

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

PRODUÇÃO DE BIOAROMA FRUTAL UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

HELENA GOMES SILVA¹, DANIELE SOUZA DE CARVALHO²

¹Graduanda em Engenharia de Biossistemas, Bolsista PIBIC, CNPq, IFSP, Campus Avaré, helenagomes@aluno.ifsp.edu.br

² Professora orientadora, IFSP, Campus Avaré, danisc31@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.02-8 - Microbiologia Industrial e de Fermentação

RESUMO: O Brasil está entre os maiores produtores agrícolas do mundo, gerando uma grande quantidade de resíduos agroindustriais como cascas de frutas e soro de leite, que podem ser reutilizados através da biotecnologia. Aromas naturais são aqueles obtidos exclusivamente de métodos físicos ou enzimáticos, sendo cada vez mais aclamados por consumidores que preferem alimentos saudáveis. O gênero *Neurospora sitophila* é produtor de hexanoato de etila, um éster conhecido por seu característico aroma frutal. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar o melhor resíduo para a produção do hexanoato de etila, utilizando-os como meios de cultivo, sendo o soro de leite e casca de jabuticaba, na concentração de 10% m/v diluídos em 100mL de água destilada, incubados em shaker de bancada, a 200 rpm e 30 °C, com amostras coletadas a cada 24 horas por um período de fermentação de 72 horas. O experimento foi registrado através de um cromatograma gerado por um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC) e quantificado através da curva analítica. O soro de leite apresentou maior produção de hexanoato de etila quando comparado com a casca de jabuticaba, com uma produção de 0,52 mg.L⁻¹, em um período de 72 horas.

PALAVRAS-CHAVE: soro de leite; casca de jabuticaba; *Neurospora sitophila*; hexanoato de etila.

PRODUCTION OF FRUITY BIOAROMA USING AGROINDUSTRIAL WASTES

ABSTRACT: Brazil is among the world's largest agricultural producers, generating a significant amount of agro-industrial waste, such as fruit peels and whey, which can be reused through biotechnology. Natural flavors are those obtained exclusively through physical or enzymatic methods, and are increasingly favored by consumers seeking healthy foods. The *Neurospora sitophila* genus produces ethyl hexanoate, an ester known for its distinctive fruity aroma. Therefore, this study aimed to determine the optimal waste material for the production of ethyl hexanoate, using whey and jabuticaba peel as cultivation media. These were used at a concentration of 10% w/v, diluted in 100 mL of distilled water, and incubated in a shaking incubator at 200 rpm and 30°C, with samples collected every 24 hours over a 72-hour fermentation period. The experiment was documented via a chromatogram generated by a gas chromatograph coupled with a flame ionization detector (GC-FID) and quantified using an analytical curve. Whey demonstrated higher production of ethyl hexanoate compared to jabuticaba peel, yielding 0.52 mg.L⁻¹ over the 72-hour period.

KEYWORDS: Whey; jabuticaba peel; *Neurospora sitophila*; ethyl hexanoate.

INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define aromas como substâncias ou mistura de substâncias com propriedades aromáticas, capazes de conferir ou aumentar o aroma ou sabor dos alimentos, podendo ser naturais (obtidos através de métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos), ou sintéticos (Resolução Nº 725, de 1 de julho de 2022).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2023), em 2020 o Brasil produziu aproximadamente 47.000 toneladas de queijo de leite de vaca integral, que geraram em torno de 423.000 toneladas de soro de leite, pois de um quilograma de queijo é possível obter-se 9 litros de soro de leite (Florêncio *et al.*, 2013).

O processamento de frutas gera resíduos agroindustriais, como as cascas, que muitas vezes são descartadas no meio ambiente e se tornam um grande poluente. Dessa maneira, a utilização desses resíduos surge como alternativa para obtenção de insumos para indústrias alimentícias, químicas, farmacêuticas e/ou cosméticas (Pinto *et al.*, 2017 *apud*. Ansiliero *et al.*, 2020). A casca da jabuticaba é um resíduo rico em compostos fenólicos com capacidade antioxidante e fibras (Almeida *et al.*, 2020). Em sua pesquisa, Santiago *et al.* (2021) realizou a caracterização físico-química da farinha de jabuticaba, obtendo como resultados valores eficazes de pH, açúcares redutores e pectina, mostrando que é possível utilizá-la como substrato para processos fermentativos.

O gênero *Neurospora*, pertencente a um grupo de fungos filamentosos, é relatado como produtor de hexanoato de etila. Este éster cuja fórmula molecular é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, caracteriza-se por ser um líquido incolor com ponto de ebulição a 168°C e forte aroma frutal com notas de abacaxi, maçã, morango e pêssego. Seu limiar de detecção (*threshold*) é de 1mg.L^{-1} , sendo muito utilizado em bebidas alcoólicas, sorvete, produtos de panificação, doces e geléias (Carvalho *et al.*, 2012).

Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar o melhor resíduo agroindustrial para a produção de hexanoato de etila em um período de 72 horas de fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção do aroma foram utilizados o soro de leite e farinha de jabuticaba doados por empresas e produtores locais, com as coordenadas 23°05'59"S 48°55'22"W e 20°49'00"S 49°22'57"W. Os meios de cultura para o *Yeast Malt Broth* (YM), reagentes e padrões analíticos utilizados no projeto foram adquiridos pelo IFSP- campus Avaré. O 2-heptanol (padrão interno) foi doado pelo laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. A *Neurospora sitophila* nº CCT 5055 foi obtida da Fundação André Tosello.

As cascas das frutas foram secas em estufa com circulação de ar a 60°C por 24 horas. Depois de secas e frias foram trituradas em moinho multiuso SL-35.

A linhagem de *Neurospora sitophila* foi repicada em tubos contendo PDA (*Potato Dextrose Agar*) por 72 horas, após foram acrescidos de 10 mL de água estéril, raspados e transferidos para *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio líquido YM (composto de 0,5% de peptona, 1% de glicose, 0,3% de extrato de malte e 0,3% de extrato de levedura) e acondicionados em *shaker* de bancada sob condições 200 rpm e 30 °C por 24 horas. A biomassa foi recolhida através de um sistema de filtração a vácuo usando um funil Buchner e lavada com água estéril.

Um grama da linhagem de *Neurospora sitophila* nº CCT 5055, após o preparo do inóculo, foi adicionada ao meio com concentração de 10% m/v de resíduos agroindustriais diluídos em 100 mL de água destilada. Foram dois tratamentos, sendo:

I: uso do soro de leite;

II: uso da farinha da casca de jabuticaba.

Após a inoculação, os frascos *erlenmeyers* foram agitados em vórtex por 30 segundos, para a seguir serem incubados em *shaker* de bancada, a 200 rpm e 30°C. As amostras foram coletadas a cada 24 horas por um período de fermentação de 72 horas e congeladas para posterior análise.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e um branco de cada tratamento foi realizado.

Para a extração do analito de interesse, 5 mL do meio fermentado foram transferidos para tubo de ensaio e adicionados com 0,1 g de NaCl, agitando-se em vórtex por 10 segundos, sendo em seguida, adicionado 1 mL de éter etílico contendo 0,003% v/v de 2-heptanol (padrão interno), agitando novamente em vórtex por 30 segundos e realizando-se a extração com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um vial de 1,5 mL contendo 0,1 g de NaCl.

Cada experimento foi registrado através de um cromatograma, gerado por um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific) acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC). Um microlitro do extrato foi injetado através de um injetor *split/splitless* a uma temperatura de 250°C, no modo *splitless*. Uma coluna capilar de sílica fundida TR-5 de 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura de fase estacionária foi utilizada para separar os componentes voláteis. Gás Hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹. A programação de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 50°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, em seguida foi adicionada uma rampa de 10°C.min⁻¹ até atingir 150°C permanecendo durante 1 minuto e, posteriormente, uma rampa de 20°C.min⁻¹ até 200°C, a qual foi mantida por 3 minutos. A temperatura do detector foi de 250°C.

A quantificação foi realizada através de uma curva de calibração externa, com 10 concentrações de hexanoato de etila, variando-se de 0,25 até 50mg.L⁻¹. Como critérios de identificação foram utilizados comparação do tempo de retenção e fortificação da amostra com o padrão analítico do hexanoato de etila.

Os resultados obtidos foram analisados, obtendo-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação de cada tratamento bem como a análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é possível visualizar as médias das maiores áreas relativas encontradas nas amostras, bem como a concentração de hexanoato de etila.

TABELA 1. Maiores áreas relativas encontradas.

Tempos de fermentação	Áreas relativas dos picos das amostras fermentadas	Concentração de hexanoato de etila (mg.L ⁻¹)
Soro de leite 72h	0,0604 ± 0,0709	0,5244
Farinha de casca de jabuticaba 48h	0,0394 ± 0,0037	0,2854

A Figura 1 mostra a identificação do analito de interesse feita a partir dos cromatogramas gerados após a corrida cromatográfica através da comparação do tempo de retenção entre o pico alvo e o do padrão do hexanoato de etila, juntamente com a da fortificação das amostras com 1 µL da solução de hexanoato de etila na concentração de 20 mg.L⁻¹.

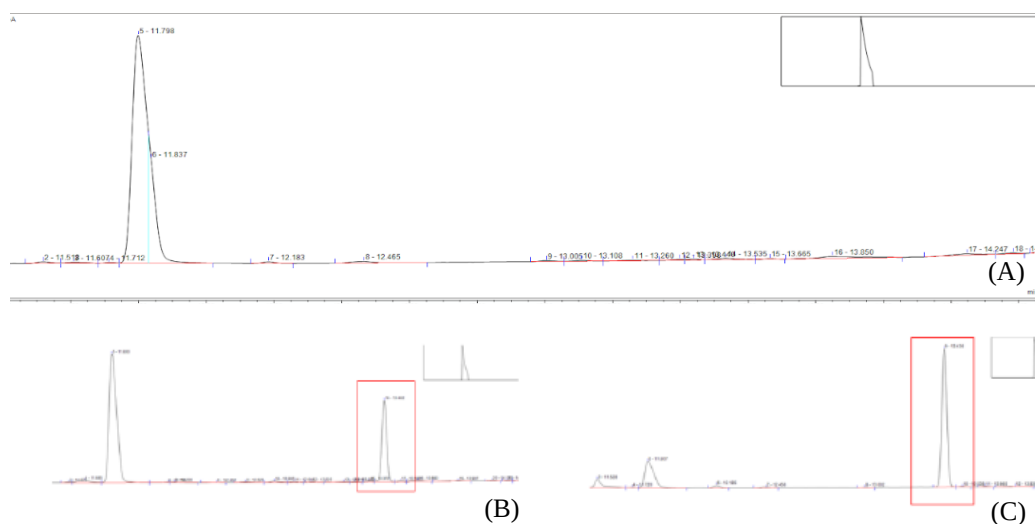


FIGURA 1. (A) Amostra sem inoculação, (B) amostra inoculada em meio contendo soro de leite e (C) amostra fortificada.

O tempo de retenção (TR) na cromatografia é o tempo necessário da substância eluir a coluna, após a injeção. Observa-se na Figura 1 (A) a ausência do pico no TR do hexanoato de etila o que significa que na amostra sem a inoculação do microrganismo, ou seja, o branco não tem esse composto no meio de cultura.

A descoberta do tempo de retenção, para utilização na comparação, foi obtida durante o processo, sendo os TR dos padrões utilizados, em torno de 13,293 a 13,402 minutos para o hexanoato de etila e em torno de 11,715 a 11,817 para o padrão interno. A variação presente nos tempos de retenção se deve a injeção das amostras serem feitas de forma manual. A partir do TR do padrão de hexanoato de etila, observou-se nas amostras fermentadas se havia pico produzido nesse TR.

Além disso, como denotado, a fim de procurar outra ferramenta de confirmação de que o pico encontrado era do hexanoato de etila, foi utilizada a fortificação das amostras a fim de se observar o aumento da área nesse pico. É evidente na Figura 1 pela comparação dos tamanhos dos picos no TR do analito de interesse (B), o aumento do mesmo após a fortificação ser feita (C).

O Gráfico 1 traz os dados das concentrações de hexanoato de etila produzidas nos tempos de 24h, 48h e 72h no meio com soro de leite, sendo a maior produção no tempo de 72h com 0,52 mg.L⁻¹.

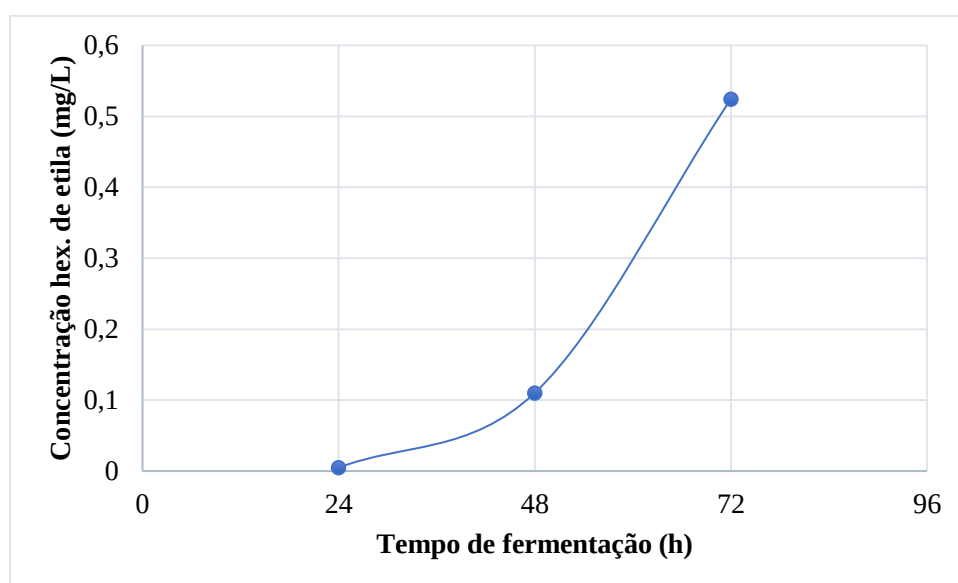


GRÁFICO 1. Produção de hexanoato de etila no meio de cultura contendo soro de leite com 10% m/v.

O Gráfico 2 apresenta os resultados obtidos para a produção do éster de interesse no meio com farinha de casca de jabuticaba, nos tempos de 24h, 48h e 72h, sendo a maior produção em 48h com 0,2854 mg.L⁻¹ de hexanoato de etila.

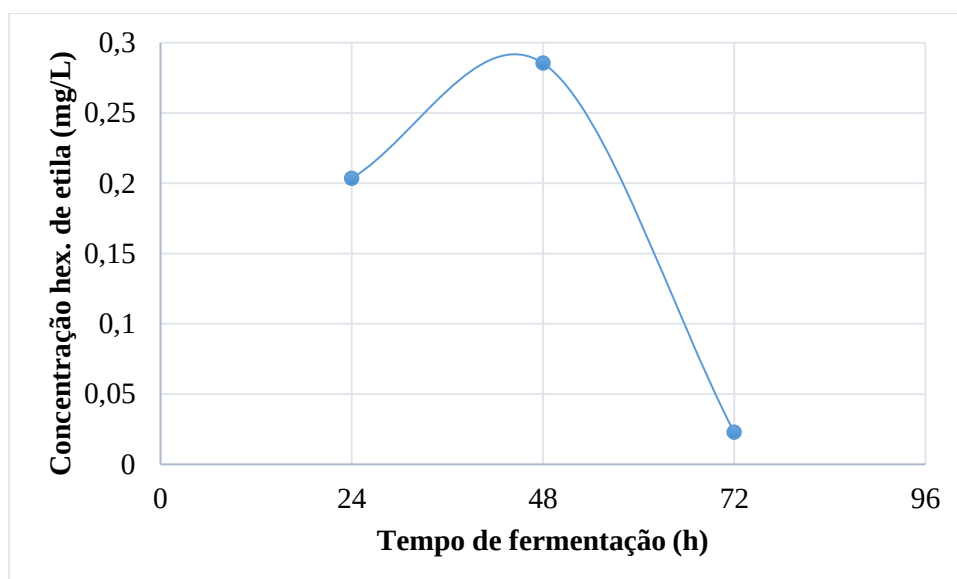


GRÁFICO 2. Produção de hexanoato de etila no meio de cultura contendo farinha de casca de jabuticaba com 10% m/v.

A *Neurospora sp.* produz hexanoato de etila em resíduos agroindustriais, pois tem a capacidade de excretar enzimas extracelulares, utilizando os componentes presentes no soro de leite e na farinha de casca de jabuticaba, como compostos fenólicos com capacidade antioxidante e fibras (Almeida *et al.*, 2020).

Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre o uso de soro de leite e farinha de casca de jabuticaba como meios de cultivo para produção de hexanoato de etila através da linhagem *Neurospora sitophila*, corroborando com uma pesquisa na qual se utilizou bagaço de malte e manipueira, juntamente com a adição de óleo de soja, para a produção de hexanoato de etila por *Neurospora sitophila* culminou em patente de invenção (Pastore *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

Ambos os resíduos produziram hexanoato de etila, sendo o soro de leite o maior produtor entre eles. Para pesquisas futuras, pode-se considerar o uso combinado dos dois resíduos, bem como a utilização de precursores e otimização de parâmetros do processo fermentativo. A *Neurospora sitophila* inoculada no soro de leite mostrou um crescimento interessante, trazendo a opção do uso desse na etapa de pré-inóculo, minimizando os custos para a produção do bioaroma frutal.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Silva. H. G. procedeu com a metodologia, experimentos, análise de dados, discussão dos resultados e redação do trabalho. Carvalho, D. S. atuou na concepção do trabalho, experimentos, análise de dados e discussão dos resultados.

Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a agência de fomento que tornou viável a execução deste trabalho: o CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. L.; SANTOS, N. C.; PEREIRA, T. dos S.; SILVA, V. M. de alcântara; CABRAL, M. B.; BARROS, E. R.; SOUZA, N. C. de; LUIZ, M. R.; AMORIM, F. V.; SILVA, L. R. I. da.

Determination of bioactive compounds and physicochemical composition of jabuticaba bark flour obtained by convective drying and lyophilization. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e157911876, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i1.1876. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/1876>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ANSILIERO, R., CANDIAGO, N. T., COMUNELLO, H. H., MORAES, J. D., SIMON, G., & Souza, E. L. de. (2020). ALTERNATIVAS PARA APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE FRUTAS – UMA REVISÃO. **Anuário Pesquisa E Extensão Unoesc Videira**, 5, e24976. Recuperado de <https://periodicos.unoesc.edu.br/apeuv/article/view/24976>

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº725, de 01 de julho de 2022. Dispõe sobre os aditivos alimentares aromatizantes. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_725_2022_.pdf/fa9a9a0a-9e30-4c2b-8386-04b5533aa934. Acesso em: 20 ago. 2024.

CARVALHO, D. S. de; MOLINA, G.; MARÓSTICA Jr, M.R.; PASTORE, G. M. Fruity aroma production by *Neurospora sitophila*: Influence of precursors. **Current Topics in Biotechnology**. Trivandrum, v. 7, p.45-49, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Crops and livestock products. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 20 ago. 2024.

FLORENCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H.; MARTINS, R. S., CAVALCANTI, M. T., GOMES, J. P. Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1088-1092, 2013.

PASTORE, G. M.; CARVALHO, D.S de; DIONISIO, A. P.; MOLINA, G.; **Processo de produção de hexanoato de etila por via biotecnológica utilizando meio sintético e resíduos agroindustriais e seu uso**. Nome do Depositante: Universidade Estadual de Campinas, BR n PI1101711-2. Depósito: 25 abr. 2011.

SANTIAGO, Ângela Maria *et al.* Valorização do resíduo da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) para produção da exo-poligalacturonase com *Aspergillus niger* CCT 0916. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e13810111592-e13810111592, 2021.