

## Introdução

O aroma é um dos atributos mais importantes nos alimentos, bebidas e cosméticos. Além disso, melhora a qualidade do produto e também pode apresentar algumas atividades biológicas como antioxidantes, anti-inflamatório e anti-carcinogênico <sup>1,2</sup>. Os compostos de aroma podem ser obtidos basicamente por 3 métodos: extração diretamente da natureza, transformações químicas ou transformações por via biotecnológica. A produção através do processo biotecnológico é o mais vantajoso, uma vez que os produtos têm alta especificidade e podem ser rotulados como “naturais” <sup>3</sup>.

Um dos processos biotecnológicos mais utilizados é a biotransformação, o que ocorre devido à biocatálise de precursores terpênicos utilizando microorganismos. Por este método, o produto principal é obtido por uma única reação enzimática, e é possível que o substrato e o produto tenham estruturas muito semelhantes, enquanto que isto não pode ser observada em outros métodos <sup>4</sup>.

Terpenos são metabólitos secundários de plantas e extremamente utilizada como substrato para a biotransformação e como aditivos e aromatizantes em alimentos devido às suas qualidades odoríferas <sup>5,6</sup>.

## Objetivos

O objetivo deste trabalho foi selecionar potenciais linhagens de fungos na biotransformação de monoterpênicos (limoneno,  $\alpha$ -pineno e citronelol) e sesquiterpenos (valenceno e farneseno) para a produção de aromas naturais.

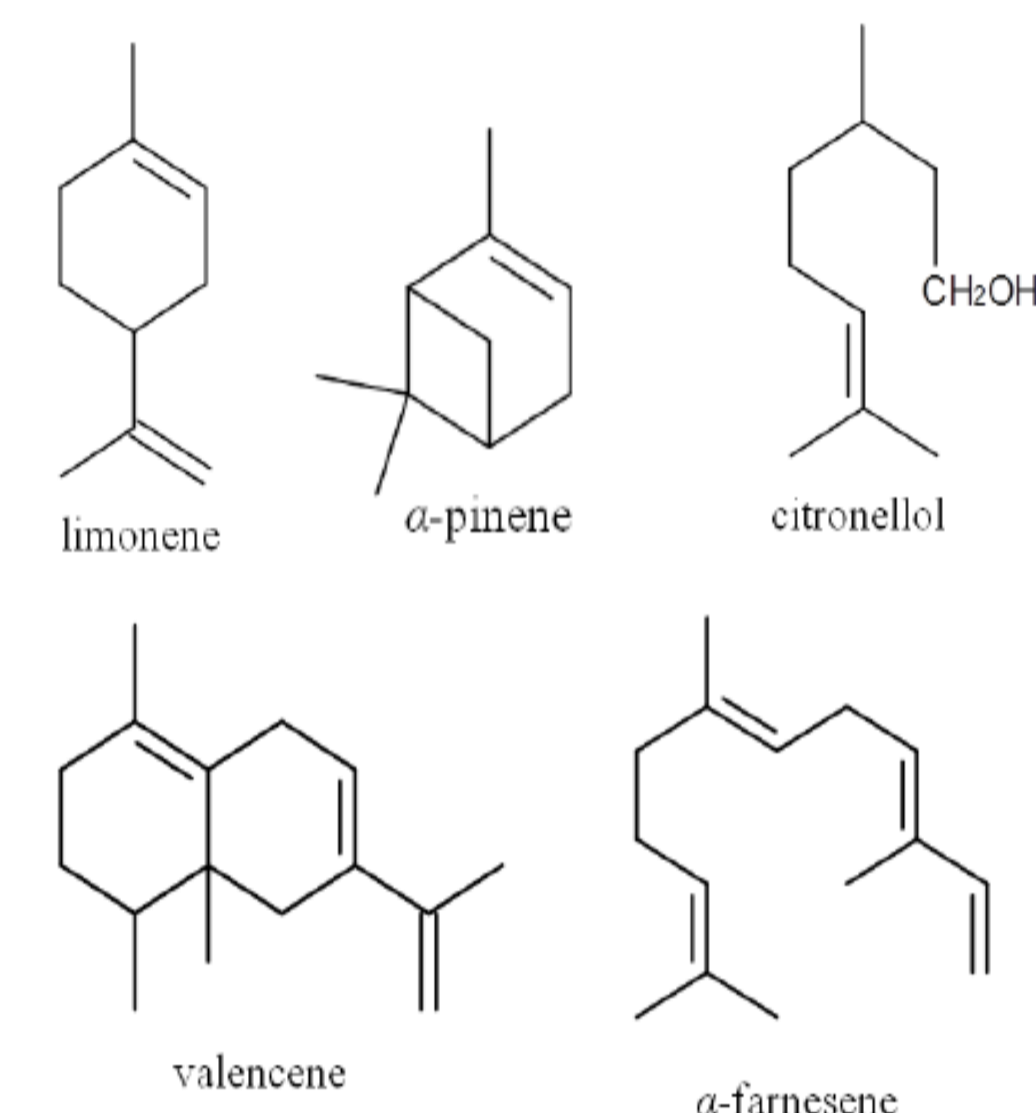


Figure 1: Estruturas dos mono e sesquiterpenos utilizados como substrato neste trabalho

## Metodologia

### Seleção de micro-organismos

Os fungos filamentosos utilizados neste trabalho foram selecionados no Banco de Micro-organismos do Laboratório de Bioaromas (UNICAMP), previamente isolados de frutas brasileiras.

### Avaliação do potencial de linhagens fúngicas na biotransformação de terpenos

Os micro-organismos foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio YM (extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), glicose (1%) e ágar (2%). Após 72 horas de crescimento, pedaços de ágar (1 cm<sup>2</sup>) foram transferidos para um Erlenmeyer contendo meio líquido com a mesma composição e homogêneos com Ultraturrax (Ika, Wilmington, NC, EUA). As culturas foram incubadas a 30 °C e 150 rpm e depois de 72 horas, a biomassa foi filtrada e transferida para meio mineral contendo 0,5% do terpeno testado como substrato. Os terpenos utilizados foram limoneno,  $\alpha$ -pineno, citronelol, valenceno ou farneseno. As culturas foram novamente incubadas a 30 °C e 150 rpm e as amostras foram extraídas a cada 24 horas para análise de GC-MS de compostos produzidos durante as 96 horas de fermentação

### Identificação dos produtos por Cromatografia a Gás e Espectrometria de Massas

As amostras dos meios de biotransformação foram extraídas com acetato de etilo (1:1, v / v) contendo 1% de decano como padrão interno, sendo a fase orgânica seca sobre sulfato de sódio, e injetados no cromatógrafo em fase gasosa (HP-6890 - Agilent Technologies), com coluna capilar HP-5 para a quantificação dos produtos.

A identificação dos compostos produzidos foi realizada em um cromatógrafo a gás (HP7890 - Agilent Technologies) acoplado a espectrômetro de massas (HP5975C - Agilent Technologies). A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros obtidos com a biblioteca NIST2008 com similaridade de 90% e a confirmação foi feita com os padrões comerciais dos produtos identificados.

## Resultados e Discussão

### Seleção de linhagens

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram selecionados da coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA-FEA-UNICAMP), previamente isolados de frutas brasileiras, totalizando 10 linhagens de fungos. Na Tabela 1 são apresentados os códigos destas linhagens, juntamente com a matriz utilizada para o seu isolamento, bem como sua identificação feita por microscopia ótica.

Tabela 1: Fungos selecionados, matriz de isolamento e identificação

Fungos	Matriz	Identificação
LB2038	Acerola	<i>Aspergillus</i> sp
LB2357	Goiaba	<i>Aspergillus</i> sp
LB2036	Manga Espada	<i>Penicillium</i> sp
LB2360	Graviola	<i>Penicillium</i> sp
LB2327	Graviola	<i>Penicillium</i> sp
LB2025	Manga Espada	<i>Penicillium</i> sp
LB2276	Umbu	<i>Mucor</i> sp
LB2288	Sapoti	<i>Mucor</i> sp
LB2211	Curauá	<i>Fusarium</i> sp
LB2472	Curauá	<i>Fusarium</i> sp



### Biotransformação de terpenos e identificação dos produtos

A investigação conduzida no primeiro semestre de trabalho foi focada principalmente no padrão qualitativo dos produtos obtidos do que em seus rendimentos absolutos, a fim de selecionar biocatalisadores e respectivos substratos com potencial para aplicação em futuros trabalhos. Desta forma, os resultados coletados durante o primeiro semestre permitiram identificar os fungos com maior potencial para a biotransformação dos substratos selecionados, sendo que a Tabela 2 apresenta os biocatalisadores, substratos e os produtos identificados por GC-MS

Tabela 2: Fungos com potencial para a biotransformação e produtos identificados

Fungos	Substrato	Produtos identificados
LB2038	Limoneno	$\alpha$ -Terpineol, Carveol, Carvona
LB2357	Limoneno	$\alpha$ -Terpineol, Carveol
LB2360	Limoneno	Carvona
LB2360	$\alpha$ -Pineno	Verbenona
LB2327	$\alpha$ -Pineno	Mirtenol, Verbenona

Na sequência do trabalho, os produtos identificados foram ainda quantificados com base na construção de uma curva quantitativa, correlacionando concentrações conhecidas dos produtos no meio de fermentação com as áreas obtidas na cromatografia. Desta forma, a Tabela 3 apresenta os principais produtos obtidos neste trabalho e sua quantificação em mg/L.

Tabela 3: Concentração de  $\alpha$ -terpineol, carvona (limoneno) e verbenona ( $\alpha$ -pineno) após 72 horas de biotransformação

Fungos	Terpineol (mg/L)	Carvona (mg/L)	Verbenona (mg/L)
LB2360	403,8	858,0	-
LB2357	448,8	849,4	-
LB2038	359,8	1148,2	-
LB2327	-	-	196,2

## Conclusão

O presente projeto permitiu selecionar quatro linhagens de fungos com potencial para a biotransformação, bem como identificar os melhores substratos a serem utilizados neste processo: limoneno, para a produção de  $\alpha$ -terpineol e carvona, e  $\alpha$ -pineno para a produção de verbenona. O próximo passo deste trabalho será a otimização do processo de biotransformação, visando o aumento da concentração dos produtos obtidos, sendo de grande importância a continuidade dos estudos visando a produção de novos compostos de aroma de elevada qualidade sensorial e valor agregado.

### Referências

- Somogy, L. P. (1997) Chem. and Ind., p.170. Apud: Berger, R. G. Biotechnology of Aroma Compounds. Berlin: Springer-Verlag, 1997, p. 1-49.
- Berger, R. G. (2007) Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Chemistry and Materials Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 648 pages.
- Bicas, J. L.; Silva, J. C.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M. (2010) Biotecnological production of bioflavours and functional sugars. Ciênc. Tecnol. Aliment. 30,7-18.
- Vasic-Racki, D. (2006) History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities. Industrial Biotransformations, 1-36.
- Bouwmeester, H. J.; Gershenzon, J.; Konings, M. C. J. M.; Croteau, R. (1998). Biosynthesis of the monoterpene limonene and carvone in the fruit of caraway - I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. Plant Physiology, 117, 901-912.
- Van der Werf, M. J.; Bont, J. A. M. (1998) Screening for microorganisms converting limonene into carvone. New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, 231-234.