e bactérias (WELSH *et al.*, 1989).

Os aminoácidos de cadeia ramificada são importantes precursores da biosíntese de compostos aromáticos relacionados à maturação de algumas frutas. A reação inicial que se processa é conhecida como degradação enzimática de Strecker, porque ocorrem transaminações e descarboxilações semelhantes às que acontecem durante o escurecimento não enzimático. Diversos microrganismos, entre eles leveduras e cepas de *Streptococcus lactis*, podem modificar a maioria dos aminoácidos. Mesmo que álcoois, aldeídos e ácidos formados nestas reações estejam diretamente relacionados ao amadurecimento das frutas, os ésteres são os compostos de impacto dominante. O acetato de etila é importante no aroma de bananas, apesar de ser necessária a presença de outros compostos para compor a percepção final. O 2-metil-etil-butilato possui impacto característico à maçã (FENNEMA, 1993).

JANSSENS *et al.* (1987) identificaram e quantificaram o aroma frutal de banana produzido pela levedura *Hansenula mrakii* e pelo fungo *Geotrichum penicilliatum* em fermentação líquida de um meio sintético. No estudo desenvolvido com a levedura, concluiu-se que o aroma frutal ocorria devido à biosíntese de ésteres e álcoois. Num total de 17 compostos identificados, aqueles detectados em concentrações superiores a 50 µL/L foram: etanol, acetato de etila, isobutanol, propionato de etila, acetato de isobutila e acetato de isopentila. O nível de álcoois atingiu seu máximo no final da fase de crescimento exponencial enquanto que os ésteres foram formados na fase estacionária, sendo o acetato de etila o composto produzido em maior quantidade (4283,9 µL/L). Em ambos os estudos, foram adicionados aminoácidos precursores de ésteres frutais: valina, leucina, isoleucina e fenilalanina. Quando isoleucina foi adicionada ao meio da levedura ocorreu o aumento da produção de etil butanol e 2-metil butil acetato. No cultivo do fungo filamentoso foram

identificados 33 compostos, sendo encontrados em quantidades superiores a 50 µL/L: etanol, acetato de etila, isobutanol, propionato de etila, acetato de propila, isopentanol, isobutirato de etila, acetato de isobutila, butirato de etila, isovalerato de etila, acetato de isopentila e hexanoato de etila. O componente produzido em maior concentração foi acetato de etila (9924,1 µL/L).

Outro estudo efetuado por INOUE *et al.* (1994) cita a tolerância deste microrganismo ao acetato de etila, que pode inclusive ser utilizado como única fonte de carbono. Neste estudo, promoveu-se a comparação dos ésteres formados na produção de saquê utilizando-se duas leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula mrakii*, sendo a primeira usada industrialmente. Os ésteres formados na produção desta bebida foram predominantemente acetato de etila, acetato de isobutila, acetato de isoamila e caproato de etila, e determinaram sua qualidade. A formação destes compostos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* parece ser catalisada pela enzima álcool acetil transferase a partir de álcool e acetil CoA e as esterases não parecem contribuir na formação do éster, mas na sua hidrólise. No caso da levedura *Hansenula mrakii*, o acetato de isoamila foi sintetizado tanto a partir do álcool isoamílico e acetil CoA, pela enzima acetil transferase, quanto a partir do álcool isoamílico e do ácido acético pela reação reversa da esterase.

Acetato de etila, etanol, ácido acético e acetaldeído foram compostos produzidos em fermentação submersa e já identificados há muito tempo no metabolismo de glicose pela levedura *Hansenula anomala*, sendo que neste caso a produção de acetato de etila mostrou ser um processo aeróbico (DAVIES *et al.*, 1951).

As cepas de *Ceratocystis* são conhecidas pela produção de ésteres. LANZA *et al.* (1976) testaram a produção de acetato de: etila, butila, propila, isobutila, amila e isoamila, variando as fontes de carbono (glicose, galactose e glicerol) e de nitrogênio (uréia, leucina) e chegaram a conclusão de que o tipo de aroma percebido dependia das duas fontes, diferentemente de outros microrganismos, como por exemplo *Trichoderma viride* e outros.

COLLINS & MORGAN (1961) identificaram os ésteres sintetizados por diferentes

espécies de *Ceratocystis*: *moniliformis*, *C. major*, *C. coerulescens* e *C. fimbriata*, em fermentação submersa do meio batata dextrose, concluindo que acetato de etila e etanol foram os constituintes encontrados em maior quantidade nos destilados, exceto para a cepa de *C. fimbriata*, na qual isobutanol foi o principal constituinte. Nos cultivos com dextrose-uréia predominou um forte aroma de banana, particularmente pela presença de acetato de isoamila, também verificado naqueles contendo leucina ou isoleucina, enquanto que na combinação galactose-uréia o aroma verificado foi cítrico, devido à formação de terpenos como geranial e citronelol.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* quando cultivada em distintos meios sólidos agro-industriais como bagaço de mandioca e farelo de palma forrageira, produziu compostos com características frutais, sendo o acetato de etila o éster formado em maior concentração (MEDEIROS *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2001).

Um aroma frutal de banana também foi percebido e identificado em plantas da família das chicórias (*Erwinia caratovora* subspécie *atroseptica*), quando infectadas por microrganismos. SPINLER & DIJIAN (1991) identificaram os voláteis formados em um meio sintético similar à planta infectada. No total, foram 13 os microrganismos isolados que tinham a capacidade de produzir ésteres e álcoois e os compostos identificados foram: acetato de etila, 2-metil-1-propanol, acetoin, acetato de propila, 2- metil-1-butanol, acetato de isobutila, 2-3-butanediol, acetato de isoamila e 2- metil butil acetato, sendo que em 11 cepas a produção de ésteres ficou entre 70% e 90%. Neste estudo foram testados diferentes meios de cultivo, variando as fontes de carbono e de nitrogênio, sendo que os melhores resultados foram obtidos com meios contendo glicose, frutose ou sacarose e asparagina. A adição de leucina produziu acetato de isoamila, correspondendo à degradação do aminoácido, seguindo a rota de Erlich.

O beiju é uma massa de mandioca naturalmente fermentada, com características frutais, usada pelos índios e caboclos no Maranhão, Norte do Brasil, para a produção de uma bebida alcoólica típica: a tiquira. A população microbiológica identificada por PARK *et al.* (1982) variou entre 6×10^5 e $1,9 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias, englobando

predominantemente *Aspergillus niger* e *Paecilomyces* sp, em quantidades moderadas *Rhizopus delemar* e em menor número *Neurospora* sp.

YOSHIZAWA *et al.* (1988) identificaram os voláteis produzidos pela cepa de *Neurospora*, isolada por PARK *et al.* (1982), em fermentação submersa: etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila (caproato de etila) e acetoin. YAMAUCHI *et al.* (1989) avaliaram os efeitos das fontes de carbono, nitrogênio e da adição de solução salina no tipo de aroma. Não houve alterações significativas na composição do aroma. Foi identificado 1-octen-3-ol nos cultivos, aroma típico de cogumelos, o que também foi reportado por PASTORE *et al.* (1994). Atingiu-se as seguintes concentrações: acetato de etila 0,9 ppm, etanol 111 ppm, acetato de isoamila 117 ppm, hexanoato de etila 16 ppm e 1-octen-3-ol 50 ppm.

2.4.3 Lactonas

As lactonas são encontradas em diversos alimentos, por exemplo, em: damasco, côco, café, mel, produtos lácteos, laranja, pêssego e pipoca (MAGA, 1976). Estes compostos são particularmente interessantes por possuírem propriedades sensoriais marcantes e agradáveis e por terem a síntese microbiológica bem conhecida.

Alguns microrganismos, como *Ceratocystis moniliformis*, *Trichoderma viride*, *Sporobolomyces odorus* e certas espécies de *Candida* têm sido reportados como produtores de lactonas. Contudo, os rendimentos ainda são baixos (mg/L) sendo exceção a produção *in situ* de lactonas em produtos lácteos.

Sporobolomyces odorus é uma levedura que produz γ -decalactona, substância com aroma característico de pêssego. LEE & CHOU (1994) verificaram que a adição de 3% de óleo de rícino no meio de cultivo aumentou a produção desta lactona em seis vezes, atingindo o rendimento de 8,62 mg/L.

Entre as lactonas, a 6-pentil- α -pirona (6-PP) apresenta propriedades aromáticas

interessantes. É uma molécula com forte odor de côco e está presente entre os componentes dos aromas de pêssegos e nectarinas. A produção de 6-PP por *Trichoderma harzanium* sobre bagaço de cana-de-açúcar impregnado de um meio de cultura foi estudado por SARHY-BAGNON (1999), como alternativa à produção em cultura submersa. Obteve-se concentrações de 6-PP, 17 vezes superiores e sem a necessidade de se recorrer a processos de recuperação onerosos.

2.4.4 Terpenos

Monoterpenos são produtos predominantemente derivados do metabolismo secundário de plantas, de alguns animais e microorganismos. Terpenos, tais como linalol, geraniol, nerol, citronelol, geranial e neral foram identificados em cultivos de *Ceratocystis variospora*, *C. moniliformis* e *Trametes odorata*. Possuem freqüentemente propriedades de impacto e podem ser identificados facilmente por uma pessoa treinada. Os monoterpenos citral e limoneno apresentam aromas de limão e laranja lima, respectivamente.

Iononas e damasconas são compostos terpênicos cíclicos. α -Ionona pode ser encontrada em óleos naturais de frutas, como framboesa, e em perfumes de rosa. α e β - damascona possuem estruturas parecidas a iononas; contudo as primeiras possuem aroma mais frutal, enquanto que as segundas floral (WELSH *et al.*, 1989).

LANZA *et al.* (1976) esclareceram que a síntese de monoterpenos por *Ceratocystis moniliformis* segue a rota metabólica do mevalonato, como em plantas superiores. A qualidade e a intensidade dos aromas estão relacionadas com a fonte inorgânica de nitrogênio, variando quando glicina ou metionina são adicionadas.

Ceratocystis variospora foi estudado por Collins e Halim e os seguintes monoterpenos foram identificados: linalol, citronelol, geranial, neral, geraniol, nerol e alfa-terpinol (HUBBALL & COLLINS, 1978).

A levedura *Kluyveromyces lactis* é capaz de produzir monoterpenos como citronelol e linalol, em concentrações na ordem de 50 µg/L, usando a asparagina como fonte de nitrogênio (DRAWERT & BARTON, 1978). Fungos filamentosos como *Ceratocystis moniliformis* produzem terpenos em concentrações de 30 mg/L (nerol), 130 mg/L (geraniol) e 200 mg/L (citronelol) (WELSH *et al.*, 1989).

O baixo rendimento dos terpenos produzidos microbiologicamente e a abundância de fontes vegetais fazem com que o desenvolvimento de processos fermentativos seja, do ponto de vista econômico, desnecessário. Contudo, o verdadeiro valor destas pesquisas está no conhecimento das etapas do catabolismo terpênico, que permitirá a biotransformação de precursores sem valor em terpenos de maior valor comercial, como no caso do mentol.

2.5 CERATOCYSTIS FIMBRIATA

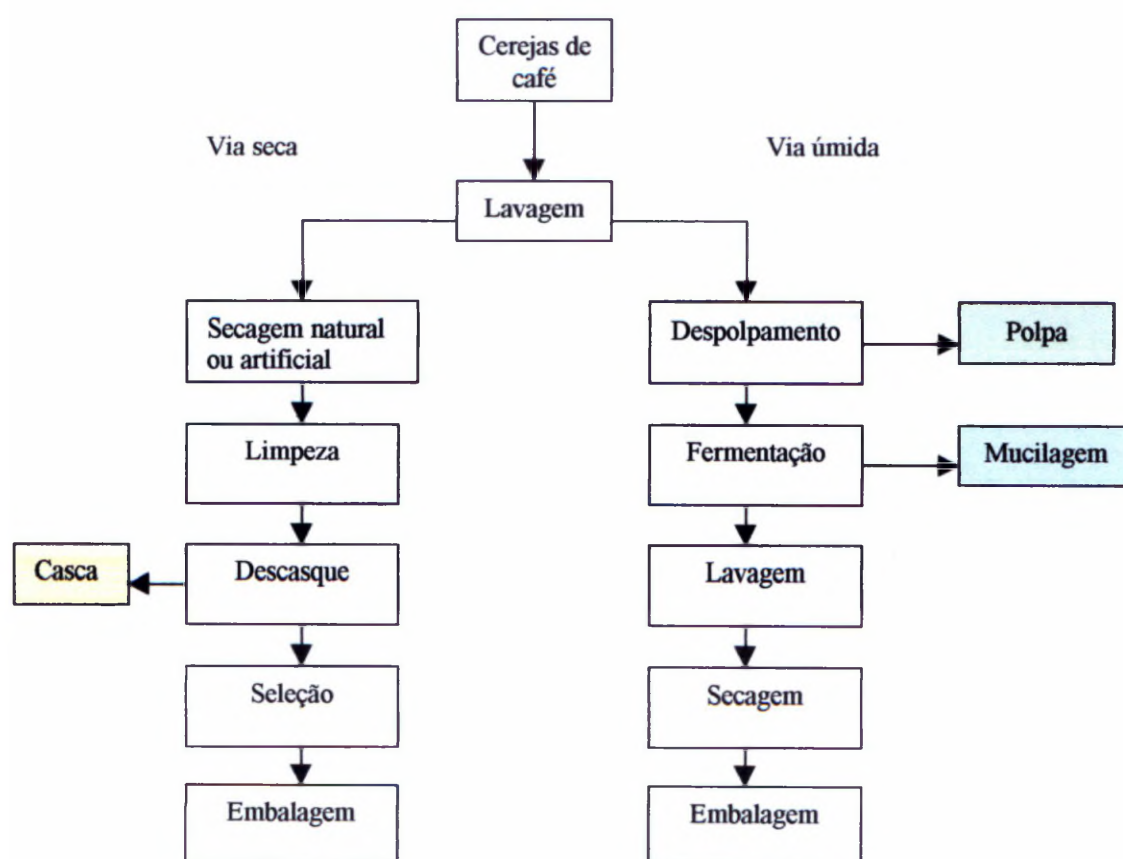
São fungos filamentosos, ascomicetos, pertencentes à família *Ophistomaceae*, classe *Phycomycetes*, ordem *Sphaeriales*. As espécies *fimbriata* e *moniliformis* vêm sendo estudadas por serem produtoras de aromas frutais (SENEMAUD, 1988; CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; CHRISTEN *et al.*, 1997; BRAMORSKI *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000) e se destacam na produção de terpenos e ésteres, responsáveis por aromas de banana, laranja, gerânio e rosa. Entre os compostos identificados por LANZA *et al.* (1976), destacam-se geraniol, nerol, linalol, citronelol, geranial e neral. Culturas selecionadas quando cultivadas em meios sintéticos produzem aromas frutais, variáveis conforme a fonte de carbono utilizada.

De todas as espécies de *Ceratocystis*, a espécie *fimbriata* parece ser particularmente interessante devido ao seu crescimento relativamente rápido (5 dias) e à variedade de aromas produzidos (SENEMAUD, 1988).

2.6 CASCA DE CAFÉ E BAGAÇO DE MANDIOCA

A casca de café é o principal resíduo gerado pela via seca do processamento das cerejas de café (Figura 1). Durante o processamento das cerejas de café, somente 5,8% do peso da cereja fresca é aproveitada no produto final do café consumido como bebida; os 94,2% restantes constituem subprodutos resultantes do processamento. O pequeno reaproveitamento dos resíduos gerados acarreta em aumento da poluição ambiental (PERRAUD, 1996). A polpa de café constitui, juntamente com as águas de lavagem e degomagem do grão de café, um dos principais resíduos do processamento pela via úmida. Assim como a casca de café, toneladas deste resíduo são descartados e depositados em locais próximos às áreas de industrialização do café.

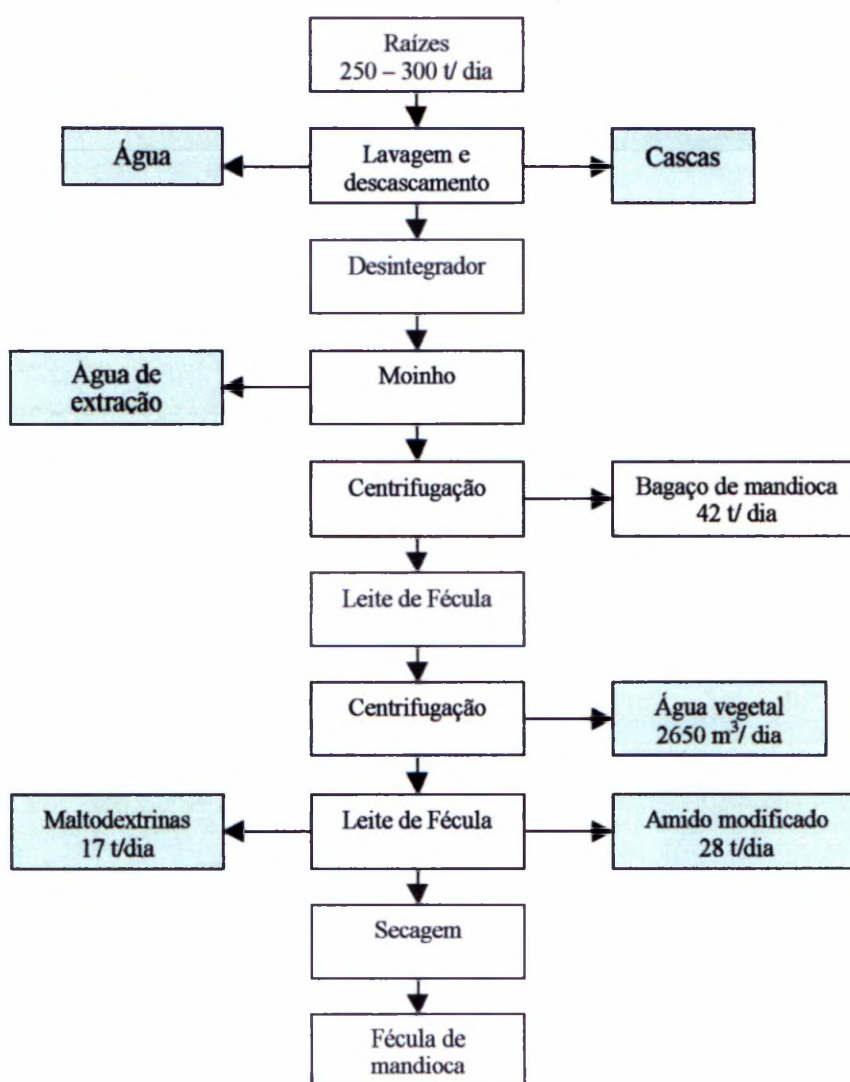
FIGURA 1: FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DAS CEREJAS DE CAFÉ PELAS VIAS SECA E ÚMIDA



Fonte: CLARKE & MACRAE (1985)

O bagaço de mandioca é gerado durante a etapa de separação da fécula de mandioca, que é um resíduo sólido composto por parte da fécula não extraída e fibras (Figura 2).

FIGURA 2: FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DE RAÍZES DE MANDIOCA



Fonte: MACHADO, (2002)

O resíduo gerado em grande quantidade (930 kg/ t de mandioca processada) é seco e apenas uma pequena parte é reaproveitado como ração animal, substituto de combustível, compostagem ou adubo orgânico. O bagaço de mandioca é rico em amido

(40% a 70%) e fibras e possui em média 0,85% de proteínas, 0,94% de açúcares redutores e 1,65% de cinzas. Diante desta composição e da grande quantidade gerada, várias pesquisas vêm sendo realizadas visando desenvolver tecnologias de aproveitamento do bagaço e a obtenção de produtos de elevado valor agregado (MEDEIROS, 1998; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; MACHADO, 2002).

2.7 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação no estado sólido (FES) é definida como uma fermentação na qual o crescimento de microrganismos ocorre em substratos sólidos na ausência de água livre (RAIMBAULT & ALAZARD, 1980; AIDOO *et al.*, 1982; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003). O material sólido utilizado em FES é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa, permitindo a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A água, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida no suporte sólido, podendo também encontrar-se ligada (água de constituição) ou fracamente ligada (água de solvatação) ao sólido (SOCCOL, 1994).

Segundo RAIMBAULT (1997), os substratos utilizados na FES devem ser porosos, podendo ser biodegradáveis ou não, mas com grande área superficial por unidade de volume para que ocorra o crescimento microbiano na interface sólido/gás. Os substratos ainda devem possuir elevada atividade de água na interface sólido/gás, permitir que o fluxo de ar ocorra sob baixas pressões e serem resistentes à compressão e agitação. A matriz sólida não deve estar contaminada com inibidores das atividades microbianas e deve ser adequada para absorver ou conter nutrientes necessários aos microrganismos como carboidratos (celulose, amido, açúcares), fontes de nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais.

A fermentação no estado sólido tem sido aplicada há muito tempo na produção de alimentos orientais e na maturação de queijos com fungos na Europa (DOELLE, 1985). CANNEL & MOO-YOUNG (1980) apresentam um histórico dos processos que utilizam a FES, além dos alimentos orientais e queijos, e incluem a compostagem como exemplo de

processo natural. A FES é geralmente utilizada para a fermentação de produtos agrícolas ou alimentos, tais como arroz, trigo, milho e grãos de soja (SHULER & KARGI, 1992). A maioria das pesquisas recentemente desenvolvidas na área de FES apresenta alternativas aos cultivos convencionais submersos, que são os processos mais importantes na indústria farmacêutica e de alimentos.

2.7.1 Variáveis do Processo de FES

As principais variáveis da FES são teor de umidade (atividade de água), taxa de inóculo, temperatura, pH, tamanho das partículas e aeração. A otimização destes parâmetros para a maximização do rendimento e da taxa de formação do produto é ponto chave em sistemas que utilizam FES (SHULER & KARGI, 1992).

2.7.1.1 Atividade de água e teor de umidade

A atividade de água (a_w) e umidade são fatores limitantes ao crescimento de microrganismos e à produção de metabólitos por FES. Em sistemas de fermentação no estado sólido, a água apresenta-se de forma complexa na matriz sólida ou como uma camada fina absorvida na superfície das partículas ou ligada a regiões capilares do sólido. Água livre ocorre somente quando a capacidade de saturação da matriz sólida é excedida. A quantidade de água presente em substratos sólidos é função de sua máxima capacidade de retenção, e varia entre 30% e 80% dependendo do tipo de material. SOCCOL (1994) sugere que a água no interior da matriz sólida não seja muito abundante para que não haja redução da porosidade e conseqüentemente dificulte as trocas gasosas, mas em quantidade suficiente para que não limite o crescimento do microrganismo.

Segundo DOELLE (1985), a exigência de água dos microrganismos pode ser expressa quantitativamente, como a atividade de água. Através de isotermas de sorção entre a umidade e a a_w , é definida uma zona adequada de crescimento de microrganismos ($0,6 \leq a_w \leq 0,99$); estando a umidade do substrato maior ou igual a 50%, o desenvolvimento microbiano pode ser realizado por FES.

GERVAIS & SARRETE (1990), estudando a influência da atividade de água sobre a produção de aromas por fungos filamentosos, demonstraram que existem intervalos de a_w ótimos e específicos para cada microrganismo. Os fungos filamentosos crescem em atividades de água baixa (0,6 a 0,9) enquanto que leveduras e bactérias exigem para seu crescimento atividades de água mais elevadas, entre 0,75 e 0,9 para as leveduras e 0,85 e 0,99 para as bactérias (ORIOLE *et al.*, 1987).

2.7.1.2 Aeração

Segundo RAIMBAULT (1997), a aeração em processos no estado sólido tem quatro funções principais: manter as condições aeróbicas, eliminar o dióxido de carbono liberado, regular a temperatura do substrato e controlar o teor de umidade. Além da aeração, utiliza-se a agitação para auxiliar na homogeneização da temperatura e do ambiente gasoso no interior do meio sólido (LONSANE *et al.*, 1985). A agitação é feita de modo intermitente para se evitar danos ao micélio.

No mecanismo de transferência de oxigênio nos processos de fermentação no estado sólido, explicado por LONSANE *et al.* (1985), ocorrem dois fenômenos: uma transferência direta da fase gasosa para o microrganismo e a transferência da fase gasosa para a fase líquida, como ocorre nas fermentações líquidas. Mesmo que a transferência gasosa em sistemas de FES seja pouco conhecida, o problema da aeração torna-se menos crítico que para as fermentações líquidas e conseqüentemente o custo de energia de aeração é reduzido (SOCCOL, 1994). Um suprimento adequado de oxigênio é indispensável para microrganismos aeróbicos e o efeito se reflete no maior ou menor rendimento da cultura. A deficiência de oxigênio para certos microrganismos facultativos provoca diferenças em sua velocidade de crescimento e no rendimento de produtos sintetizados a partir da atividade do microrganismo (BRAMORSKI, 1996).

ITO *et al.* (1990) observaram que a produção de voláteis por *Aspergillus oryzae* durante a produção do Koji era melhorada sob condições limitantes de O₂.

SAUCEDO-CASTAÑEDA *et al.* (1994) relatam a utilização, detalhes de projeto e o funcionamento de dois sistemas “on-line” para o monitoramento e controle dos níveis de O₂ e CO₂ em FES, pela sua importância na estimativa da biomassa produzida.

2.7.1.3 pH

A forma como a água se encontra nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a determinação satisfatória do pH. Na maioria dos casos, o pH é verificado a partir de uma suspensão da amostra sólida em três a quatro partes de água. Esse método permite medir o pH global e não o micro-pH localizado no filme aquoso, onde realmente ocorrem as reações bioquímicas (SOCCOL, 1994). Devido a essa dificuldade, há a necessidade do uso de soluções tampão para evitar que ocorram grandes variações de pH durante a fermentação. Apesar de extremamente crítico, o pH durante a fermentação geralmente não é controlado e nem monitorado. A capacidade de tamponamento de alguns substratos contribui para eliminar a necessidade do controle do pH. Esta vantagem é explorada pelo ajuste inicial do pH do substrato durante a hidratação com água ao pH desejado (LONSANE *et al.*, 1985).

2.7.1.4 Temperatura

O calor gerado pelos microrganismos durante seu crescimento e respiração deve ser dissipado para evitar que haja um aumento de temperatura desfavorável ao processo (MITCHEL & LONSANE, 1992). Na fermentação no estado sólido, fatores como densidade do micélio, baixo teor de água e ausência de mistura podem favorecer o acúmulo de calor. HESSELTINE & WANG (1987) citam a dissipação de calor produzido por microrganismos como o principal problema da FES. O controle da temperatura em FES é geralmente feito por injeção de ar forçado nos fermentadores. RAIMBAULT (1997) cita que em processos aeróbicos a geração de calor pode ser estimada a partir das taxas de evolução de CO₂ e consumo de O₂. Para cada mol de CO₂ produzido durante a oxidação de carboidratos são liberadas 673 kcal. Nessa relação direta entre a respirometria e o risco de elevação de temperatura, fica claro o interesse em medir a evolução de CO₂ durante o

processo de FES.

2.7.2 Vantagens e Desvantagens da FES

Segundo SHULER & KARGI (1992), as principais vantagens da FES sobre a fermentação submersa são: reator de pequeno volume, resultando em menores custos de operação e investimento de capital; baixa probabilidade de contaminação devido a baixos teores de umidade; facilidade na separação de produtos; eficiência no uso de energia; e permite a operação como sistemas contínuos ou semi-contínuos. Do ponto de vista do gerenciamento de resíduos sólidos, a FES apresenta como maior vantagem a diminuição do volume de material, a eliminação de microrganismos patogênicos e odores (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980). A maior desvantagem é a heterogeneidade do meio, possuindo péssimas características de mistura, o que resulta em problemas para controlar o pH, oxigênio dissolvido e temperatura durante a fermentação.

A determinação direta da biomassa microbiana em FES é bastante difícil devido a problemas na separação da biomassa do substrato. Sendo este um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano, vários métodos têm sido utilizados para estimar a biomassa produzida. Os métodos baseiam-se em medidas diretas da biomassa, medidas do metabolismo microbiano (respirometria, enzimas extracelulares, ou metabólitos primários) através da quantificação de componentes específicos da biomassa (teor de proteínas, ácidos nucleicos, glucosamina e ergosterol), além de medidas físicas como condutividade elétrica e perda de carga em reatores de leito empacotado.

No caso da FES utilizando leveduras, a determinação da biomassa possui menos problemas. A análise é realizada após suspensão da amostra. Uma agitação intensa na presença de Tween 80 (0,01%) permite separar as células do suporte sólido. A suspensão celular é recuperada por filtração simples (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

2.7.3 Aplicações da Fermentação no Estado Sólido

A FES tem sido utilizada desde a antiguidade na preparação de alimentos

fermentados. O objetivo principal da FES é conferir aos alimentos melhores possibilidades de conservação e modificar suas propriedades físicas e sensoriais como cor e aroma. Um exemplo de alimento fermentado é o beiju. PASTORE *et al.* (1994) isolaram deste alimento várias cepas de *Neurospora sp.* devido a agradáveis odores frutais produzidos pelos cultivos. Foram verificados no “headspace”² do cultivo, mais de dez compostos entre os quais acetato de etila, 3-metil-1-butanol e hexanoato de etila. Além de alimentos (queijos, fungos comestíveis e produtos orientais fermentados), a FES vem sendo aplicada na obtenção de metabólitos primários e secundários de interesse industrial, como ácido giberélico, pectinases, produção de esporos biopesticidas, aromas e fragrâncias e na detoxificação de rações (RAIMBAULT, 1997). No Japão, estima-se que cerca de um terço da produção industrial de enzimas é feita por processos de fermentação no estado sólido. Processos fermentativos foram modernizados para a produção de ácidos cítrico e itacônico.

2.8 RECUPERAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

A preparação de amostras é uma etapa crítica na análise de aromas biotecnologicamente produzidos. Após a preparação da amostra, os aromas complexos podem ser separados em compostos individuais por cromatografia gasosa. PARLIMENT (1986) classifica as técnicas para isolar e concentrar os compostos voláteis em: amostragem do “headspace”, concentração do “headspace”, extração/destilação, análise direta de amostras aquosas, adsorção direta de amostras aquosas e extração direta de amostras aquosas. Ainda entre os métodos mais comuns para se recuperar ou concentrar compostos orgânicos voláteis estão a extração com solventes, separação com membranas específicas e adsorção em carvão ativado. Mais recentemente, agentes adsorventes como polímeros porosos hidrofóbicos vêm sendo utilizados em muitos trabalhos, especialmente para compostos aromáticos.

Na preparação de amostras de aromas gerados biotecnologicamente, há a interferência de alguns fatores como o teor de voláteis, complexidade dos aromas, diferença de volatilidade entre os compostos e a instabilidade térmica dos mesmos. Sendo o teor de

² mistura gasosa envolvendo uma amostra dentro de um sistema fechado em equilíbrio.

voláteis freqüentemente baixo, na ordem de partes por milhão (mg/kg), existe a necessidade de não somente isolá-lo mas de concentrá-lo. Outro fator importante é a complexidade dos aromas que incluem compostos de polaridades bastante distintas, pois pertencem a várias classes de compostos como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, mercaptanas, etc. Existe também a variação de volatilidade dos compostos, que exige técnicas diferenciadas para cada faixa de volatilidade.

A técnica de análise por “headspace” pode ser manual ou automatizada. O termo “headspace” é aplicado no contexto da química de aromas e pode ser definido como a mistura gasosa envolvendo uma amostra dentro de um sistema fechado em equilíbrio. A amostragem manual dos voláteis que se encontram sobre uma amostra em equilíbrio em um sistema fechado é a técnica mais utilizada, pois não existe dificuldade quanto à preparação da amostra. Utiliza-se seringa de vidro especial para coleta de gases (Gas-tight) e transfere-se a amostra a um “vial” selado com septo de borracha para o equilíbrio da amostra por determinado período de tempo a uma temperatura constante. A reprodutibilidade dos resultados pode ser um problema significativo nas técnicas manuais de “headspace”, portanto, deve-se padronizar rigorosamente os tempos, temperaturas e procedimentos de análise. Outra dificuldade é o fato de se estar injetando vapor d’água presente no “headspace” e que pode causar a deterioração de colunas cromatográficas polares. A grande vantagem de se usar esta técnica é a simplicidade de operação e a análise de compostos de baixo ponto de ebulição de maneira satisfatória. Outra vantagem é que materiais insolúveis e celulares não causam interferência. Além destas vantagens, este tipo de amostragem representa precisamente a composição a qual é percebida como odor, uma vez que não há descaracterização devido à ocorrência de adsorção ou extração por solventes.

Apesar do grande número de processos biotecnológicos capazes de produzir aromas de interesse, sua aplicação industrial ainda é bastante limitada. Segundo JANSSENS *et al.* (1992), um dos maiores problemas da industrialização de aromas resulta de dificuldades tecnológicas na recuperação dos compostos produzidos, visto a alta volatilidade e baixa solubilidade em água. O uso de técnicas de adsorção adequadas e o desenvolvimento de processos de fermentação específicos têm sido um dos principais desafios encontrados por

pesquisadores da área de produção de aromas.

Um procedimento dinâmico (“purge and trap”) envolve a passagem de um gás inerte através de uma amostra e coleta-se os constituintes voláteis em um sistema de captura ou armadilha (“trap”). Os diferentes tipos de “trap” irão variar de acordo com detalhes de alimentação e descarregamento. Os métodos incluem “trap” criogênico, absorção em leito adsorvente e “trap” tipo coluna de vapor. Os “traps” frios possuem a desvantagem de se coletar água juntamente com o material volátil. Já as técnicas que utilizam carvão ou polímeros porosos são bastante comuns. A dificuldade é a dessorção dos voláteis seja termicamente ou por uso de solventes, pois os compostos podem ser degradados ou perdidos (SIDES *et al.*, 2000).

A adsorção de compostos voláteis sobre carvão ativado é bastante conhecida em processos de depuração de poluentes e de separação de compostos voláteis de interesse. A vantagem do carvão sobre os demais adsorventes é a sua grande capacidade de adsorção (Tabela 1) em relação aos polímeros sintéticos, o que permite o uso de pequenas quantidades de adsorvente para a concentração.

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DE MATERIAIS ADSORVENTES UTILIZADOS PARA RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Adsorvente	Estrutura	Área Superficial (m ² /g)	Capacidade de Adsorção (%)	
			Etanol	Benzeno
Carvão	Carvão de côco	1150-1250	7,9	24,7
Tenax GC	Óxido de difenil-fenileno	18,6	NR ^a	0,53
XAD 4	Divinil estireno	849	0,40	2,9

Fonte: Book of Flavors citado por SOUCHON *et al.* (1996)

^a NR= não retém

Entretanto, o carvão não adsorve completamente todos compostos orgânicos e a dessorção nem sempre é total, sendo que os compostos dessorvidos não são idênticos àqueles que foram extraídos de uma solução aquosa (SOUCHON *et al.*, 1996). Outro

inconveniente é o custo da sua regeneração, que se faz química ou termicamente. Por isso, vêm sendo pesquisados novos materiais poliméricos como o amido, celulose e seus derivados. O uso destes materiais deve-se a razões múltiplas: são polímeros naturais, baratos, polifuncionais e com potencial para modificações químicas que permitem facilmente se obter novos derivados como dextrinas e amidos modificados.

CRINI *et al.* (2001) fizeram uso de géis adsorventes de ciclodextrina-carboximetilcelulose, estudando as propriedades envolvidas na adsorção de beta-naftol. Encontraram rendimentos em torno de 70% o que demonstra propriedades interessantes em termos de capacidade de adsorção do gel.

Comparando técnicas de adsorção em Tenax, TSUGITA *et al.* (1979) avaliaram as perdas de eficiência durante a dessorção dos compostos dos polímeros, termicamente ou com utilização de solventes. Os melhores resultados foram obtidos com a dessorção direta a 200°C dos voláteis contidos na coluna adsorvente, utilizando uma válvula de injeção automática acoplada ao cromatógrafo a gás. Observaram ainda perda de etanol, concluindo que a adsorção em Tenax não foi adequada para os álcoois de baixo peso molecular.

ITO *et al.* (1990) utilizaram coluna Tenax -TA para a coleta de voláteis produzidos por *Aspergillus oryzae* em Koji de arroz. Foram identificados oito álcoois, três aldeídos, cinco cetonas e um éster. Ao cultivo de 24 horas contido em vaso de fermentação passou-se um fluxo de ar a 100 mL/min durante trinta minutos. Os gases exaustos contendo os voláteis foram coletados em coluna Tenax (200 mg). Posteriormente, a coluna foi desconectada e aquecida a 250 °C, sendo os voláteis analisados em cromatógrafo a gás contendo injetor automático.

BÖRJESSON *et al.* (1990) descrevem a produção de metabólitos voláteis como indicador de crescimento do fungo *Penicillium aurantiogriseum* através da comparação com o número de unidades formadoras de colônia, teores de ergosterol da cultura e a produção de CO₂. Os voláteis produzidos foram coletados em polímero poroso adsorvente (Chromosorb 102) e dessorvidos termicamente. Concluíram que a taxa de produção de

voláteis se correlaciona com a taxa de produção de CO₂, podendo ser usada como indicador do crescimento do fungo.

SUNESSON *et al.* (1995), estudando a produção de metabólitos por diferentes espécies de fungos em diferentes meios de cultivo, utilizaram um aparato para a amostragem dos voláteis. O sistema de amostragem consistia na passagem de ar umedecido através do frasco de cultivo e por outra abertura coletava-se os compostos em tubos adsorventes empacotados com 90 mg de Tenax - GR. A amostragem variava entre 5 e 140 minutos no terceiro ou quarto dia de fermentação até o décimo- segundo ou décimo- quinto dia, dependendo da taxa de produção de metabólitos.

Uma patente alemã descreve o uso de resina Amberlite XAD2 para a recuperação de terpenos produzidos por *Ceratocystis sp.* O uso de XAD2 foi relatado por JANSSENS *et al.* (1992) para a recuperação de álcoois, ésteres, derivados do 2-feniletil álcool e 2-feniletil acetato produzidos pelas leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, com rendimentos de 170 mg/L para 2-fenil etanol e 74 mg/L para o 2-feniletil acetato.

Outro método baseado na microextração em fase sólida (SPME) do “headspace”, testado por IBÁÑEZ *et al.* (1998), foi utilizado para analisar compostos voláteis em frutas e assim caracterizar e verificar as variações que ocorrem durante distintas etapas do processamento de frutos. O método envolve o uso de fibra de sílica fundida recoberta por material polimérico em contato com a amostra que pode ser líquida ou gasosa. O mesmo tem como princípio a partição do analito entre a fase estacionária e a amostra, seguida de dessorção térmica da fibra diretamente no cromatógrafo gasoso. As vantagens são que não se utilizam solventes, rapidez na amostragem com baixo custo, facilidade de operação e sensibilidade.

O desenvolvimento de novas tecnologias como sensores eletrônicos - os chamados “narizes eletrônicos” - que identificam e estimam a concentração diretamente dos voláteis captados por SPME são para SIDES *et al.* (2000) uma área com grandes perspectivas na análise de aromas em alimentos.

RÉ (1998) apresenta uma revisão sobre a aplicação da secagem por atomização para a microencapsulação em especial de materiais voláteis. Entre os fatores envolvidos na obtenção das microcápsulas estão o tipo do material da parede da cápsula, concentração e natureza do composto volátil a ser retido, concentração e viscosidade da emulsão, temperatura do ar de secagem e morfologia da cápsula. O trabalho apresenta pesquisas desenvolvidas com polímeros alternativos mais baratos considerados “naturais”, por exemplo a goma arábica, e que podem encapsular aromas com alta retenção dos voláteis e estabilidade durante a vida de prateleira.

Atualmente, existe grande interesse industrial pela tecnologia de microencapsulação que deve crescer rapidamente nos próximos anos, porque ela pode levar a produtos diferenciados - farmacêuticos, alimentícios, agropecuários e cosméticos - com novas propriedades funcionais e inteligentes. A principal dessas propriedades é a liberação controlada do material ativo microencapsulado em um meio específico ou sob determinadas condições de uso. Uma tecnologia de ponta como essa tem grande valor estratégico para o país, por aumentar a competitividade de suas indústrias. Hoje, a incorporação de novas tecnologias é, no Brasil, essencial para que as mais variadas indústrias ofereçam produtos com maior valor agregado, o que representa uma vantagem na disputa por mercados internos e externos (RÉ, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram testadas duas cepas do fungo *Ceratocystis fimbriata* provenientes do Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS – Holanda) e cedidas pelo Dr. Pierre Christen do “Institut de Recherche pour le Development” (IRD) de Marselha - França:

- *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374-83)
- *Ceratocystis fimbriata* (CBS 146-53)

Na Figura 3 pode ser visualizada uma microfotografia do fungo *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374-83). Foi realizado um microcultivo em lâmina a 30 °C durante 5 dias. O meio usado foi ágar batata dextrose (PDA). Observa-se a morfologia do microrganismo com hifas hialinas septadas, conídios e esporos ovais de coloração marrom esverdeada.

FIGURA 3: MICROFOTOGRAFIA DO CULTIVO EM LÂMINA SOBRE PDA DO FUNGO *C. FIMBRIATA* CBS 374.83



3.1.1 Manutenção das Cepas

As cepas liofilizadas foram reativadas por sua suspensão em água destilada esterilizada. Em seguida foram incubadas em placas de Petri a 30°C contendo PDA. Após seu crescimento, as cepas foram transferidas para tubos contendo PDA solidificado na posição inclinada e mantidas sob refrigeração a 4°C por até seis meses. As cepas foram repicadas periodicamente.

3.1.2 Preparo do Inóculo

Para os experimentos de fermentação em meio sólido, utilizou-se uma suspensão de esporos com concentração conhecida. Os fungos filamentosos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo PDA e incubados durante 5 dias a 30°C. Uma suspensão de esporos foi preparada, coletando-se os esporos em água destilada estéril contendo algumas gotas de Tween 80. A concentração desejável da suspensão assim obtida era da ordem de 1×10^8 esporos/mL. A contagem dos esporos foi realizada em Câmara de Neubauer utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração (esporos / mL)} = (n \times f_d \times 1000) / NR \times V \quad (1)$$

onde,

n = número de esporos contados

f_d = fator de diluição da amostra

V = volume do retículo da câmara = $0,00025 \text{ mm}^3$

NR = número de retículos contados

3.2 SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS

Na seleção dos substratos para a fermentação no estado sólido foram utilizados resíduos da agroindústria brasileira:

- Casca de café Iapar: fornecida pelo Instituto Agronômico do Paraná, proveniente da região de Londrina - Paraná, safra 2000/2001;
- Casca de café Cocamar: fornecida pela Cooperativa dos Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá - Paraná, safra 2000/2001;
- Polpa de café Iapar: fornecida pelo Instituto Agronômico do Paraná, proveniente da região de Londrina - Paraná, safra 2000/2001.

Em estudos anteriores realizados por SOARES (1998), estes substratos foram complementados com glucose (30%). Procurou-se neste trabalho substituir a adição de glucose por suplementos de menor custo. Assim, foram testados o melaço de cana-de-açúcar e o bagaço de mandioca, que foram adicionados aos substratos como fonte de carbono suplementar.

O bagaço de mandioca (*Manihot esculenta*) foi fornecido pela Companhia Lorenz (Quatro Pontes- PR) ao Laboratório de Processos Biotecnológicos - UFPR. O bagaço de mandioca foi adicionado à casca de café para se testar a possibilidade de se substituir a adição de glucose ao meio, uma vez que aquele possui elevado teor de amido que poderia vir a ser utilizado pelo fungo durante a FES.

O melaço de cana-de-açúcar é um produto rico em açúcares facilmente assimiláveis pelos microrganismos. O melaço adicionado à casca e à polpa elevou o teor de açúcares redutores iniciais no meio de fermentação, podendo assim substituir a adição de glucose.

3.2.1 Preparo dos Substratos

Os substratos sólidos foram secos em estufa com circulação de ar a 60° C durante 24 horas. Em seguida, foram moídos em moinho tipo disco e classificados granulometricamente entre 0,8 e 2,0 mm.

O melão e a glucose foram adicionados aos substratos sólidos, preparando-se uma solução aquosa na concentração e volume que resultassem no teor de açúcares redutores e umidade inicial desejados nos experimentos.

3.2.2 Caracterização Físico-Química

Os substratos foram caracterizados segundo as normas analíticas do IAL (1985) quanto à sua composição físico-química. Determinou-se a umidade e o teor de cinzas por diferença de peso, lipídios por extração com solvente em Soxhlet, proteínas pelo método Kjeldahl, fibras pelo método de digestão ácida e alcalina e açúcares pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). O pH dos substratos foi determinado potenciométricamente. Determinou-se a absorção máxima de água dos substratos conforme descrito por KOLICHESKI (1995).

3.3 SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS

Na primeira etapa do estudo, foram realizados experimentos para a seleção da cepa de *Ceratocystis fimbriata* com maior capacidade de crescimento e produção de aromas com características frutais. Foram também selecionados os substratos nos quais os microrganismos melhor se desenvolvessem.

As cepas foram cultivadas simultaneamente sobre a casca e a polpa de café provenientes do Iapar. Através de análise do “headspace” por cromatografia gasosa selecionaram-se o microrganismo e substratos onde se obteve maior produção de voláteis.

Os experimentos foram realizados em duplicatas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 15 g de matéria seca e cobertos com seis camadas de gaze. As condições de cultivo basearam-se em experimentos com *Ceratocystis fimbriata* em casca de café realizados por SOARES (1998). Um tratamento térmico da casca e da polpa de café também foi testado, conforme sugerido pela autora, que consistiu de uma suspensão aquosa da casca ou polpa na concentração de 200 g/L e submetida a 100° C durante 40 minutos. O

tratamento térmico da casca de café tinha como finalidade eliminar possíveis compostos que interferiam no crescimento do fungo e conseqüentemente na produção de aromas. O pH inicial do substrato foi ajustado em 6, adicionou-se 20% de glucose e umidade inicial próxima da saturação do substrato (65%). Os frascos foram inoculados com 1×10^7 esporos/g de substrato. O cultivo foi realizado em estufa a 30° C.

O efeito da luminosidade sobre os cultivos com *C. fimbriata* foi investigado através de experimentos em frascos Erlenmeyer contendo 15 g de casca de café, o pH inicial do substrato foi ajustado em 6, adicionou-se 20% de glucose e a umidade inicial foi de 65%. Os frascos foram inoculados com 1×10^7 esporos/g de substrato. Utilizou-se condições distintas de fotoperíodo: 24 horas, 12 horas e na ausência de luz. Os frascos foram incubados a 30 °C em estufas, sendo que para os experimentos com fotoperíodo de 12 e 24 horas acoplou-se uma fonte luminosa. A concentração de voláteis foi medida em 70 horas e 120 horas de cultivo.

3.4 ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO

A cepa com melhor desempenho foi cultivada sobre o substrato que se mostrou mais adequado à produção de voláteis totais. Como a casca utilizada em trabalhos anteriores era de proveniência e composição físico-química distintas, realizou-se um planejamento fatorial para que, com o mínimo de experimentos, pudessem ser avaliadas as influências das variáveis sobre a resposta de interesse, ou seja, a concentração de voláteis produzidos. A metodologia de superfícies de resposta foi utilizada como técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos experimentais. Esta técnica, introduzida por Box em 1969, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos (BOX *et al.*, 1978; BARROS NETO *et al.*, 1996).

As variáveis pH inicial, adição de glucose (%), volume de solução salina adicionada e umidade inicial (%) foram selecionadas como as mais importantes no processo de fermentação no estado sólido, com vistas à produção de compostos voláteis. As variáveis

foram estudadas em dois níveis e com dois pontos centrais. O programa Statistica (Statsoft) foi utilizado para elaboração dos planos experimentais e tratamento de dados. A Tabela 2 mostra os valores de cada variável nos níveis superior (+1), inferior (-1) e central (0) para os experimentos.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL cobertos com seis camadas de gaze e preparados de acordo com as condições indicadas para cada um dos experimentos. O teor de açúcares redutores iniciais foi corrigido com a adição de glucose como fonte de carbono. O pH inicial dos substratos foi ajustado com a adição de hidróxido de sódio a 0,5 N ou de ácido clorídrico 0,1 N. A água de hidratação foi acrescida de solução salina otimizada por CHRISTEN & RAIMBAULT (1991) nas seguintes concentrações: uréia 1,9 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,5g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,75g/L.

TABELA 2: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^{4-1}

Variável	Nível		
	+1	0	-1
pH	4,0	5,0	6,0
Adição de glucose (%)	10	20	30
Solução salina (mL)	0	0,375	0,75
Umidade inicial (%)	60	65	70

Após o planejamento experimental 2^{4-1} , foi realizado um segundo planejamento para definir o teor ideal de adição de glucose. No segundo planejamento, mantiveram-se constantes parâmetros não significativos estatisticamente na produção de voláteis e foram estudados somente aqueles que realmente interferiram na produção de voláteis. Com o planejamento experimental 2^2 , avaliou-se o efeito de variáveis significativas na variável resposta, no caso, concentração de voláteis totais produzidos. As variáveis estudadas foram a adição de glucose e o pH.

Os níveis de adição de glucose estudados foram 20% e 30%, e o pH inicial utilizado foi de 5,0 (natural do substrato) e 6,0 corrigido com hidróxido de sódio 0,5 N. A Tabela 3 mostra os níveis estudados neste experimento.

TABELA 3: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^2

Variável	Nível	
	-1	+1
pH	5,0	6,0
Adição de glucose (%)	20	30

3.5 FERMENTAÇÃO EM BIORREADORES TIPO COLUNAS

Com o objetivo de recuperar os voláteis produzidos pelo fungo, a fermentação no estado sólido foi conduzida em biorreatores tipo colunas aeradas com um fluxo contínuo de ar para facilitar a captação dos voláteis. Além de nova otimização de variáveis como pH, adição de glucose e taxa de aeração, identificou-se e quantificou-se os compostos voláteis produzidos, realizando uma cinética da produção de voláteis e do crescimento do fungo por análise respirométrica. Na Tabela 4 estão os níveis estudados para a otimização da fermentação em colunas.

TABELA 4: CAMPO DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO 2^3 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO

Variável	Nível		
	-1	0	+1
pH	4,0	5,0	6,0
Adição de glucose (%)	20	25	30
Taxa de aeração (mL/min)	3	13,5	30

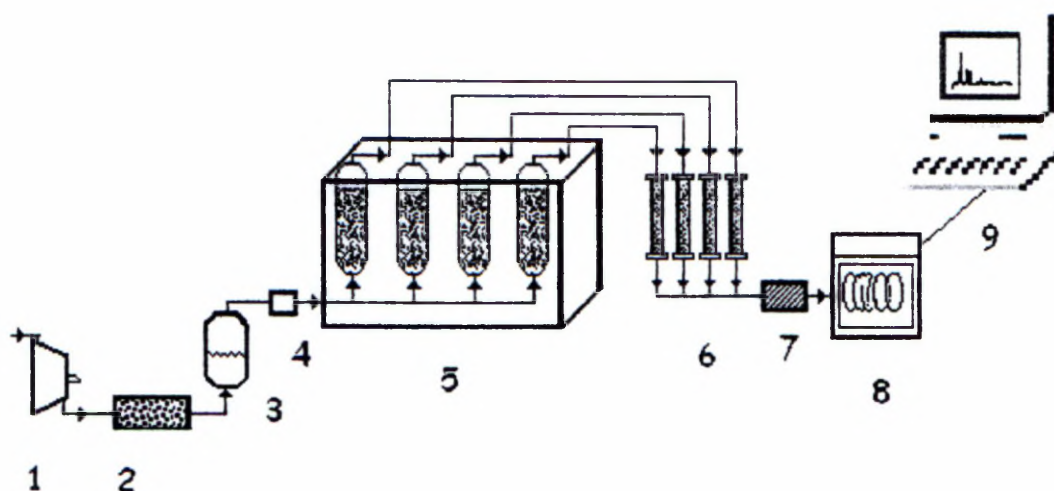
Com a realização de um segundo planejamento completo (3^2), testando as variáveis significativas em três níveis, pode-se observar a superfície de resposta otimizada para a FES em colunas.

Nos experimentos realizados em colunas de fermentação utilizou-se cerca de 20 g de matéria seca (MS) de casca de café em cada coluna, sendo a temperatura do banho mantida a 30° C. A complementação do teor de açúcares redutores iniciais do meio foi estudada, utilizando a substituição da glucose por fontes de carbono de menor custo. Uma solução aquosa de melaço de cana-de-açúcar a 35 g/L foi adicionada à casca em volumes tais que se obtivesse o teor de açúcares redutores requerido para o experimento. O bagaço de mandioca foi adicionado à casca de café em concentrações de até 20%. O aminoácido leucina (10mM) também foi adicionado à casca para se testar o seu efeito sobre os voláteis produzidos pelo fungo, uma vez que este aminoácido é reconhecido como precursor de aromas.

3.5.1 Equipamento de Incubação Estático para FES

O equipamento de incubação estática para FES (Figura 4) foi composto por colunas de vidro com diâmetro de 4 cm, 20 cm de altura e volume útil de aproximadamente 250 cm³. As colunas previamente estéreis contendo uma camada de algodão nas extremidades foram completadas com 20 g (base seca) do substrato previamente preparado, umedecido e inoculado. As colunas foram conectadas a borbulhadores de ar que continham cerca de 100 mL de água destilada e esterilizada para umedecer o ar antes de sua passagem pela coluna. O conjunto foi colocado em uma cuba de vidro contendo água à temperatura desejada e controlada por termostato. Os borbulhadores foram conectados individualmente a válvulas reguladoras do ar de entrada, que permitiam o ajuste da vazão de ar, pois este interfere diretamente na determinação da concentração dos gases analisados. O ar úmido é empregado para compensar as perdas de água devido ao fluxo de ar forçado através do substrato. Para evitar a interferência da água na análise respirométrica do ar exausto, os gases foram secos em colunas de sílica-gel conectadas à saída das colunas de fermentação.

FIGURA 4: DESENHO ESQUEMÁTICO DE EQUIPAMENTO DE INCUBAÇÃO EM COLUNAS AERADAS



(1) compressor; (2) filtro; (3) umidificador; (4) válvula controladora de fluxo; (5) colunas de fermentação; (6) colunas de sílica-gel; (7) válvula multivias; (8) cromatógrafo a gás; (9) computador.

3.6 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR EM ESCALA SEMI-PILOTO

Como os reatores para fermentação sólida não são disponíveis industrialmente e pelo fato de existir uma variedade de tipos idealizados por muitos autores, torna-se difícil a comparação com bibliografias existentes. Desenvolveu-se no Laboratório de Processos Biotecnológicos um biorreator em escala semi-piloto com capacidade para fermentar 3 kg de casca de café seca: biorreator cilíndrico, de aço inoxidável, casco duplo na metade inferior, com 37 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento. Possui uma pá giratória idealizada para homogeneização da massa fermentada e para melhorar a dissipação do calor gerado pelo metabolismo microbiano. As rotações da pá são controladas por freqüencímetro acoplado ao motor. O ar fornecido por um compressor passa por um filtro coalescente para retenção de partículas e é umedecido através de um dispersor metálico mergulhado em um recipiente contendo água destilada estéril. O ar entra no reator e se distribui por uma tubulação perfurada interna à dupla carcaça do cilindro formando uma camisa de ar. O ar flui por orifícios na parede interna atravessando todo o leito. As Figuras 5a e 5b mostram detalhes do biorreator.

FIGURA 5A: BIORREATOR CILÍNDRICO COM CAPACIDADE PARA 3 KG DE CASCA DE CAFÉ UTILIZADO PARA FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

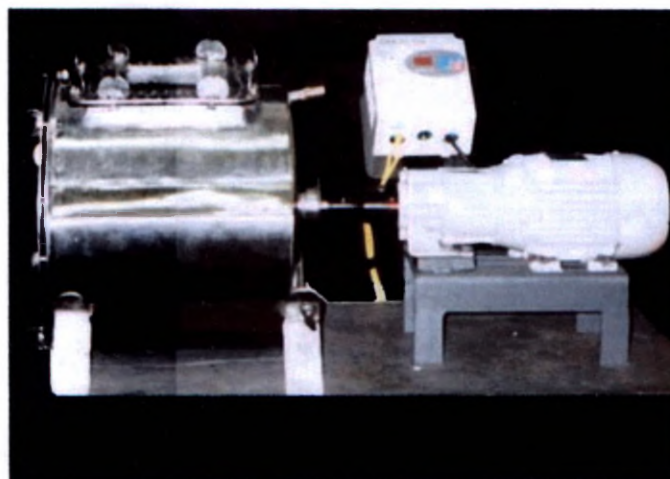
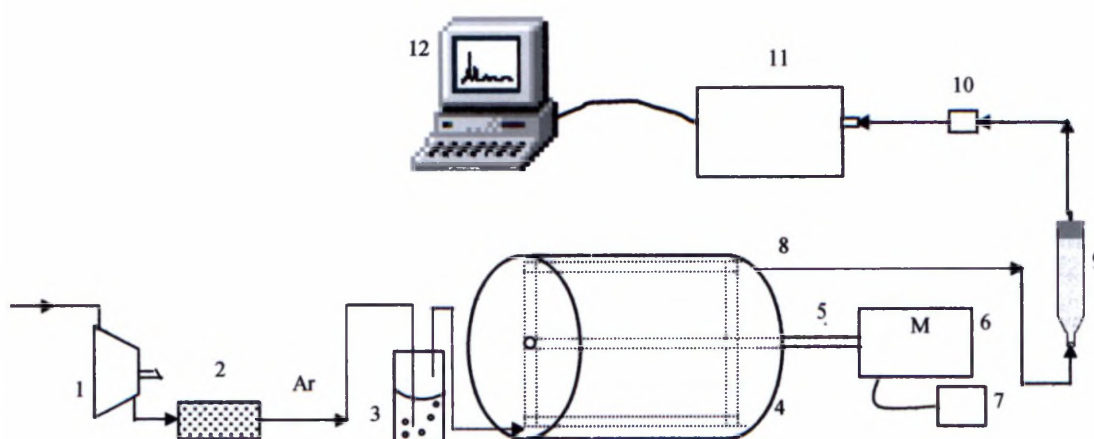


FIGURA 5B: ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR E DISPOSITIVOS AUXILIARES



compressor ; (2) filtro; (3) umidificador; (4) biorreator; (5) eixo da pá acoplado ao motor; (6) motor; (7) frequencímetro; (8) saída de ar; (9) coluna de sílica gel; (10) válvula de injeção automática; (11) cromatógrafo a gás; (12) computador.

3.7 ANÁLISE DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS

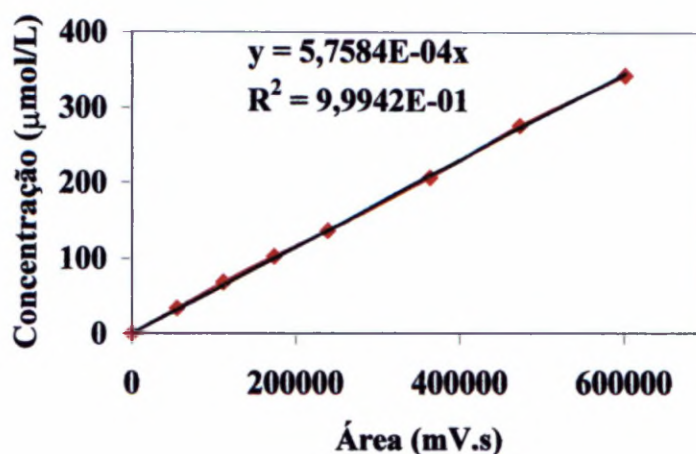
Os compostos voláteis foram monitorados periodicamente por análises cromatográficas do “headspace” durante a fermentação. Com uma seringa especial para gases (Gas tight) coletava-se um 1 mL da amostra do “headspace” do fermentado. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC17A e equipado com coluna HP-DB 5 e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250° C. Utilizou-se programação de temperatura do forno iniciando-se a 40° C durante 5 minutos seguido do aumento de temperatura a uma taxa de 20° C/ min até a temperatura final de 150° C, mantida durante 4 minutos. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão de 1,5 mL/min e a taxa de “split” foi de 1:5.

As amostras dos compostos voláteis produzidos nas colunas e no biorreator foram analisadas como descrito anteriormente. A coleta de amostra foi realizada através um dispositivo em forma de “T” contendo um septo de borracha acoplado à saída da coluna ou biorreator de fermentação.

3.7.1 Quantificação dos Voláteis Produzidos

A concentração dos voláteis totais e individuais produzidos foi expressa em equivalente de etanol por volume do “headspace” e por grama de substrato em base seca ($\mu\text{mol/L}$. gMS) conforme curva de calibração para etanol. A curva de calibração (Figura 6) para o etanol foi obtida através da injeção do “headspace” de um frasco de volume conhecido contendo diferentes concentrações de etanol. Foram plotadas em um gráfico, as áreas dos picos obtidos versus as respectivas concentrações em $\mu\text{mol/L}$. A curva padrão foi obtida no intervalo de concentração de 0 a 20 $\mu\text{L/L}$, ou seja, de 0 a 344 $\mu\text{mol/L}$.

FIGURA 6: CURVA PADRÃO DE ETANOL OBTIDA NO INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO DE 0 A 20 $\mu\text{L/L}$



3.7.2 Identificação dos Compostos

Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia em fase gasosa (GC) através da injeção de 1 mL da amostra do “headspace” do fermentado nas mesmas condições citadas na seção 3.7, e por comparação com tempos de retenção de padrões previamente injetados. A Tabela 5 contém os compostos padrões utilizados e seus respectivos tempos de retenção. Foram injetados 17 padrões entre álcoois, ésteres e aldeídos.

TABELA 5: TEMPOS DE RETENÇÃO PARA COMPOSTOS PADRÕES

Composto	Tempo de Retenção (min)
Acetaldeído	2,068
Etanol	2,409
Álcool n-propílico	2,534
Acetato de etila	2,899
2 metil propanol	3,047
Acetato de isopropila	3,430
Propionato de etila	4,210
Acetato de propila	4,399
Álcool isoamílico	4,910
2 metil 1 butanol	4,970
Isobutirato de etila	5,505
Acetato de isobutila	5,810
Butirato de etila	6,457
Acetato de butila	6,762
Propionato de isobutila	7,858
Acetato de isoamila	7,967
Etil 3- hexenoato	9,943

3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Foram determinados ao final da fermentação, os açúcares residuais totais e redutores, o pH e a umidade final do meio e biomassa fúngica.

3.8.1 Determinação do pH

O pH foi medido potenciométricamente através da dispersão de 1 g do fermentado em 20 mL de água deionizada. A suspensão foi agitada em agitador magnético durante 10 minutos (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991; KOLICHESKI, 1995). A medida foi realizada em peagâmetro digital calibrado com soluções tampões.

3.8.2 Determinação da Umidade Final

Em FES, é indispensável se conhecer o teor de umidade do substrato sólido, assim como suas variações durante o experimento. A água pode ser produzida durante a

degradação do substrato ou ainda perdida devido à respiração do microrganismo ou pela transferência através da vazão de ar em experimentos sob condições de aeração. A umidade foi determinada por diferença de peso em estufa a 105° C até peso constante.

3.8.3 Determinação de Açúcares Redutores e Totais

Os açúcares foram dosados pelo método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). A glucose reduz o reativo de Somogyi (cupro-alcalino) sob aquecimento e o produto da reação (óxido cuproso) combina-se com o reativo de Nelson (arseno-molibdato), produzindo um complexo óxido-molibdênico de coloração azul que apresenta absorção máxima a 540 nm. Uma curva padrão para glucose, construída previamente, é utilizada no cálculo da concentração dos açúcares redutores. Os açúcares totais são determinados pelo mesmo método sendo que o substrato é previamente hidrolisado com ácido.

3.8.4 Determinação da Biomassa Produzida

A biomassa foi estimada através da determinação do teor de proteínas no substrato fermentado, precipitando-se a proteína real pelo método de Stutzer (VERVACK, 1973) seguido da dosagem do nitrogênio total por Kjeldahl. Conhecendo-se o teor protéico inicial do substrato e do fermentado final calcula-se a biomassa microbiana pelo aumento do teor protéico.

3.8.5 Análise Respirométrica

O metabolismo e a respiração do microrganismo foi estudada através da medição contínua do CO₂ produzido e do consumo de O₂. Os gases da saída da coluna ou do biorreator passavam por coluna de sílica-gel para a retirada da umidade e em seguida eram injetados automaticamente no cromatógrafo.

O cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC-8A possui injetor automático, detector de condutividade térmica, colunas de inox Alltech CTR I e Porapak Q 80/100 com 2 m de comprimento. O gás de arraste utilizado foi hélio. As temperaturas do detector e da coluna foram mantidas a 60° C. Um sistema de válvulas multivias possibilita a tomada de amostras simultâneas de oito colunas. O ciclo de análise que envolve as oito medições leva cerca de 80 minutos para ser completo e é repetido continuamente durante todo o período de tempo da fermentação.

A análise respirométrica foi controlada por computador pelo programa CHROMA (Biosystèmes, France) que integra os cromatogramas e calcula as concentrações de CO₂ e O₂. Curvas de calibração foram previamente construídas utilizando-se os gases em diferentes concentrações.

Para se estimar a taxa de consumo de O₂ (OUR) e a evolução da produção de CO₂, em termos de vazão volumétrica (L/h), foi realizado um balanço de massa. Para uma vazão de ar na saída do fermentador F_S conhecida e uma vazão de ar na entrada do fermentador de F_E , foram consideradas as seguintes equações:

$$V_{O_2S} = \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (2)$$

$$V_{CO_2S} = \left(\frac{\%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (3)$$

$$F_S = V_{O_2S} + V_{CO_2S} + V_{N_2S} \quad (4)$$

$$V_{N_2S} = \left(\frac{100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (5)$$

onde:

V_{O_2S} = vazão de O₂ na saída;

$\%O_{2S}$ = porcentagem de O₂ na saída;

V_{CO_2S} = vazão de CO₂ na saída;

$\%CO_{2S}$ = porcentagem de CO₂ na saída;

V_{N_2S} = vazão de N_2 na saída do biorreator.

Sabendo-se que:

$$V_{N_2E} = \frac{79}{100} \times F_E \quad (6)$$

$$V_{N_2E} = V_{N_2S} \quad (7)$$

onde:

V_{N_2E} = vazão de N_2 na entrada do reator;

chegou-se a seguinte equação que relaciona a vazão de ar de entrada e de saída:

$$F_E = \frac{(100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}) \times F_S}{79} \quad (8)$$

Para calcular a vazão volumétrica de O_2 consumido fez-se um balanço de massa para o oxigênio obtendo-se a equação:

$$V_{O_2CONS} = \left(\frac{21}{100} \right) \times F_E - \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (9)$$

onde:

V_{O_2CONS} = vazão de O_2 consumido.

Para estimar a taxa de consumo de O_2 e de produção de CO_2 , em mol/h, considerou-se o ar como gás ideal e as vazões volumétricas V_{O_2CONS} e V_{O_2S} .

O modelo de consumo de oxigênio durante a fermentação completa em um sistema aeróbico é um modelo global, que considera o consumo de O_2 para o crescimento e manutenção. A manutenção celular representa o metabolismo endógeno, sendo necessário realizar um balanço para o consumo de oxigênio (PANDEY *et al.*, 2001).

Em termos gerais e considerando um processo no qual somente biomassa celular é produzida, e não metabólitos extracelulares, pode-se dizer que:

$$\text{O}_2 \text{ consumido} = (\text{O}_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular} + \text{O}_2 \text{ empregado na manutenção da biomassa celular}) \quad (10)$$

A taxa de consumo de oxigênio (OUR) em um processo é definida como:

$$R_{\text{O}_2\text{CONS}} = \frac{\Delta \text{O}_2}{\Delta t} \quad (11)$$

onde:

$$R_{\text{O}_2\text{CONS}} = \text{O}_2 \text{ consumido em um intervalo de tempo } \Delta t \text{ (gO}_2\text{/h)}.$$

O oxigênio empregado na síntese da biomassa (O_2SINT) é obtido pela expressão:

$$R_{\text{O}_2\text{SINT}} = \frac{\Delta \text{O}_2\text{SINT}}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (12)$$

onde:

$$R_{\text{O}_2\text{SINT}} = \text{O}_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular (g O}_2\text{/h)};$$

$$Y_{X/O} = \text{rendimento baseado no consumo de oxigênio para síntese da biomassa celular no intervalo de tempo considerado (g de biomassa/g O}_2\text{)};$$

$$\Delta X = \text{biomassa sintetizada durante o intervalo de tempo considerado (g)};$$

$$\Delta t = \text{intervalo de tempo considerado (h)}.$$

O oxigênio empregado no processo endógeno é estimado pela expressão definida por Monod, na qual emprega-se o conceito de coeficiente de manutenção da biomassa celular (PANDEY *et al.*, 2001):

$$m_X = \frac{1}{X} \times \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{ENDOGENO}} \quad (13)$$

onde:

$$m_X = \text{coeficiente de manutenção da biomassa celular (g O}_2 \text{ x g biomassa}^{-1} \text{ x h}^{-1}\text{)};$$

$$X = \text{biomassa celular em um tempo t (g)}.$$

Considerando o O_2 como substrato pode-se postular que:

$$R_{O_2, ENDOG} = \frac{\Delta O_2 \text{ ENDOG}}{\Delta t} \quad (14)$$

onde:

$$R_{O_2, ENDOG} = O_2 \text{ empregado no processo endógeno (g } O_2/h).$$

Relacionando as equações (10) a (14) obtém-se a seguinte expressão:

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} + m_X X \quad (15)$$

A equação (15) permite estimar a quantidade de biomassa celular que existe em um tempo t de fermentação através de dados do consumo de oxigênio por determinações finitas do seu consumo em intervalos de tempo particulares. Integrando a equação (15) pode-se afirmar que:

$$\int_{t=0}^{t=n} R_{O_2, CONS} dt = \int_{t=0}^{t=n} \frac{1}{Y_{X/O}} \frac{dX}{dt} dt + \int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \quad (16)$$

O termo $\int R_{O_2, CONS}$ na equação (16) indica que o oxigênio consumido em um tempo $t = n$ pode ser estimado da relação entre OUR versus tempo. Uma solução para a equação (16) foi postulada por métodos numéricos. Aplicando a regra do trapézio para a integração numérica do primeiro termo na expressão tem-se que:

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{dO_2}{dt} dt \approx \frac{\Delta t}{2} \left\{ \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + 2 \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=1} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=2} + \dots + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n-1} \right] + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right\} \quad (17)$$

onde:

$$\left(\frac{dO_2}{dt}\right)_{t=i} = O_2 \text{ consumido no intervalo de tempo } i \text{ (g } O_2/\text{h)};$$

Δt = intervalo de tempo considerado na estimativa (h).

Considerando constante o rendimento baseado no consumo de O_2 ($Y_{X/O} = k$) obtém-se:

$$\int_{x=0}^{x=n} \frac{1}{Y_{X/O}} dX = \frac{1}{Y_{X/O}} (X_n - X_0) \quad (18)$$

onde:

X_0 = biomassa no início do intervalo de tempo Δt (g);
 X_n = biomassa no final do intervalo de tempo Δt (g);

O valor do último termo da expressão (16) é obtido usando o mesmo procedimento para a obtenção da expressão (17) e considerando o coeficiente de manutenção da biomassa celular constante ($m_X = k$):

$$\int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \approx m_X \frac{\Delta t}{2} [X_{t=0} + 2(X_{t=1} + X_{t=2} + \dots + X_{t=n-1}) + X_{t=n}] \quad (19)$$

Relacionando as equações (16) a (19) obtém-se a seguinte equação:

$$X_n = \left\langle Y_{X/O} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[\left(\frac{dO_2}{dt}\right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt}\right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{t=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt}\right)_{t=i} \right\} + \left(1 - \frac{a}{2}\right) X_0 - a \sum_{i=1}^{t=n-1} X_i \right\rangle / \left(1 + \frac{a}{2}\right) \quad (20)$$

onde:

$$a = m_X Y_{X/O} \Delta t$$

A partir dos valores calculados para a taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , foi feita uma estimativa dos parâmetros biotecnológicos. O procedimento para o cálculo da biomassa celular em tempo qualquer (X_n), consistiu em assumir valores para o rendimento de biomassa baseado no consumo de O_2 ($Y_{X/O}$) e no coeficiente de manutenção da biomassa celular (m_X). Um programa denominado FERSOL foi utilizado para realizar os cálculos (RODRIGUEZ-LEÓN *et al.*, 1988).

Foram considerados nove valores de biomassa fúngica determinados analiticamente nos tempos de 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de fermentação. O programa permitiu determinar os coeficientes da equação por aproximação sucessiva. A partir dos valores da taxa de consumo de O₂ e produção de CO₂, obtidos experimentalmente, o sistema determinou um rendimento de biomassa celular ($Y_{X/O}$).

3.9 RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS POR ADSORÇÃO

Para recuperar os compostos voláteis produzidos em colunas de fermentação, utilizou-se materiais adsorventes que possuíssem baixa afinidade com a água. Foram testados carvão ativado e as resinas adsorventes Amberlite XAD2 e Tenax TA na adsorção dos compostos.

Acoplou-se, à saída dos gases da coluna de fermentação, uma coluna de vidro com 200 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, preenchida com quantidade conhecida do material adsorvente testado. O adsorvente foi sustentado com pequenos tampões de lã de vidro nas extremidades da coluna.

Os compostos foram coletados a partir das 24 horas de fermentação, substituindo as colunas diariamente. Após a dessorção das colunas, o extrato foi analisado por GC, nas mesmas condições citadas anteriormente. As colunas contendo o material adsorvente foram transferidas para aparato de vidro (Figura 7) construído com base nos experimentos de JANSSENS *et al.* (1988), onde os compostos voláteis eram dessorvidos por extração com solvente adequado a cada tipo de material. Utilizou-se diclorometano para a dessorção do material adsorvido pelo carvão ativado e pela resina Tenax. No caso da Amberlite XAD2 o solvente utilizado foi o metanol.

FIGURA 7: APARATO DE DESSORÇÃO PARA COLUNAS ADSORVENTES



FONTE: JANSSENS *et al.* (1988)

3.10 Condensação Direta em N₂ Líquido

O método mais simples para concentrar e recuperar os vapores e gases do “headspace” é forçando-os através de uma série de “traps” frios. A Figura 8 mostra o sistema de condensação direta acoplado à saída dos fermentadores tipo colunas. Os gases liberados pelo microrganismo cultivado sobre a casca de café em colunas aeradas são forçados por um sistema a vácuo através de dois condensadores em série refrigerados por nitrogênio líquido. O sistema foi montado utilizando tubos e válvulas metálicas, com conexões de silicone e bomba de alto vácuo tipo rotatória BOC Edwards modelo RV3, que fornece um vácuo de 3×10^{-2} mbar. O condensado foi analisado por cromatografia em fase gasosa.

O principal inconveniente observado foi a condensação de grande quantidade de água presente nos cultivos. Uma operação subsequente torna-se necessária para extrair os constituintes do aroma da água. Nos experimentos realizados, uma coluna com CaCl₂ foi

conectada antes do “trap” frio para reter a umidade dos gases que saem da coluna de fermentação.

FIGURA 8: SISTEMA DE CONDENSAÇÃO DIRETA DOS VOLÁTEIS



3.11 ENCAPSULAMENTO DOS AROMAS

Os compostos voláteis produzidos foram encapsulados em uma matriz de maltodextrina e goma arábica e secos por atomização em um “spray-drier” LabPlant SD-05 (Figura 9). O equipamento de secagem com capacidade de evaporação de 1500 mL/h possui câmara de secagem de vidro de 215 mm de diâmetro e comprimento de 500 mm com controle digital das temperaturas e vazões de ar e fluido alimentado. O primeiro passo é a preparação da solução dos compostos produzidos nas colunas de fermentação. Uma solução aquosa de maltodextrina e goma foi preparada com teor de sólidos de 20%, na proporção de 1:1. A goma age como uma barreira para proteger os componentes líquidos

do aroma. Esta solução foi homogeneizada e os voláteis que deixavam as colunas eram borbulhados diretamente na solução através de um distribuidor poroso.

FIGURA 9: “SPRAY-DRIER” UTILIZADO NA SECAGEM DOS AROMAS ENCAPSULADOS



A secagem da mistura foi realizada pelo processo de atomização. A mistura foi alimentada no sistema por uma bomba peristáltica a uma taxa de escoamento de 500 mL/h e atomizada em conjunto atomizador de aço inoxidável por onde circulavam internamente o líquido e ar comprimido externamente. As gotículas formadas atravessavam a câmara onde encontravam um fluxo de ar quente a 105°C. Uma vez que as gotículas contactavam o ar quente, a água era evaporada e o aroma na forma de pó deixava a câmara pela lateral. O pó foi recuperado em frasco coletor adaptado à saída do ciclone.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

A Tabela 6 mostra a composição físico-química dos substratos utilizados.

TABELA 6: COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

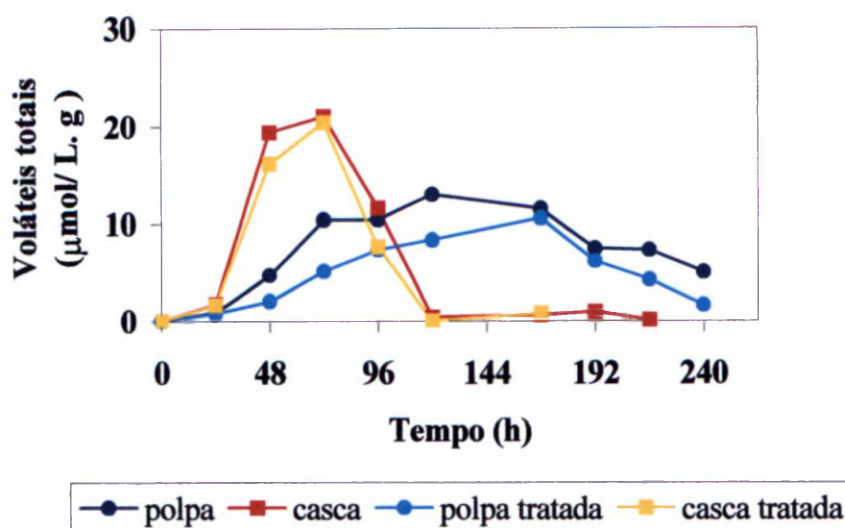
Determinação	Casca de café Iapar (2000)	Polpa de café Iapar (2000)	Casca Cocamar (2001)	Bagaço de mandioca Lorenz
Umidade (%)	13,23	11,48	11,77	8,96
Cinzas (%)	9,33	5,39	6,64	1,44
Lipídios (%)	0,93	2,94	1,38	0,93
Fibras (%)	24,16	25,2	34,36	13,9
Proteínas (%)	12,67	9,51	8,41	1,61
Açúcar redutor (% glucose)	1,46	2,89	7,43	0,8
Açúcar total (% glucose)	9,49	11,3	11,6	38,2
pH	6,4	4,6	4,9	5,0

A composição físico-química desses materiais (Tabela 6) mostra que podem ser utilizados como substratos em FES. A casca e a polpa de café são particularmente interessantes devido ao elevado teor de proteínas e de micronutrientes (cinzas). O bagaço de mandioca possui elevada quantidade de açúcares totais (amido).

4.2 SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS

As duas cepas testadas do fungo *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374.83 e CBS 146.53) foram cultivadas em frascos Erlenmeyer sobre os substratos casca e polpa de café. As condições de cultivo foram baseadas em condições ótimas obtidas por SOARES (1998). A temperatura utilizada foi 30 °C, teor de umidade de 65% e inóculo de 1×10^7 esporos/g MS, pH 6 e 20% de adição de glucose. Os resultados da evolução dos voláteis totais por *C. fimbriata* CBS 374.83 são apresentados na Figura 10.

FIGURA 10: EVOLUÇÃO DOS VOLÁTEIS TOTAIS PRODUZIDOS POR CBS374.83 SOBRE A CASCA E POLPA DE CAFÉ COM E SEM TRATAMENTO TÉRMICO

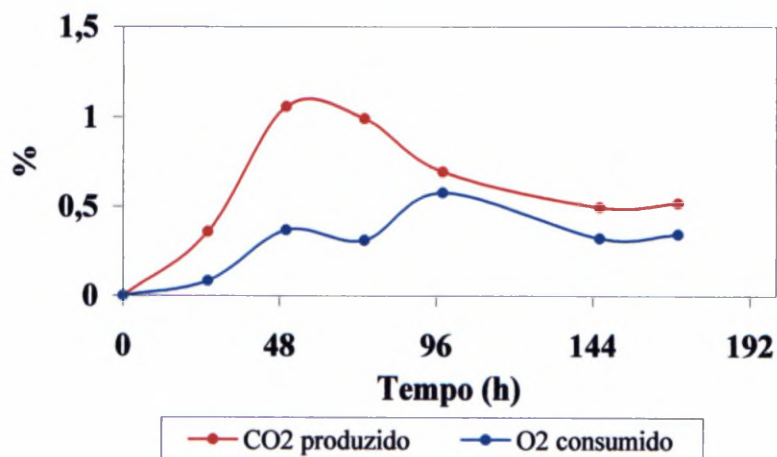


Observa-se que o microrganismo comportou-se de maneira similar tanto nos substratos tratados termicamente como nos substratos não tratados. Na casca de café, os resultados de concentração de voláteis alcançaram valores maiores do que na polpa e em menor tempo. A concentração máxima de 21,04 $\mu\text{mol/L.g}$ foi observada após 72 horas de cultivo utilizando a casca de café sem tratamento. O metabolismo do fungo foi mais rápido na casca devido a diferenças de composição entre os substratos testados. Na polpa de café, a produção máxima só foi alcançada após 96 horas de cultivo, o que sugere que a casca possui uma composição (Tabela 6) mais adequada ao fungo do que a polpa. Comparando-se os resultados obtidos com outros substratos sólidos, como o bagaço de cana-de-açúcar (CHRISTEN *et al.*, 1997), verifica-se que a produção de voláteis foi mais rápida mas em menor concentração. Já os valores obtidos por SOARES *et al.* (2000), sob as mesmas condições, com exceção da proveniência da casca de café, os resultados foram similares e superiores quando utilizou-se a casca tratada termicamente (28 $\mu\text{mol/L.gMS}$). BRAMORSKI *et al.* (1998), em experimentos com *C. fimbriata* cultivado em meio à base

de bagaço de mandioca, obtiveram concentração de voláteis totais três vezes menores (8,29 $\mu\text{mol/L. gMS}$).

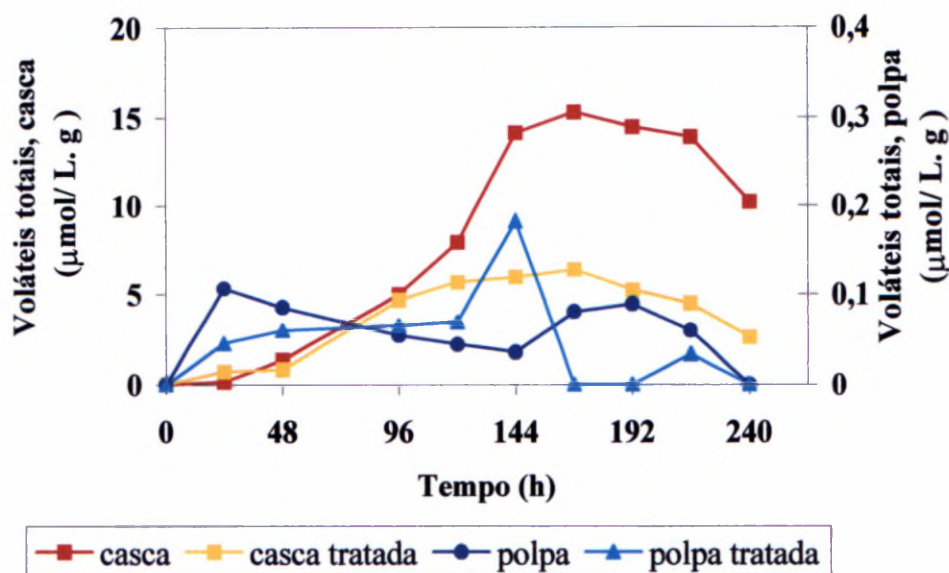
A produção de CO_2 e o consumo de O_2 (%) no cultivo em frascos Erlenmeyer do fungo sobre a casca de café não tratada é mostrada na Figura 11. Atinge-se 1,1 % de CO_2 no “headsace” do frasco em 48 horas. Após 96 horas, quando a produção de voláteis já caiu, observa-se apenas a respiração do microrganismo com consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono. Nesta última fase provavelmente as células já se multiplicaram ao máximo, a glucose já foi consumida quase totalmente e o oxigênio está sendo utilizado somente para manutenção celular.

FIGURA 11: EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CO_2 E CONSUMO DE O_2 POR *C. FIMBRIATA* CBS 374.83 SOBRE CASCA DE CAFÉ EM FES EM FRASCOS



Na Figura 12, observa-se o comportamento da cepa CBS 146.53 sobre os mesmos substratos. Embora o comportamento do fungo tenha sido diferente, o tratamento térmico também não melhorou a produção de voláteis. Os melhores resultados foram alcançados com a casca de café sem tratamento térmico.

FIGURA 12: EVOLUÇÃO DOS VOLÁTEIS TOTAIS PRODUZIDOS POR CBS146.53 SOBRE A CASCA E POLPA DE CAFÉ COM E SEM TRATAMENTO TÉRMICO



Neste caso, a cepa apresentou maior tempo de adaptação ao meio e os resultados obtidos para a concentração de voláteis foram inferiores aos da cepa CBS 374.83. A máxima concentração foi de 15,27 µmol/L. g em 168 horas de cultivo.

Com base nestes resultados, a cepa CBS 374.83 e a casca de café sem tratamento foram selecionadas para a continuidade do estudo e nova otimização de condições de cultivo devido à diferença de comportamento do fungo na casca utilizada, bem como pela produção de voláteis neste substrato.

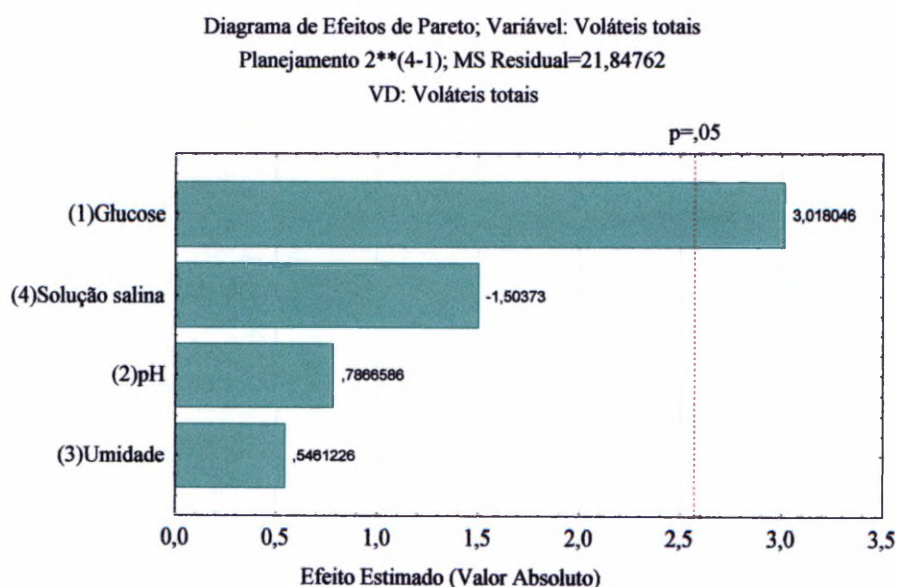
4.3 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO EM FRASCOS

A otimização das condições de cultivo é uma etapa essencial dos processos produtivos, uma vez que se deseja obter a máxima produção em menor tempo e com menores custos. Além disso, etapas posteriores de “downstream”, ou recuperação do

produto, exigem que a produção alcançada seja significativa para que sejam compensados os custos que envolvem as operações de recuperação.

A metodologia de planejamento de experimentos foi utilizada como descrito no item 3.4 e na Figura 13 apresenta-se o Diagrama de Pareto. O planejamento considerou quatro variáveis mais importantes referenciadas por vários autores (CHRISTEN *et al.*, 1997; BRAMORSKI *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000) na produção de voláteis frutais por *C. fimbriata*: pH, teor umidade, adição de solução salina e de glucose.

FIGURA 13: DIAGRAMA DE EFEITOS DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO 2^{4-1} PARA EXPERIMENTOS EM FRASCOS ERLLENMEYER

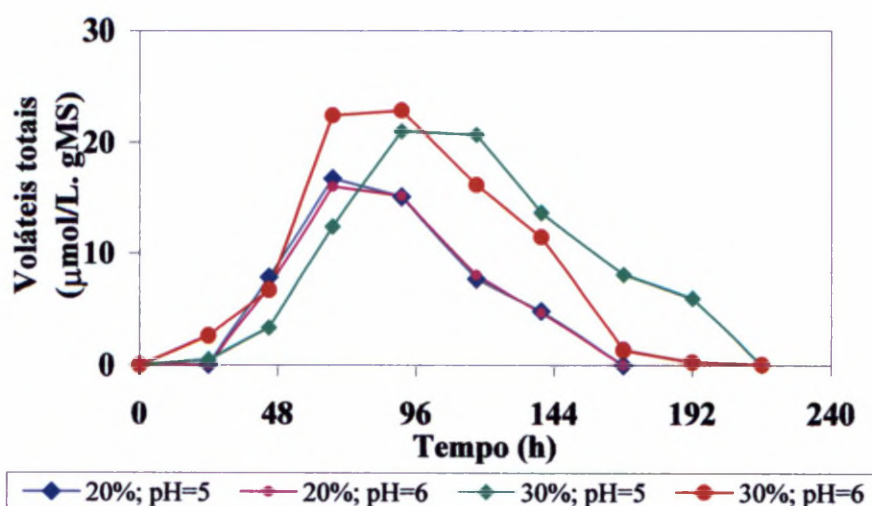


De acordo com os dados da Figura 13, somente a adição de glucose foi significativa ($p < 0,05$) na produção de voláteis totais pelo fungo cultivado sobre a casca de café. Com o aumento de glucose adicionada ao meio de fermentação de 20% para 30%, houve um aumento na produção dos voláteis totais. No Diagrama de Efeitos observa-se ainda que as variáveis pH e umidade, mesmo não sendo significativas nos níveis testados, devem ser mantidas em níveis maiores, pois tendem a aumentar a concentração de voláteis no “headspace”.

A adição de solução salina à casca de café não é necessária. A casca de café deve possuir quantidade suficiente de sais para o desenvolvimento microbiano, fato este também observado por SOARES (1998). Outros resíduos industriais e meios sintéticos, utilizados para produção de aromas por *Ceratocystis fimbriata* em FES, sempre foram suplementados com solução mineral (BRAMORSKI, 1996; CHRISTEN *et al.*, 1997; SENEMAUD, 1988).

No experimento seguinte manteve-se a umidade no nível alto (65%) e o pH e a glucose foram testados nos níveis de 5 e 6 e 20% e 30%, respectivamente. O gráfico da Figura 14 mostra que embora haja diferença na concentração de voláteis, o pH não tem influência tanto quanto o teor de glucose adicionada. Nos experimentos com 20% de glucose os resultados são praticamente os mesmos, e com maiores teores de glucose (30%) percebe-se que em pH inicial corrigido para 6,0, o tempo para se atingir a máxima concentração de voláteis foi menor. Com pH 6,0 o fungo teve menor fase de adaptação ao meio, conseqüentemente, detectou-se o início da produção de aromas em 24 horas. O uso de pH na faixa de 5,0, aliado a uma menor atividade de água para experimentos com maior teor de glucose, fez com que houvesse uma diminuição do catabolismo do microrganismo.

FIGURA 14: CINÉTICA DO CULTIVO EM FRASCOS DE *C. FIMBRIATA* SOBRE CASCA DE CAFÉ EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE

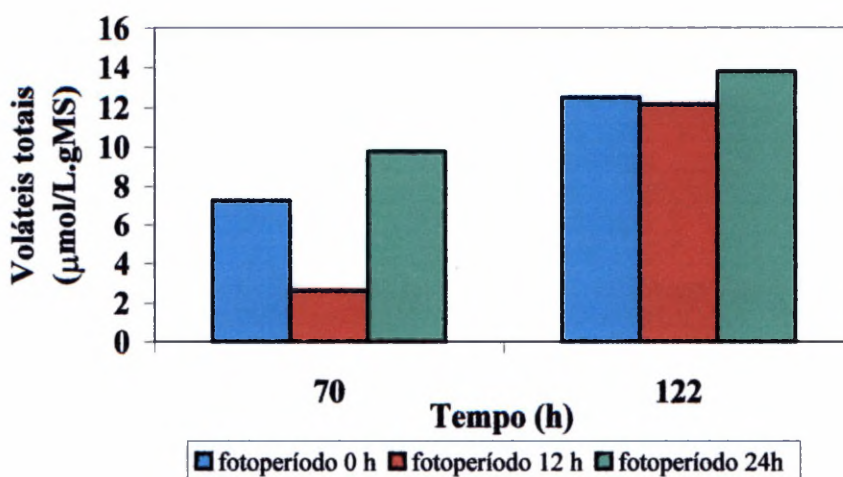


Com 30% de glucose obteve-se maior concentração de voláteis chegando a um máximo de 22,45 $\mu\text{mol/L.gMS}$. Nota-se que a concentração de glucose tem influência direta no metabolismo do fungo e, conseqüentemente, na produção de voláteis.

4.4 EFEITO DA LUMINOSIDADE SOBRE A PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

O efeito da luz sobre os cultivos com *C. fimbriata* foi investigado através de experimentos utilizando três condições distintas de fotoperíodo. Na Figura 15 estão os resultados obtidos com fotoperíodos de 12 e 24 horas e na ausência de luz.

FIGURA 15: CULTIVO EM FRASCOS DE *C. FIMBRIATA* SOBRE CASCA DE CAFÉ EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE



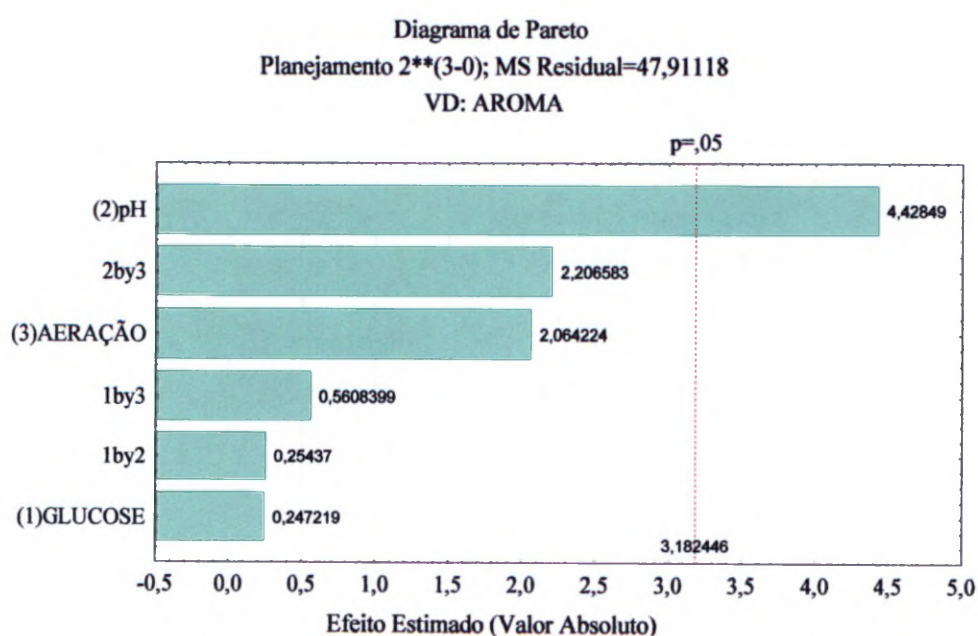
Os resultados para a produção de voláteis totais variaram nas primeiras 70 horas de cultivo, o que pode indicar que durante a fase de adaptação do fungo ao meio há influência das condições de luminosidade sobre a produção de aromas. Quando o cultivo completou 120 horas, atingiu-se a máxima concentração de voláteis e observou-se que períodos distintos de exposição à luz não influenciaram a produção de voláteis.

4.5 FERMENTAÇÃO EM COLUNAS AERADAS

Com intuito de melhorar as condições para a produção de voláteis e observar o comportamento do microrganismo, realizou-se o cultivo sob condições de aeração forçada. A aeração em FES tem como objetivo manter as condições aeróbias, eliminar o CO₂ produzido, regular a temperatura e a umidade do meio.

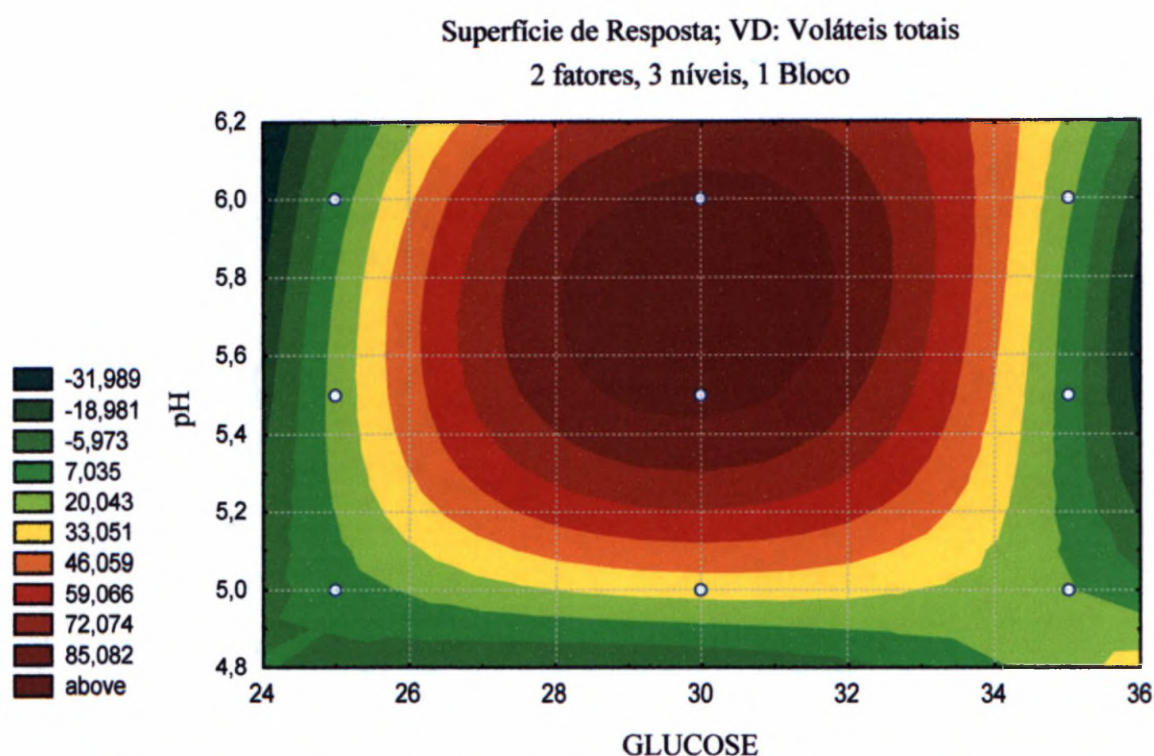
Baseando-se nos resultados obtidos nos experimentos em frascos, as condições de cultivo em colunas foram mantidas em 65% de umidade inicial, inóculo da ordem de 10⁷ esporos/gMS e temperatura de 30° C. O teor de açúcares redutores (adição de glucose), o pH e a taxa de aeração foram testados utilizando planejamento de experimentos. Na Figura 16, o Diagrama de Pareto indica que nos níveis testados, o pH foi significativo e que a condição inicial de pH 6,0 favorece a produção de voláteis, o que confirma os resultados obtidos em frascos. Os teores de glucose adicionados (20%, 25% e 30%) não foram significativos nos níveis testados, indicando que estão bastante próximos do teor ótimo de glucose. No planejamento seguinte testou-se a variável adição de glucose em níveis maiores.

FIGURA 16: DIAGRAMA DE EFEITOS DE PARETO PARA PLANEJAMENTO 2³ EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO



No planejamento 3^2 as variáveis teor de glucose e pH foram testadas em três níveis. Na Figura 17 observa-se a superfície de resposta centralizada para as variáveis otimizadas. O pH ótimo está na faixa de 5,5 a 6,0 e a adição de glucose em torno de 30%.

FIGURA 17: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO 3^2 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO



$$z=129239,3-9128,6x+156,09x^2-45782,16y+3956,44y^2+3237,01xy-280,19xy^2-55,4x^2y+4,8x^2y^2$$

O modelo matemático que se ajusta aos dados experimentais obteve coeficiente de correlação R^2 de 0,894. Segundo Haaland (1989) citado por MACHADO (2002), para um modelo ser adequado o R^2 deve ser no mínimo 0,75. Valores de R^2 em torno de 0,90 são considerados muito bons para processos biológicos. A equação que representa o modelo está apresentada junto ao gráfico da Figura 17, sendo que z é a variável resposta (concentração de voláteis), x é a adição de glucose (%) e y o pH inicial do meio. A Tabela 7 mostra a análise de variância (ANOVA) para o modelo obtido.

TABELA 7: ANOVA PARA PLANEJAMENTO 3^2 EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
(1)Glucose (L)	9,48	1	9,475	0,009080	0,932773
Glucose (Q)	9431,61	1	9431,605	9,038024	0,095120
(2)pH (L)	776,34	1	776,344	0,743947	0,479305
pH (Q)	335,06	1	335,057	0,321075	0,628072
1L by 2L	1,63	1	1,626	0,001558	0,972102
1L by 2Q	130,35	1	130,350	0,124911	0,757546
1Q by 2L	1383,53	1	1383,527	1,325792	0,368621
1Q by 2Q	568,83	1	568,832	0,545094	0,537210
Erro	2087,09	2	1043,547		
Total	19718,39	10			

$R^2=0,894$

Onde: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra;
 p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%);
 R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta;
 L= interação linear;
 Q= interação quadrática.

Na ANOVA (Tabela 7) observa-se que as variáveis e as interações entre as variáveis não foram significativas ($p > 0,05$). Entretanto, para melhor ajuste ao modelo matemático, considerou-se todas as interações entre as variáveis.

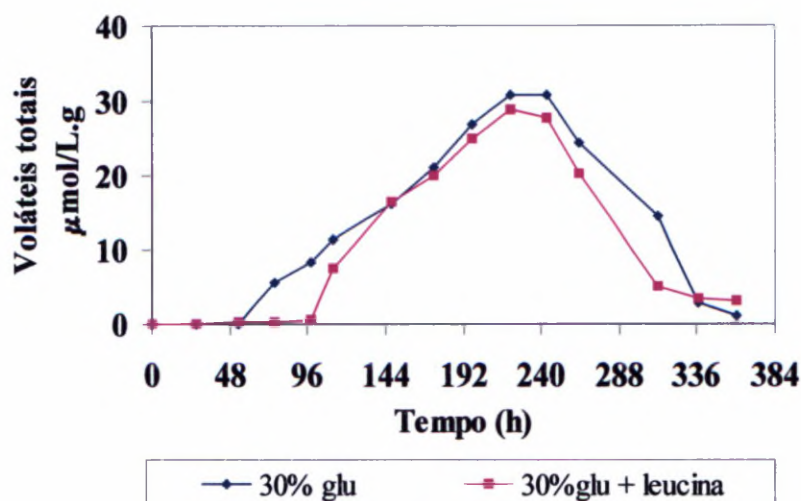
Sob condições de pH (6,0) e adição de glucose (30%), realizou-se uma cinética da produção de voláteis em colunas. A concentração de voláteis totais (Figura 18) e a sua produtividade horária são mostradas na Tabela 8. Observa-se que a máxima concentração de voláteis (30,95 $\mu\text{mol/L. gMS}$) foi obtida após 220 horas de cultivo. Após este tempo a concentração de voláteis começa a diminuir. A maior produtividade horária (r_p) foi de 1,371 $\mu\text{mol/L. gMS.h}$, observada entre 221 e 243 horas de cultivo. A produtividade global de voláteis totais foi de 0,593 $\mu\text{mol/L. gMS.h}$.

TABELA 8: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM 30% DE GLUCOSE

Tempo (h)	Voláteis totais ($\mu\text{mol/L.g MS}$)	r_p ($\mu\text{mol/L.gMS. h}$)
0	0	
27,5	0,05	0,002
54	0,09	0,003
75,5	5,60	0,260
98,5	8,27	0,359
111,5	11,47	0,882
148,5	16,12	0,436
174	21,19	0,831
197	26,94	1,171
221	30,95	1,289
243,5	30,85	1,371
263	24,34	1,248
312,5	14,38	0,290
336,5	2,81	0,117
360,5	1,12	0,046

Quando o aminoácido leucina foi adicionado ao cultivo de *C. fimbriata* pode-se verificar o seu efeito sobre a produção de voláteis. O uso de aminoácidos como precursores de aroma por *C. fimbriata* foi estudado por CHRISTEN *et al.* (1997) e SOARES *et al.* (2000). Segundo esses autores, a presença de leucina aumenta a produção dos ésteres principalmente do acetato de etila e do isoamil acetato, sendo que a concentração máxima é atingida em tempos similares. Na Figura 18 observa-se que, quantitativamente, a mesma concentração de voláteis totais ($30 \mu\text{mol/L.g MS}$) foi atingida, na presença ou na ausência de leucina. Os cultivos possuem o mesmo perfil, não havendo diferença com e sem leucina.

FIGURA 18: FES EM COLUNAS COM CASCA DE CAFÉ COM E SEM LEUCINA



Contudo, verificando a composição do aroma produzido, foi observado que a presença de leucina melhorou ou favoreceu a produção de maior variedade de compostos característicos de aromas frutais como isoamil acetato, isopropil acetato e etil propionato, ésteres distintos do acetato de etila que apresentaram maior concentração no “headspace” dos cultivos. A Tabela 9 mostra a composição do “headspace” dos cultivos com 30% de glucose, pH 6,0, com e sem adição de leucina. Os valores mostrados são aqueles obtidos no tempo em que se observou máxima concentração de voláteis totais.

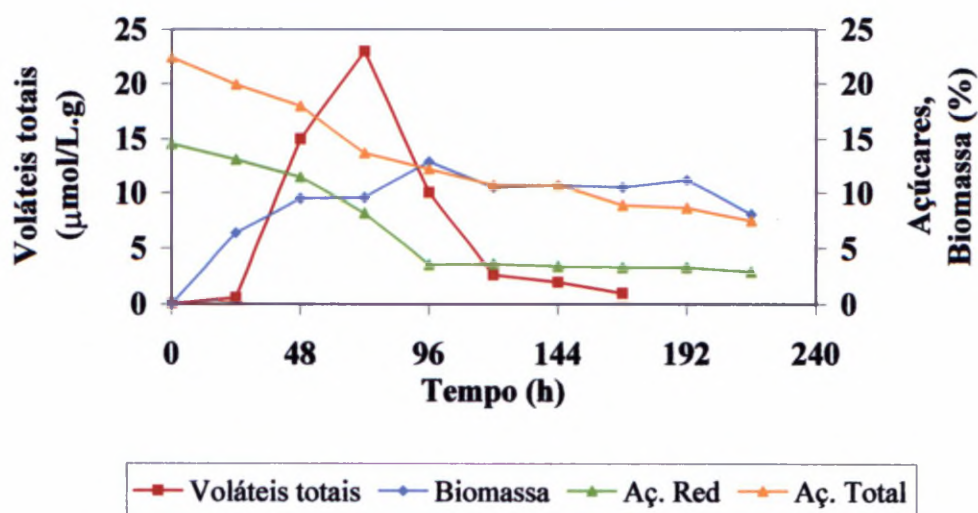
TABELA 9: COMPOSIÇÃO DO “HEADSPACE” DO CULTIVO DE *C. FIMBRIATA* EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM 30% DE GLUCOSE COM E SEM LEUCINA

	Meio com 30% glucose (µmol/L.g)	Meio com 30% glucose + leucina (µmol/L.g)
Acetaldeído	0,14	0,18
A*	0,32	0,84
B*	0,16	1,07
Etanol	0,84	0,35
Acetato de etila	28,55	23,92
Acetato de isopropila	0	0,51
Propionato de etila	0,29	0,41
Isobutirato de etila	0,31	0,31
Acetato de isobutila	0,21	0,12
Butirato de etila	0,11	0,06
Acetato de isoamila	0,04	0,89
D*	0,007	0,006

*Nota: Compostos não identificados

Conhecendo-se as condições ótimas de pH (entre 5,5 e 6,0) e de adição de glucose (30%), realizaram-se experimentos substituindo-se a adição de glucose pelo melaço de cana-de-açúcar e bagaço de mandioca. A Figura 19a apresenta a evolução da produção de voláteis acompanhada pelas curvas de teores de açúcares redutores e produção de biomassa representada pelo aumento do teor proteínas.

FIGURA 19A: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS E BIOMASSA, CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO



A produção de voláteis em casca de café suplementada com melaço (15% de açúcares redutores) foi de $23 \mu\text{mol/L.g}$ em 72 horas de cultivo. Mesmo resultado obtido nos experimentos em frascos quando adicionou-se 30% glucose. A produção de voláteis diminui conforme o consumo de açúcares redutores. A Figura 19a mostra que a biomassa formada, que atinge seu máximo em 96 horas, mantém-se estável até o final da fermentação, mesmo não havendo mais produção de voláteis.

Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros cinéticos relacionados à produção de voláteis em colunas utilizando melaço de cana-de-açúcar.

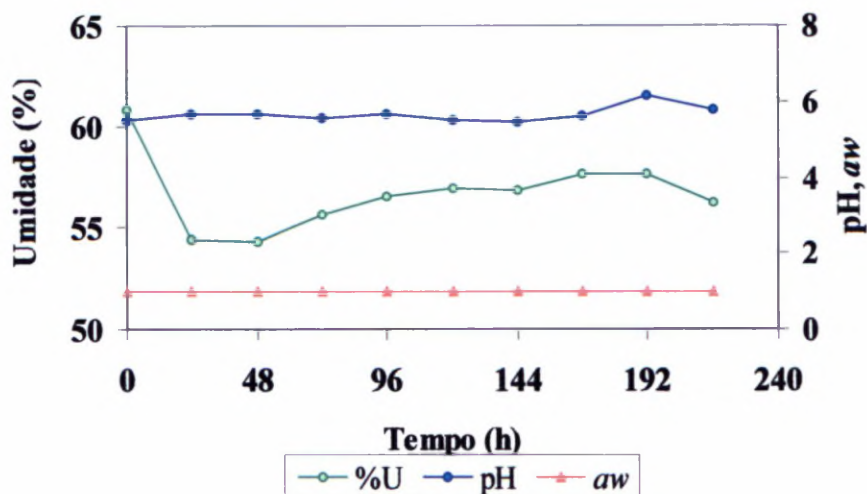
TABELA 10: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM COLUNAS AERADAS EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tempo(h)	Voláteis totais ($\mu\text{mol/L. gMS}$)	r_p ($\mu\text{mol/L.gMS. h}$)
0	0	
24	0,58	0,024
48	14,98	0,624
72	22,98	0,957
96	10,04	0,418
120	2,65	0,110
144	2,00	0,083
168	1,00	0,042
192	0,00	0,000

A produção de voláteis atingiu concentração máxima de 22,98 $\mu\text{mol/L. gMS}$ em 72 horas de cultivo. A produtividade horária máxima (r_p) foi de 0,957 $\mu\text{mol/L. gMS.h}$, observada entre 48 e 72 horas de cultivo. A produtividade global em relação aos voláteis totais produzidos durante o cultivo foi de 0,251 $\mu\text{mol/L. gMS.h}$. Comparando-se estes valores ao cultivo com 30% de glucose, a produtividade global é menor, embora a produtividade horária máxima tenha sido observada em menor tempo de cultivo.

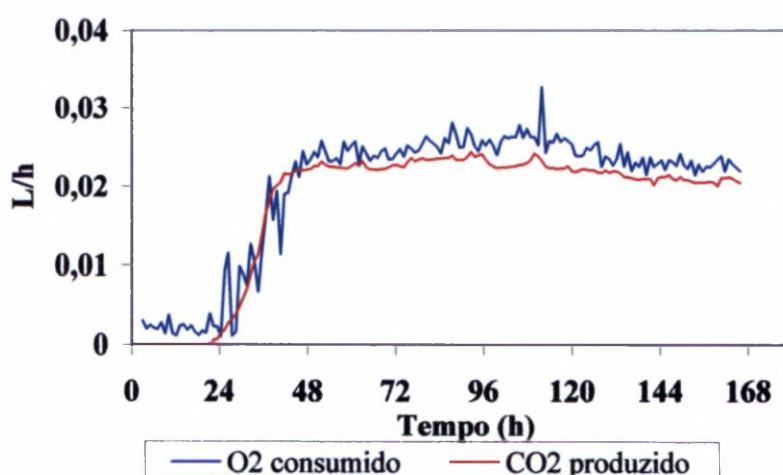
Na Figura 19b, mostra-se que o pH e a atividade de água não sofrem grandes variações durante a fermentação. A umidade do meio cai inicialmente e aumenta com o crescimento do fungo devido à liberação de água durante a respiração.

FIGURA 19B: EVOLUÇÃO DA VARIAÇÃO DE UMIDADE, pH E ATIVIDADE DE ÁGUA EM COLUNAS DE FERMENTAÇÃO



O crescimento do fungo foi acompanhado através da análise respirométrica dos gases na saída da coluna de fermentação. A evolução da produção CO_2 e de consumo de O_2 são apresentados na Figura 20.

FIGURA 20: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE CO_2 E CONSUMO DE O_2 NA SAÍDA DA COLUNA DE FERMENTAÇÃO



A produção de CO_2 teve início a partir das 20 horas de cultivo aerado e aumentou rapidamente até 48 horas, chegando a 0,027 L/h (4%) onde manteve-se constante até o final

do experimento. Observa-se a máxima produção de voláteis a partir de 48 horas, mostrando que o crescimento está parcialmente associado com a produção de voláteis.

A partir dos valores calculados para a taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , foi feita uma estimativa dos parâmetros cinéticos. Para os cálculos utilizou-se o programa FERSOL (RODRIGUEZ-LEÓN *et al.*, 1988) que permite determinar os coeficientes da equação (15) por aproximação sucessiva a partir dos valores da taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 .

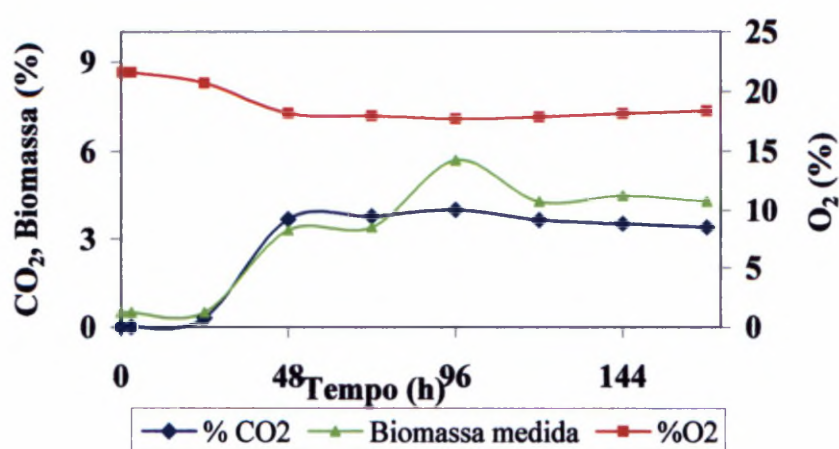
A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para a biomassa nos diferentes tempos considerados, estimados pela equação (X_n) antes reportada. Observou-se um erro relativo de 13,24%. Obteve-se um rendimento de biomassa celular ($Y_{X/O}$) de 3,619 g de biomassa/g de O_2 consumido e um coeficiente de manutenção da biomassa celular (m_X) de 0,0076 g de O_2 consumido/g de biomassa. h. Com base nestes dados, a biomassa fúngica (X_n) foi estimada pela equação (20) apresentada anteriormente, assim como a velocidade de crescimento específica (μ) para cada fase de crescimento. Obteve-se o maior valor de μ de $0,027h^{-1}$, com um coeficiente de regressão de 0,9994, considerando os valores entre 3 e 96 horas.

TABELA 11: PARÂMETROS CINÉTICOS ESTIMADOS EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tempo (h)	Biomassa estimada (X_n)	μ (h^{-1})
0	0,500	0
3	0,495	0,016
24	0,734	0,026
48	1,571	0,027
72	2,642	0,017
96	3,535	0,010
120	4,232	0,006
144	4,668	0,003
168	4,884	0

A evolução das concentrações de CO₂ e de O₂ na saída da coluna de fermentação é mostrada na Figura 21. Observa-se as fases de crescimento do fungo: uma fase de latência de 0 a 24 horas, seguida de uma fase exponencial até 48 horas, na qual o fungo cresceu com maior velocidade. Nesta fase, a concentração de CO₂ atingiu 4% e na Tabela 11, tem-se o valor da velocidade máxima de 0,027 h⁻¹. A partir deste momento, nota-se uma fase de estabilização da concentração de CO₂ em torno de 3,5%. Observa-se ainda um ligeiro aumento da biomassa seguida de sua estabilização em 4,5 g/100g MS.

FIGURA 21: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA E DAS CONCENTRAÇÕES DE CO₂ E DE O₂ NA SAÍDA DA COLUNA DE FERMENTAÇÃO



A biomassa obtida analiticamente (Figura 21) aumentou rapidamente em 48 horas e atingiu um máximo em 96 horas. O CO₂ produzido aumentou até 48 horas acompanhando a evolução da biomassa formada, confirmando também a tendência observada na estimativa de biomassa (Tabela 11). Isto indica que o método indireto de determinação de biomassa celular, através do monitoramento em linha da produção de CO₂ e consumo de O₂, pode substituir a determinação da biomassa celular por métodos analíticos.

Com 20% de bagaço de mandioca adicionado à casca de café, obteve-se uma concentração máxima de voláteis em 72 horas de cultivo de 2,2 µmol/L. g (dados não representados graficamente). A baixa produção de voláteis deve-se provavelmente ao fato

de que o bagaço possui baixo teor de açúcares redutores e o fungo não utiliza o amido presente no bagaço de mandioca como fonte de carbono.

4.6 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR

A cultura de *C. fimbriata* sobre a casca de café em biorreator cilíndrico, com aeração forçada, foi acompanhada durante 192 horas. Determinaram-se as concentrações de açúcares redutores, a evolução de voláteis, o pH, a umidade e o crescimento do microrganismo pela análise cromatográfica dos gases na saída do reator. Nos gráficos das Figuras 22a e 22b estão representados os resultados obtidos.

FIGURA 22A: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE AROMAS, TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES E BIOMASSA DURANTE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR CILÍNDRICO

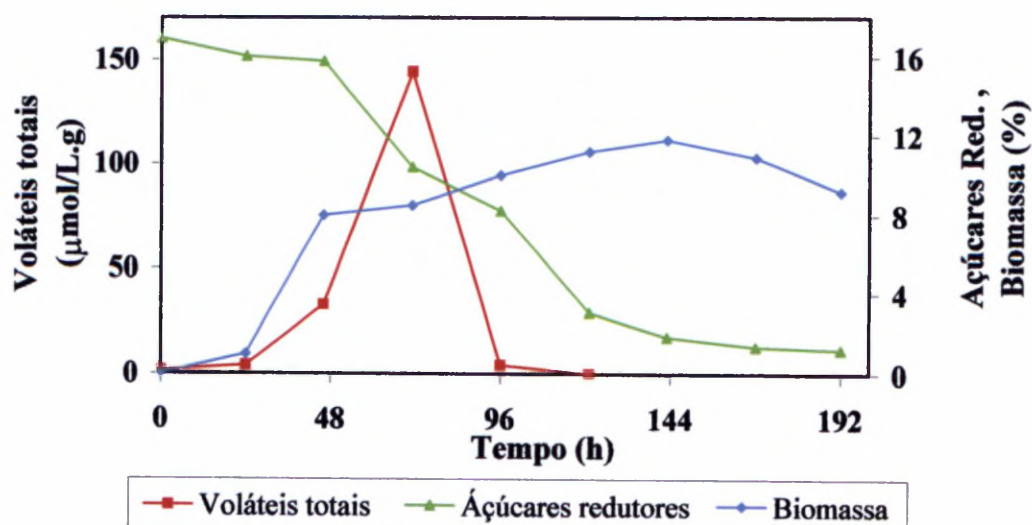
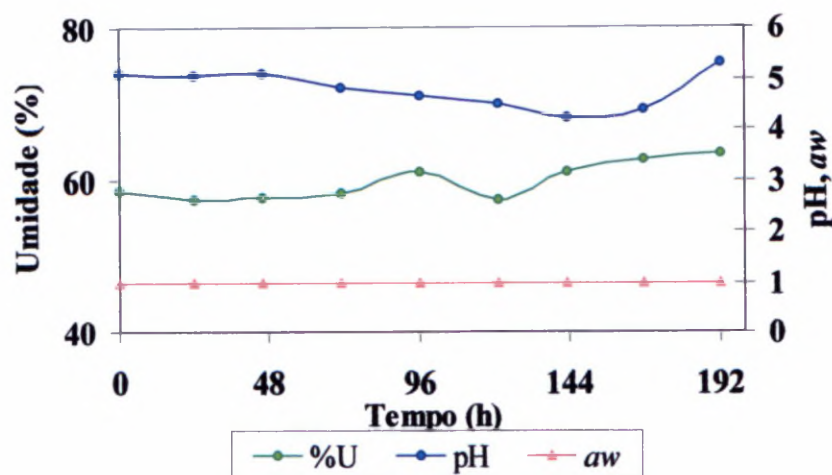


FIGURA 22B: EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA, TEOR DE UMIDADE E pH DURANTE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR CILÍNDRICO



Na Figura 22a observa-se que a glucose é consumida a uma velocidade baixa até as primeiras 46 horas. É rapidamente consumida entre 46 e 120 horas, chegando-se a um consumo máximo de 92% em 192 horas. A atividade de água durante o cultivo manteve-se estável em torno de 0,98 com ligeiro aumento ao final do experimento devido à diminuição do teor de açúcares e a liberação de água durante a respiração do fungo (Figura 22b). O pH do meio que iniciou em 5,5 caiu até 4 devido à produção de compostos voláteis que possuem caráter ácido. Ao final da fermentação, quando não havia mais glucose disponível e a concentração de voláteis era baixa, o pH voltou a subir provavelmente devido à degradação de compostos protéicos liberando amônia. Um rápido aumento da biomassa microbiana é observado em 48 horas de cultivo após o qual há um período de crescimento lento e estabilização da biomassa formada. Na Tabela 12 são apresentados os valores da produtividade de voláteis totais em biorreator cilíndrico.

TABELA 12: PRODUTIVIDADE DE VOLÁTEIS TOTAIS EM BIORREATOR CILINDRICO

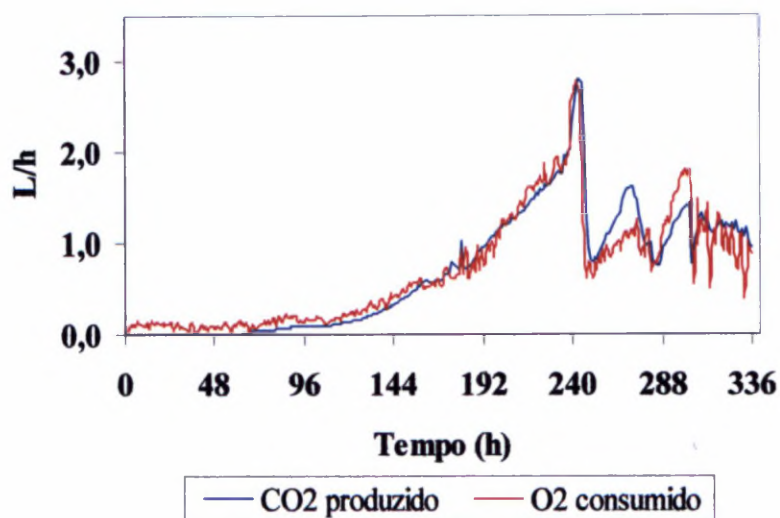
Tempo(h)	Voláteis totais ($\mu\text{mol/L. gMS}$)	r_p ($\mu\text{mol/L.gMS. h}$)
0	1,56	0,06
24	4,15	0,189
46	32,62	1,305
71	144,22	5,769
96	4,25	0,170
121	0	0

A produtividade global de voláteis em biorreator foi de 1,25 $\mu\text{mol/L.gMS. h}$. A produtividade horária máxima foi de 5,769 $\mu\text{mol/L.gMS. h}$ e foi observada entre 46 e 71 horas. A produtividade global foi maior que aquela obtida em colunas (0,593 $\mu\text{mol/L.gMS. h}$). Este valor indica que a produção de voláteis em escala semi-piloto no biorreator foi mais vantajosa que a produção em colunas aeradas. O sistema de homogeneização e distribuição de ar através do substrato podem ter contribuído para melhorar as condições do cultivo do fungo no biorreator.

A análise respirométrica (Figura 23) através dos teores de CO_2 liberados mostra que o crescimento microbiano é composto de uma fase de latência de aproximadamente 48 horas, uma fase exponencial até 220 horas, onde observa-se a máxima concentração de dióxido de carbono, estabilizando-se após 240 horas.

A produção de voláteis em biorreator alcançou 144 $\mu\text{mol/L. g}$ em 71 horas de cultivo. Observa-se que a concentração de CO_2 em biorreator foi superior àquela obtida em colunas, o que pode ter retardado a esporulação e aumentado a produção de voláteis.

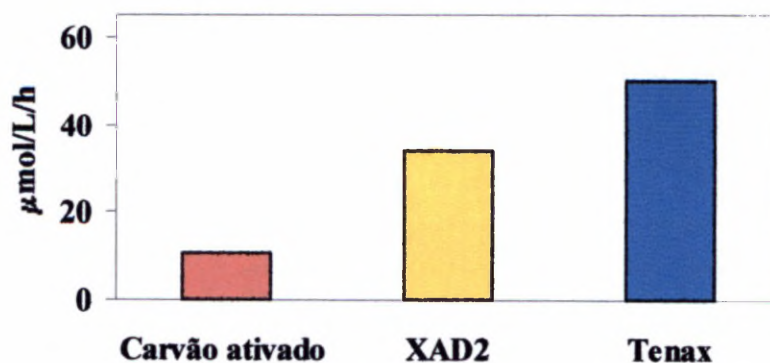
FIGURA 23: EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ E O₂ DURANTE FES DE *C. FIMBRIATA* EM BIORREATOR



4.7 RECUPERAÇÃO DE AROMAS POR ADSORÇÃO

A recuperação dos voláteis que deixavam as colunas de fermentação foi testada utilizando materiais adsorventes como carvão ativado e as resinas Amberlite XAD2 e Tenax. As vantagens das resinas sintéticas sobre o carvão podem ser observadas na Figura 24 e na Tabela 13. Além de hidrofóbicas, as resinas mostraram-se mais eficientes que o carvão.

FIGURA 24: RECUPERAÇÃO DE VOLÁTEIS POR ADSORÇÃO DURANTE FES POR *C. FIMBRIATA* SOBRE CASCA DE CAFÉ



Os compostos que foram adsorvidos no carvão foram aqueles que estavam em maior concentração no “headspace” do cultivo. Acetato de etila, etanol e acetaldeído foram preferencialmente adsorvidos. Os compostos produzidos em menor concentração estavam presentes somente nas colunas contendo XAD2 e Tenax, como observa-se na Tabela 13. As resinas Tenax e XAD2 demonstraram maior afinidade em adsorver o acetaldeído, pois este composto foi recuperado em maior quantidade .

TABELA 13: COMPOSTOS RECUPERADOS POR ADSORÇÃO EM DISTINTOS MATERIAIS DURANTE FERMENTAÇÃO EM COLUNAS PELO FUNGO *C. FIMBRIATA* SOBRE A CASCA DE CAFÉ

	Compostos recuperados ($\mu\text{mol/L/h}$)		
	Carvão ativado	XAD2	Tenax
Acetaldeído	0,11	12,49	43,65
B*	-	0,31	-
Etanol	1,46	3,59	2,09
Acetato de etila	9,05	17,33	4,30
Propionato de etila	-	-	0,02
Acetato de propila	-	0,02	0,01
Isobutirato de etila	-	0,05	0,007
Acetato de isobutila	-	0,18	0,04
Butirato de etila	-	0,04	-
C*	-	0,006	-
Acetato de isoamila	-	0,001	-
D*	-	0,007	-

*Nota: Compostos não identificados

4.8 RECUPERAÇÃO DE AROMAS POR CONDENSAÇÃO DIRETA EM “TRAP” CRIOGÊNICO

A recuperação dos voláteis por condensação direta em “trap” frio com nitrogênio líquido foi o melhor resultado obtido em comparação com o que se obteve nos experimentos de adsorção. Como observa-se na Tabela 14, todos os compostos presentes no “headspace” da coluna de fermentação puderam ser condensados e em concentrações maiores do que aqueles obtidos utilizando colunas adsorventes. A desvantagem da adsorção é o uso de solvente na dessorção dos compostos o que faz com que hajam perdas e além disso muitos compostos podem ser “mascarados” pela presença do solvente. Com a

condensação direta, subestima-se a concentração dos voláteis devido à presença de água condensada nos “traps”. Para se evitar grande quantidade de água acoplou-se uma pré-coluna para reter a umidade da amostra. Dois “traps” foram colocados em série para que, caso houvesse perdas no primeiro “trap”, os compostos que eventualmente passassem fossem capturados no segundo. O maior volume de condensado foi obtido no primeiro “trap”. Os resultados da Tabela 14 mostram as quantidades totais obtidas.

TABELA 14: COMPOSTOS RECUPERADOS POR CONDENSAÇÃO EM DISTINTOS MATERIAIS DURANTE FERMENTAÇÃO EM COLUNAS PELO FUNGO *C. FIMBRIATA* SOBRE A CASCA DE CAFÉ

Composto	Concentração ($\mu\text{mol/L/h}$)
Acetaldeído	27,14
B*	21,79
Etanol	425,44
Acetato de etila	603,63
Propionato de etila	-
Acetato de propila	4,19
Isobutirato de etila	3,27
Acetato de isobutila	2,64
Butirato de etila	5,73
C*	0,7
Acetato de isoamila	0,79
D*	0,19

* Nota: Compostos não identificados

Como já se esperava, estes valores indicam concentrações 32 vezes maiores em relação àquela obtida com resina Amberlite XAD2, 21 vezes maior do que com Tenax e mais que 100 vezes maior do que o resultado obtido utilizando carvão ativado para a recuperação de voláteis.

4.9 ENCAPSULAMENTO DE AROMAS POR “SPRAY-DRYING”

Os compostos produzidos em colunas de fermentação foram encapsulados em uma mistura de maltodextrina e goma arábica e secos por atomização como descrito anteriormente. O pó obtido foi ressuspenso em água e o seu “headspace” foi analisado por cromatografia de gás.

O principal benefício dos aromas obtidos por secagem em “spray-drier” é a estabilidade devido ao fato de que os componentes do aroma não entram em contato direto com o ar. Isto significa que a oxidação e evaporação são evitadas. O resultado é aumento da vida de prateleira. Algumas outras vantagens são maior concentração de aromas, liberação rápida do aroma uma vez rompida a barreira e manuseio seguro de possíveis aromas perigosos (RÉ, 1998).

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos no 3º dia de coleta dos voláteis. Os compostos produzidos em maior concentração foram recuperados com maior eficiência.

TABELA 15: COMPOSTOS PRESENTES NO “HEADSPACE” DO PÓ OBTIDO POR ATOMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO CONTENDO OS VOLÁTEIS PRODUZIDOS EM COLUNAS

Composto	Concentração ($\mu\text{mol/L}$)
Acetaldeído	0,34
Etanol	0,046
Acetato de etila	0,44

Considerando que 34% do teor de sólidos da solução de voláteis foi recuperada na saída do secador, estima-se que 8,29 $\mu\text{mol/L}$ de voláteis totais tenham sido recuperados por encapsulamento durante a fermentação em colunas. As perdas durante a secagem indicam que as condições devem ser otimizadas em relação ao tempo e temperatura de exposição das gotículas.

5 CONCLUSÕES

Com a utilização dos resíduos da agroindústria do café para a produção de compostos voláteis com características frutais em FES, observou-se que a composição físico-química destes substratos é bastante variável conforme a procedência e a safra. As características físico-químicas devem ser previamente conhecidas para que se façam os devidos ajustes, como o teor de açúcares redutores e o pH inicial.

A produção de voláteis em diferentes biorreatores, com e sem aeração forçada, caracterizou o crescimento do microrganismo sob distintas condições e se pôde quantificar a produção de voláteis. Comparando os diferentes sistemas e analisando o comportamento do fungo através da respirometria, verificou-se que *C. fimbriata* é um microrganismo pouco exigente em relação ao oxigênio, fato este observado com o desenvolvimento e produção dos voláteis em concentrações similares em cultivos aerados e naqueles realizados em frascos Erlenmeyer.

A taxa de aeração durante experimentos em colunas parece não influenciar na produção de voláteis e sim no crescimento de *C. fimbriata* sobre a casca de café. Na fase inicial verificou-se um crescimento lento durante a adaptação do microrganismo ao meio. O melhor resultado foi obtido utilizando-se a casca de café suplementada com 30% de glucose e baixa taxa de aeração (0,30 mL/min/ gMS). A concentração de voláteis nestas condições foi de 30 $\mu\text{mol/L}$. gMS.

Observou-se que o teor de açúcares redutores iniciais no meio é essencial para que haja reprodutibilidade nos resultados quanto a composições e concentrações do “headspace” do cultivo. O uso de melaço de cana-de-açúcar foi uma alternativa considerada viável como substituto da adição de glucose ao meio justamente por seu menor custo. Nos cultivos com melaço (15% de açúcares redutores), obteve-se 22,98 $\mu\text{mol/L}$. gMS de voláteis totais em 72 horas. Já o bagaço de mandioca por possuir baixa concentração de açúcares redutores não foi adequado para substituir a glucose. Um teor muito elevado deste substrato (mais que

20%) em relação à casca seria necessário e isto descaracterizaria o estudo, uma vez que se visa uma valorização dos resíduos de café.

A produtividade global de voláteis no biorreator ($1,25 \mu\text{mol/L.gMS. h}$) foi maior que aquela obtida em colunas ($0,593 \mu\text{mol/L.gMS. h}$). Estes valores indicam que a produção de voláteis em escala semi-piloto no biorreator foi vantajosa e que o sistema de homogeneização e distribuição de ar através do substrato podem ter contribuído para melhorar as condições do cultivo do fungo.

Os compostos voláteis puderam ser recuperados por adsorção em diferentes materiais. Os experimentos utilizando Tenax –TA foram aqueles em que se pôde recuperar a maior quantidade de voláteis, embora os ésteres produzidos pelo microrganismo não tenham sido adsorvidos nesta resina. Com a adsorção em Amberlite XAD2 quase todos os compostos produzidos ficaram retidos no material. Em carvão ativado, somente os compostos produzidos em maior concentração foram recuperados. Para melhorar a recuperação por adsorção, as variáveis que envolvem a adsorção devem ser estudadas e otimizadas.

A condensação direta dos voláteis possibilitou quantificar com maior precisão os voláteis produzidos. Foram recuperados $1095,51 \mu\text{mol/L/h}$ de voláteis. Comparando-se este resultado com aqueles observados por análise do “headspace” do cultivo, obtêm-se valores muito maiores. Comprova-se assim, que a técnica de análise por injeção direta do “headspace” subestima a concentração produzida, embora represente precisamente a composição do aroma percebido pelos compostos produzidos.

O encapsulamento por atomização dos compostos produzidos e recuperados em maltodextrina e goma arábica resultou em $8,29 \mu\text{mol/L}$ de voláteis totais recuperados. As condições de secagem devem ser otimizadas para se minimizar as perdas.

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Para futuros trabalhos envolvendo este tema, sugere-se:

- Utilizar o melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações como suplemento de açúcares redutores na casca de café;
- Realizar cultivos em colunas ou no biorreator onde a aeração do meio seja fornecida algum tempo após o início do experimento;
- Produção de voláteis em escala semi-piloto, aprimorando condições de operação do biorreator;
- Estudos para otimizar o encapsulamento dos aromas, testando novos agentes encapsulantes e outras condições de secagem do material encapsulado;
- Melhorar a dessorção dos compostos recuperados por adsorção;
- Confirmar a identificação dos compostos, realizando análise por espectrometria de massa.

REFERÊNCIAS

- AIDOO, K. E.; HENRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid State Fermentation. *Advanced Applied Microbiology*, v.28, p. 201-237, 1982.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas da Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999.
- ARMSTRONG, D. W.; GILLIES, B.; YAMAZAKI, H. Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing in *Flavour Chemistry: Trends and Developments* (ACS 388), p. 105-119, 1989.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*, 2. ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1996, 299 p.
- BERGER, R. G. *Aroma Biotechnology*, Springer- Verlag, Berlin, 1995, 179 p.
- BÖRJESSON, T.; STÖLLMAN, U.; SCHNÜRER, J. Volatile Metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n.12, p. 3705-3710, 1990.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. Nova york; Wiley, 1978.
- BRAMORSKI, A. *Caracterização do crescimento e da produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agro-industriais*. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.
- BRAMORSKI, A.; CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C.R.; REVAH, S. Production of volatile compounds by the fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotechnology Letters*, v.20, n. 4, p. 359-362, 1998.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v, 27, p. 127-133, 2000.
- CANNEL, E. e MOO-YOUNG, M. Solid State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, June/July, p. 2-7, 1980.
- CHEETAM, P. S. Combining the technical push and business pull for natural flavours. In: *Biotechnology of aroma compounds*, Ed. R. G. Berger, Berlin, p. 3-49, 1996.
- CHRISTEN, P. & RAIMBAULT, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*, v.13, n. 7, p.521-526, 1991.
- CHRISTEN, P.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymes and food flavor – a review. *Food Biotechnology*, v.8, n. 2, p. 167-190, 1994.
- CHRISTEN, P. Producción de aromas por fermentación en medio sólido. *Tópicos de investigación*

y posgrado, vol. IV, n. 2, p. 102-109, 1995.

CHRISTEN, P.; MEZA, J. C. ; REVAH, S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata* : influence of the substrate type and the presence of precursors, *Mycological Research*, v.101,n. 8, p. 911-919, 1997.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. Coffee. Londres: Elsevier, 1985, v.1, 305p.

COLLINS, R. P.; MORGAN, M. E. Identity of fruit-like aroma substances synthesized by endoconidial-forming fungi. *Phytopathology*, n..52, p. 407-409, 1961.

CRINI, G.; MORIN, N.; ROULAND, J. C.; JANUS, L.; MORCELLET, M. Adsorption de beta-naphtol sur des gels de cyclodextrine-carboxyméthylcellulose réticulés. *European Polymer Journal*, in press, 2001.

DAVIES, R.; FALKINER, E. A.; WILKINSON, J. F.; PEEL, J. L. Ester formation by yeasts - Ethyl acetate formation by *Hansenula* species. *Biochemistry Journal*, n. 49, p. 48-61, 1951.

DOELLE, H. W. Biotechnology of Solid Substrate Fermentation in the Production of Food. *ASEAN Food Journal*, v.1, n. 1, p.10-14, 1985.

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

FENNEMA, O.R. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 1993.

GERVAIS, P. & SARRETE, M. Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* growing on solid substrate. *Journal of Fermentation and Technology*, v. 69, n. 1, p. 46-49, 1990.

GROSS,B.; ASTHER, M. Arômes de basidiomycetes: caracteristiques, analyses et productions. *Sciences des Aliments*; v.9, p. 427 – 454, 1989.

HESELTEINE, C.W. ; WANG, H. L. Traditional fermented foods. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. IX, p. 275-288, 1987.

HUBBALL, J. A.; COLLINS, R. P. A. study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variispora*. *Mycologia*. v. 70, p. 117-129, 1978.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ (Secretária de estado da Saúde). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, 1985, 523 p.

IBÁÑEZ, E.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, v.63, n. 2, p. 281-286, 1998.

INOUE, Y.; FUKUDA, K.; WAKAI, Y.; SUDSAI, T.; KIMURA, A. Ester Formation by *Hansenula mrakii* IFO 0895: Contribution of Esterase for Iso- amyl Acetate Production in Sake Brewing. *Lebensm. - Wiss. U.- Technology*, v.27, p. 189 - 193, 1994.

ITO, K.; YOSHIDA, K.; ISHIKAWA, T.; KOBAYASHI, S. Volatile Compounds Produced by the

Fungus *Aspergillus oryzae* in Rice Koji and Their Changes during Cultivation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70, n. 3, p.169-172, 1990.

JANSSENS, L.; De-POORTER, H.L.; VANDAMME, E.J.; SCAHMP, N.M. Production of flavours by the yeast *Hansenula mrakii*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. v.52, n. 4, 1987.

JANSSENS, L.; De-POORTER, H.L.; DEMEY, L.; VANDAMME, E.J.; SCAHMP, N.M. Fruity flavors by fermentation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. v. 53, n. 4b, 1988.

JANSSENS, L.; DE POORTER, H. L.; VANDAMME, E. J.; SCHAMP, N. M. Production of Flavours by Microorganisms. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 195-215, 1992.

KOLICHESKI, M. B. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca. *Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Tecnologia Química*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

LATRASSE, A.; DEGORCCE-DUMAS, J. R.; LEVEAU, J. Y. Production d'arômes par les microorganismes. *Sciences des Aliments*, v.5, p. 1-26, 1985.

LANZA,E.; KO,K.H.; PALMER,J.K. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 24, n. 6, p. 1247-1250, 1976.

LEE, S.L & CHOU, C.C. Growth and production of γ -decalactone and Cis-6-Dodecen-4-olide by *Sporobolomyces odorus* in the presence of fatty acids and oils. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v. 78, n. 1, p. 114-116, 1994.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 7, p. 258-265, 1985.

MACEDO, G.A.; PASTORE,G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n. 2, p. 115-119, mai-ago, 1997.

MACHADO, C.M.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA₃) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA₃ em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro. Curitiba, 2002, 95 f. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná.

MAGA, J.A. Lactones in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, september, 1976. p.1-56.

MASSON, M.L.; SOCCOL,C.R.; VASSÃO, E.; VENTURA,I.; PINHEIRO, L.I.; SCHUTZ,J.G.; MATOS,M.E.; FONTOURA, P.S.G. Tecnologia do café (Parte I). *Boletim do CEPPA*. v.2, n. 1, p. 1-16, 1984.

MEDEIROS, A. B. P. Produção de Compostos Voláteis Aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em Fermentação no Estado Sólido. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

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

Journal, v.6, p. 33-39, 2000.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; CHRISTEN, P.; FREITAS, R.J.S.; FONTOURA, P. S. G.; SOCCOL, C. R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on packed bed column bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p. 767-771, 2001.

Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2002.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, Characteristics and Potential. In: *Solid state fermentation*, DOELLE, H.W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C.E. London: Elsevier Science Publisher, p. 1-16, 1992.

MONTEIRO, C.L.B. *Técnicas de Avaliação Sensorial*. 2 ed. Universidade Federal do Paraná, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, 1984, p.1-19.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 153, p. 375 - 380, 1945.

OHLOFF, G. Recent developments in the field of naturally occurring aroma components. p.431-527, 1977.

OMELIANSKI, V. L. Aroma-producing microorganisms. *Journal Bacteriology*, v. 8, p.393-419, 1923.

ORIOLE, E.; CONTRERAS, R.; RAIMBAULT, M. Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *Aspergillus niger*, *Biotechnological Techniques*, v. 1, p. 79-84, 1987.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asistech Publishers, 2001, 221p.

PARLIMENT, T. H. Sample Preparation Techniques for Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Biologically Derived Aromas. In: *Biogeneration of Aromas*, American Chemical Society, p. 34-52, 1986.

PARK, Y. K.; ZENIN, C.T.; UEDA, S.; MARTINS, C. O.; NETO, J.P.M. Microflora in *Beiju* and their biochemical characteristics. *Journal of the Fermentation Technology*, v. 60, n. 1, p. 1-4, 1982.

PASTORE, G. M.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruit aroma by *Neurospora* from *beiju*. *Mycology Research*, v. 98, n. 11, p. 1300-1302, 1994.

PERRAUD, I. G. *Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulp de café*. Montpellier, 1996. Tese (doutorado) – Universidade de Montpellier II.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation, *European Journal of Applied Microbiology*, v. 9, p. 199-209, 1980.

RAIMBAULT, M. General and Microbiological aspects of solid substrate fermentation. *International Training Course - Solid State Fermentation*, 1997.

- RÉ, M. I. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying technology*, v.16, n. 6, p. 1195-1236. 1998.
- RÉ, M. I. Microencapsulação – em busca de produtos inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, n. 162, julho, 2000.
- RICHARD, H. & MULTON, J.L. *Les arômes alimentaires*. Collection Sciences & Techniques Agro-Alimentaires. Tec &Doc-Lavoisier, Paris, 1992. 436p.
- RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; SASTRE, L.; ECHEVARRÍA, J. ; DELGADO, G. A mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation. *Acta Biotechnologica*, v. 8, n. 4, p. 307-310, 1988.
- ROUSSOS, S.; AQUIÁHUATL, M. A.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; PERRAUD, I. G.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp: isolation, screening, characterization, selection of caffeine degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 42, n. 5, p. 756-762, 1995.
- SARHY-BAGNON, V. production de 6-pentyl-a- pyrone par *Trichoderma harzanium* cultivé sur support solide, *These de Doctorat*, Université Montpellier II, 1999.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Controle du metabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivate sur support solide. *These de Doctorat*, Université Montpellier, 1991.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; LONSANE, B. K.; NAVARRO, J. M.; ROUSSOS, S.; DUFOUR, D.; RAIMBAULT, M. On -line Automated monitoring and Control Systems for CO₂ and O₂ Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochemistry*, v. 29, p. 13-24, 1994.
- SENEAUD, C. *Les champignons filamenteux producteurs d' arômes fruités*. Etudes de faisabilité sur substrats agro-industriels. Ph.D. Thesis, Université de Bourgogne. France, 1988.
- SHULLER, M.L.; KARGI, F. Major metabolic pathway. In *Bioprocess engineering: basic concepts*. Printice Hall, New Jersey, 1992. p.128-147.
- SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 5, p. 322-329, 2000.
- SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.9, p. 251-260, 2000.
- SOARES, M. Biossíntese de metabólitos voláteis frutais por *Pachysolen tannophylus* e *Ceratocystis fimbriata* pela fermentação no estado sólido sobre casca de café. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 35, p.857-861, 2000.
- SOCCOL, C. R. *Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação a produção*

de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus*. Tese apresentada ao concurso público de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 228 p.

SOCOL, C. R. Developpement de bioprocedés pour la valorization post-recolt de produits et sous-produits agricoles tropicaux. Provence, 2001. Mémoire en vue de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR) à la Université de Provence.

SOCOL, C.R. & VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid state fermentation in Brazil, *Biochemical Engineering Journal*, 2003.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, v. 160, p. 61 - 68, 1944.

SOUCHON, I.; ROJAS, J.A.; VOILLEY, A.; GREVILLOT, G. Trapping of Aromatic Compounds by Adsorption on Hydrophobic Sorbents. *Separation Science and Technology*, v. 31, n. 18, p. 2473-2491, 1996.

SPINLER, H.E. & DIJIAN, A. Bioconversion of aminoacids into flavouring alcohols and esters by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 264-269, 1991.

SUNESSON, A.; VAES, W. H.; NILSSON, C.; BLOMQUIST, G.; ANDERSSON, B.; CARLSON, R. Identification of Volatile Metabolites from Five Fungal Species Cultivated on Two Media. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 2911-2918, 1995.

TRESSL, R.; JENNINGS, W. G. Production of volatile compounds in the ripening banana. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 20, n. 2, p. 189-192, 1972.

TSUGITA, T.; IMAI, T.; DOI, Y.; KURATA, T.; KATO, H. GC and GC-MS Analysis of Head-space Volatiles by Tenax Trapping Techniques. *Agriculture Biology Chemistry*, v. 43, n. 6, p. 1351-1354, 1979.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 105-169, 1989.

YAMAUCHI, H.; AKITA, O.; OBATA, T.; AMACHI, T.; HARA, S.; YOSHIZAWA, K. Production and application of a fruity odor in solid-state culture of *Neurospora* sp using pregelatinized polish rice. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n. 11, p. 2881-2886, 1989.

YOSHIZAWA, K.; YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AKITA, O.; HARA, S. Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 2129-2130, 1988.

VERVACK, W. *Analyse des Aliments – Methods courants d'analyse*. Louvain la Neuve: Laboratoire de Biochemie de la Nutrition, UCL, 1973. 45p.