

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

CAMPUS AVARÉ

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODIVERSIDADE

Marina Balieiro Crescitelli

**PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *NEUROSPORA SP* EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

AVARÉ 2021

MARINA BALIEIRO CRESCITELLI

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *NEUROSPORA SP* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Souza de Carvalho

AVARÉ
2021

Catálogo na fonte
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Crescitelli, Marina Balieiro

Produção de aroma frutal por *Neurospora sp.* em resíduos agroindustriais/ Marina Balieiro Crescitelli
Avaré, 2021.

40 p.

Orientador: Prof.^a Dra. Daniele Souza de Carvalho

Monografia (Graduação – Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2021.

1. Hexanoato de etila. 2. Bagaço de malte. 3. Bagaço de cana-de-açúcar. I. Carvalho , Daniele Souza
II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	
IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)	
Nome: Mariana Baleiro Crescitelli	
Título: Produção de aroma frutal por <i>Neurospora</i> sp em resíduos agroindustriais.	
Curso: Bacharelado em Engenharia de Biosistemas	
BANCA EXAMINADORA	
Nome: Mariana Camargo Schmidt	
Instituição/Departamento: IFSP-campus Avaré/CCA	
Nota: 9,88	Julgamento: (X) Aprovado () Reprovado
Assinatura: <i>Assinado digitalmente</i>	
Nome: Raíssa Maria Mattos Gonçalves	
Instituição/Departamento: IFSP-AVARE/CBEB	
Nota: 9,60	Julgamento: (X) Aprovado () Reprovado
Assinatura: <i>Assinado digitalmente</i>	
Nome: Daniele Souza de Carvalho	
Instituição/Departamento: IFSP-campus Avaré/CCA	
Nota: 10,00	Julgamento: (X) Aprovado () Reprovado
Assinatura: <i>Assinado digitalmente</i>	

RESULTADO FINAL

Como parte das exigências para conclusão do Curso de Engenharia de Biosistemas, o candidata/aluna, em sessão pública, foi considerado aprovada pela Comissão Examinadora, com média final **9,80**.

Documento assinado eletronicamente por:

- Daniele Souza de Carvalho, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 26/11/2021 10:56:03.
- Raíssa Maria Mattos Gonçalves, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 26/11/2021 10:57:24.
- Mariana Camargo Schmidt, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 26/11/2021 11:09:46.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 26/11/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 262816
Código de Autenticação: d05f36882d



Dedico aos meus pais, Gerolinda e Amarildo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proteger e sustentar.

Aos meus pais, por permitirem a realização deste sonho, me sustentando e orientando.

À professora Daniele, pelo primeiro voto de confiança que recebi no Campus, pelo apoio, orientação, paciência, parceria, dedicação e pelo conhecimento compartilhado, desde minha primeira Iniciação Científica.

À toda minha família, em especial, à tia Iolanda por me ajudar com a moradia todos esses anos, vindo até Avaré quando necessário e à Giuliana, minha irmã, quem descobriu o curso.

À Raquel, por ter me acompanhado e ajudado desde 2019 com os projetos, incluindo a parte prática do TCC.

Ao Cat, por me trazer tanta alegria.

À tia Andréia, por ter sido como uma mãe em Avaré. Às minhas amigas de sala, em especial a Joyce, por não terem me deixado desistir, pela ajuda com todos os trabalhos e listas de exercícios que passamos as tardes fazendo pelos corredores do IF, pelo companheirismo, caronas e risadas.

Ao IFSP por conceder bolsa PIBIFSP para a realização das minhas Iniciações Científicas, incluindo a parte prática deste Trabalho.

Ao Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos pela doação da linhagem de *Neurospora*.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. ”

Charles Chaplin (1889-1977)

RESUMO

Aromas naturais são aqueles obtidos por via enzimática, microbiológica ou por extração física. Dessa forma o uso de processo fermentativo para obtenção de bioaroma se torna interessante visto a crescente demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis. A utilização de resíduos agroindustriais na produção de aromas possui vantagens do ponto de vista da gestão de resíduos bem como diminuição de custos de produção. O presente estudo teve como objetivo utilizar *Neurospora sp.* na produção de aroma frutal utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultura a fim de se obter hexanoato de etila, éster com aroma frutal e com alto valor agregado. Foi realizada a etapa de pré-inoculo e a biomassa obtida foi transferida para o meio composto por 5% de extrato de malte e 1% óleo de soja (controle) e para os meios compostos pelos resíduos de bagaço de malte e bagaço de cana-de-açúcar em concentrações de 5, 10 e 15% m/v. A fermentação foi conduzida a 30°C a 200rpm por 72 horas. Foram coletadas 5 mL de amostra a cada 24 horas as quais foram submetidas ao processo de extração por solvente e analisada em sistema cromatógrafo gasoso acoplado em um espectrômetro de massas (CG-EM) a fim de verificar se houve produção do composto alvo. Após a confirmação, as amostras extraídas foram analisadas em Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Detector de ionização em Chama (CG-FID) para quantificação do hexanoato de etila. Em todos os tratamentos houve produção bioaroma, o qual foi identificado pela comparação do espectro de massas dele com o padrão analítico do éster, verificando-se que estes substratos são promissores para obtenção deste composto. Houve a produção máxima de aproximadamente 39mg.L⁻¹ de hexanoato de etila em meio contendo 5% de bagaço de cana-de-açúcar em 48 horas de fermentação; e, de aproximadamente 10mg.L⁻¹ em 15% bagaço de malte fermentado por 24 horas. Concluiu-se que a linhagem utilizada de *Neurospora sp.* é produtora de hexanoato de etila nos resíduos agroindustriais utilizados.

Palavras-chave: Hexanoato de etila. Bagaço de malte. Bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Natural flavors are obtained by enzymatic route, microbiological or physical extraction. In this way the use of a fermentative process to obtain bioflavour become interesting due to a demand decrease by customers in healthy products. The utilization of agro-industrial waste to produce flavors have advantages in the environment management and in a production cost decrease. This study aimed to the use of *Neurospora sp* to produce fruity flavor using agro-industrial waste as a culture medium to obtain ethyl hexanoate, ester with a fruity flavor e with high value. A pre-inoculum was conducted and the obtained biomass was transferred to frask containig 5% of malt extract and 1% of soy oil (control) and for the culture medium waste of malt bagasse and sugar cane bagasse in concentrations of 5, 10 and 15% m/v. The fermentation was conducted at 30°C and 200 rpm for 72 hours. 5mL of samples were collected each 24 hours and they were submitted to a solvent extraction process and analyzed in a gas chromatograph system added in a mass spectrometer (CG-MS) to verify if there is a production of the target compound. For the quantification, the samples were extracted and analyzed in a gas chromatograph with fire ionization detector (CG-FID). In all treatments there were production of ethyl hexanoate, identified by the comparison of mass spectrum versus the analytic standard, being these one promising for obtaining bio flavors. There was the maximum production of around 39 mg.L⁻¹ of ethyl hexanoate on the 5% sugar cane bagasse fermented for 48 hours; and, around 10mg.L⁻¹ in 15% malt bagasse fermented for 24 hours. It was concluded that a strain used of *Neurospora sp* is a productor of ethyl hexanoate in the agro-industrial waste substrates of sugar cane bagasse and malt bagasse residues agroindustrial.

Key-words: Ethyl Hexanoate. Malt Bagasse. Sugar cane bagasse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Métodos para obtenção de compostos de aroma.

Figura 2 – Repicagem dos esporos de *Neurospora*. (A) Esporos no momento da repicagem feita com a técnica do estriamento. (B) Crescimento dos esporos após 72 horas de incubação a 30°C em PDA.

Figura 3 – Cromatograma obtido no CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido da amostra de extrato de malte 5% acrescido de óleo de soja 1% em 24 horas de fermentação.

Figura 4 - Cromatograma obtido do CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido na amostra com 5% de bagaço de malte em 24 horas de fermentação.

Figura 5 - Cromatograma do CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido na amostra com 5% de bagaço de cana-de-açúcar em 24 horas de fermentação.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de calibração obtida e utilizada na etapa de quantificação do hexanoato de etila das amostras fermentadas

Gráfico 2 – Produção de hexanoato de etila na fermentação de bagaço de malte por *Neurospora* sp em diferentes concentrações do resíduo agroindustrial.

Gráfico 3 – Produção de hexanoato de etila na fermentação de bagaço de canadeaçúcar por *Neurospora* sp em diferentes concentrações.do resíduo agroindustrial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional Vigilância Sanitária
CG-EM	Cromatógrafo Gasoso - Espectrômetro de Massas
CG-FID	Cromatógrafo Gasoso - Detector de Ionização em Chama
ed.	Edição
Dra.	Doutora
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
n.	Número
p.	Página
PDA	Potato Dextrose Agar
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v.	Volume
YM	Yeast Malt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 5

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	2
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	37
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	17
1.3.1 Manutenção do microrganismo	17
1.3.2 Pré-inóculo	17
1.3.3 Fermentação	18
1.3.4 Processo de extração do hexanoato de etila	18
1.3.5 Identificação do hexanoato de etila nas amostras fermentadas	19
1.3.6 Quantificação do hexanoato de etila nas amostras fermentadas	19

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

2.1 Aromas	20
2.2 Ésteres	21
2.3 Fungos e produção biotecnológica de aromas	22
2.3.1 Metabolismo dos carboidratos	22
2.3.2 Metabolismo dos lipídios	23
2.3.3 Produção de aroma por via biotecnológica	23
2.2.4 <i>Neurospora</i>	25
2.4 Resíduos Agroindustriais	25

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	28
3.1 Manutenção e repicagem da linhagem de <i>Neurospora</i>	28
3.2 Identificação de hexanoato de etila nas amostras fermentadas	29
3.2.1 Extrato de malte e óleo de soja	29
3.2.2 Bagaço de malte	30
3.2.3 Bagaço de cana-de-açúcar	31
3.3 Quantificação	31
3.3.1 Curva de calibração	31
3.3.2 Produção de aroma nas fermentações	32
3.3.2.1 Bagaço de malte	32
3.3.2.2 Bagaço de cana-de-açúcar	34
4 CONCLUSÃO	35
5 REFERÊNCIAS	36.

1 INTRODUÇÃO

O organismo humano é capaz de detectar uma enorme variedade de compostos voláteis. O sabor de um produto está diretamente relacionado com as sensações despertadas ao ser consumido, por esse motivo, existe grande interesse comercial em torno dos compostos de aroma (BICAS et al., 2013).

O interesse dos consumidores por alimentos naturalmente saudáveis se torna cada vez mais significativo, dessa forma, pesquisas na área da biotecnologia ganharam grande relevância nos últimos anos. Uma das utilizações da biotecnologia está na extração de bioaditivos alimentares, por exemplo, na elaboração de alimentos ou insumos para a indústria a partir de microrganismos, dentre eles, os aromas naturais (FELIPE et al., 2016).

Segundo a Resolução nº 12, 17/01/2007 da ANVISA, aromas são definidos como substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou/ sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos; e podem ser classificados em naturais ou sintéticos, sendo os primeiros obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos.

Ésteres são conhecidos por conferir aroma frutal como de abacaxi, morango, pêra, pêssego, banana, entre outros. O hexanoato de etila é um éster caracterizado por um líquido incolor de forte aroma frutal, e é amplamente utilizado no preparo de doces, sorvetes, bebidas alcoólicas, geléias e produtos da panificação (CARVALHO, 2011).

Os ésteres formados por fungos são exemplos de metabólitos secundários, oriundos do mecanismo de remoção de ácidos e alcoóis do meio, pelo fato do acúmulo destes ser tóxico ao micro- organismo (SCHARPF et al., 1986).

Diversos pesquisadores estudaram e detectaram a produção de hexanoato de etila por linhagens de *Neurospora* em meio extrato de malte (CARVALHO, 2011; BRIGIDO, 2000; PASTORE, et al. 1994; YAMAUCHI, et al. 1991; YOSHIZAWA, et al. 1988). Não

há conhecimento sobre metabólitos secundários nocivos produzidos pelas cepas de nenhuma espécie de *Neurospora* (PERKINS, D. D; DAVIS, R. H. 2000).

Segundo Madeira et al. (2014), meios de cultura alternativos na produção de biomoléculas por via microbiana viabilizam os processos pois se tratam de subprodutos de baixo custo comercial ou de resíduo originados de atividades industriais, principalmente do setor do agronegócio, que é caracterizado por uma significativa geração desses.

Dessa forma, produzir bioaromas por via microbiológica através do uso de resíduos agroindustriais possui a vantagem de que os constituintes do meio de cultivo são de custo acessível (BICAS et al., 2013).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A produção de bioaromas utilizando resíduos agroindustriais traz a possibilidade de comercializar os metabólitos gerados na fermentação pelos microrganismos como produtos de alto valor agregado, algo economicamente interessante para a indústria, uma vez que o meio de cultura para um processo fermentativo pode chegar a 75% do custo do produto final (Carvalho, 2011).

O Brasil é grande produtor de resíduos da cadeia de cana-de-açúcar e da indústria cervejeira (CROPLIFE, 2020; RIGO et al., 2017).

Com o mercado global de aromas com uma Taxa Composta de Crescimento Anual predita de 6,2% entre 2016 e 2024 (SALES et al., 2018) e a crescente demanda do consumidor por produtos saudáveis, sendo o Brasil o quarto maior consumidor desses produtos (FELIPE et al., 2016), a produção de aromas naturais por via microbiológica gera moléculas de alto valor agregado utilizando resíduos da agroindústria geralmente subutilizados ou descartados de maneira incorreta na natureza, o que propõe solução alternativa aos problemas ambientais causados pela geração desses resíduos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de aroma frutal por *Neurospora* sp em resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Manutenção da linhagem *Neurospora* sp;
- Avaliação da produção de hexanoato de etila por em extrato de malte 5% acrescido de óleo de soja 1% por *Neurospora* sp;
- Avaliação da produção de hexanoato de etila por *Neurospora* sp em diferentes concentrações (5, 10 e 15% m/v) de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte;
- Avaliação do melhor tempo de fermentação para a produção do bioaroma de interesse;
- Identificação do hexanoato de etila nas amostras;
- Quantificação do composto produzido.

1.3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os procedimentos realizados no presente trabalho foram executados de acordo com a metodologia descrita por Carvalho (2011).

1.3.1. Manutenção do microrganismo

A linhagem de *Neurospora* sp utilizada foi doada pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP– (linhagem nº8) a qual foi mantida sob refrigeração em meio PDA (Potato Dextrose Agar).

Para manutenção da linhagem nº 8 , foi realizada a repicagem da mesma a cada 60 dias, transferindo seus esporos, através de duas alçadas cheias, pela técnica de estriamento, para novos tubos de ensaio contendo PDA e incubando-os a 30°C por 1 semana. Após, foi adicionado óleo mineral estéril até cobrir os esporos e mantidos sob refrigeração.

1.3.2. Pré-inóculo

Para a etapa de pré-inóculo, os esporos de *Neurospora* sp foram repicados em tubo de ensaio contendo meio PDA, pela técnica de estriamento e foram incubados por 72 horas a 30°C; após esse tempo, foram adicionados 10 mL de água estéril, seguido de raspagem com alça de platina para remoção dos esporos.

A seguir, o volume de cada tubo de ensaio foi transferido para 1 erlenmeyer contendo 50mL de meio de cultura Yeast Malt – YM (peptona 0,5%, glicose 1%, extrato de malte 0,3% e extrato de levedura 0,3%). Estes recipientes foram submetidos à rotação de 200rpm em shaker de bancada a 30°C durante 24 horas.

A biomassa formada na etapa de pré-inóculo foi filtrada à vácuo com auxílio de funil de Büchner em kitazato e lavada com água estéril durante a filtração. Utilizando-se de pinças estéreis, pesou-se 1g da biomassa o qual foi inoculado em cada erlenmeyer contendo os diferentes meios, exceto no branco, realizado em cada tratamento. Os ensaios foram feitos em duplicata.

1.3.3. Fermentação

Primeiramente, houve a fermentação em 2 erlenmeyers contendo extrato de malte 5% e óleo de soja 1% a fim de verificar a potencialidade desta linhagem na produção do

composto alvo. O experimento foi conduzido em shaker de bancada a 200 rpm a 30°C por 24 horas. Essa etapa foi realizada para identificar a capacidade da linhagem de *Neurospora* utilizada de produzir hexanoato de etila, uma vez que, Carvalho (2011) detectou a formação desse composto no meio de extrato com malte acrescido de óleo de soja por linhagem de *Neurospora*.

Na sequência, a fermentação ocorreu nos diferentes resíduos agroindustriais, nas concentrações de 5, 10, e 15% m/v.

Nas fermentações cujos substratos foram os resíduos, os erlenmeyers foram agitados em agitador magnético por 10 segundos, e então, acondicionados em shaker de bancada e mantidos sob agitação a 200 rpm em shaker de bancada a 30°C, por 72 horas.

Durante a fermentação, foram coletados 10 mL de cada extrato fermentado a cada 24 horas, para as análises de identificação e quantificação, sendo 5mL para cada análise, em frascos de vidros, os quais ficaram congelados até o momento das análises.

1.3.4. Processo de extração do hexanoato de etila

Para a extração de compostos para cada 5mL de amostra foram acrescidas de 0,1g de NaCl e agitadas em vortex por 10 segundos. A seguir, 1mL de éter etílico contendo 0,003% de 2-heptanol foi adicionado aos tubos e agitados por mais 30 segundos. O sobrenadante contendo os compostos extraídos foi removido com o auxílio de pipeta Pasteur e transferido para tubo eppendorf contendo 0,1g de NaCl.

1.3.5. Identificação do hexanoato de etila nas amostras fermentadas

Um microlitro de amostra extraída 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 110°C

permanecendo durante 1 minuto e, posteriormente, uma rampa de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 200°C , a qual foi mantida por 3 minutos. A temperatura da interface CG-EM foi de 250°C e a energia de impacto de $+70\text{eV}$. Para identificação do composto foi comparado o tempo de retenção e o espectro de massas do pico alvo com o padrão analítico de hexanoato de etila.

1.3.6. Quantificação do hexanoato de etila nas amostras fermentadas.

Um microlitro de amostra extraída foi injetada, através de um injetor split/splitless no modo splitless, e analisada e registrada através de um cromatograma gerado por um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific) acoplado a um detector de ionização em chama (CG-FID), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida TR-5 de $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$ de diâmetro interno e $0,5\text{ }\mu\text{m}$ de espessura de fase estacionária. As temperaturas do injetor e do detector da corrida foram de 250°C , 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 $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 150°C permanecendo durante 1 minuto e, posteriormente, uma rampa de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 200°C , a qual foi mantida por 3 minutos.

Para a quantificação foi construída uma curva de calibração com 9 pontos, sendo as concentrações utilizadas de: 0,005; 0,025; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30 e $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aromas

Os aromas sempre fizeram parte da história da humanidade. A percepção de um produto alimentício está associada a estímulos sensoriais e emocionais, logo, para a satisfação dos consumidores, as indústrias de ingredientes desenvolvem constantemente soluções no sentido de fornecer melhores aromas (STREBE, 2017). O senso humano de aroma é desencadeado por diferentes moléculas, desde pequenas e apolares até médias e polares, que chegam às proteínas receptoras do epitélio olfativo.

Elas sinalizam frescor, qualidade e autenticidade de um alimento, orientando consequentemente nossas escolhas ao consumir (NOERENBERG et al., 2013).

Muitos compostos de aroma são produzidos via síntese química ou pela extração do material natural, nesse caso, as plantas são a maior fonte de óleos essenciais e aromas, porém, seu uso depende de fatores de difícil controle como as condições de clima e ocorrência de pragas nos vegetais. Uma maneira alternativa para a produção de aromas está baseada na biossíntese microbiana ou bioconversão (BERGER, 2015).

Segundo a Resolução nº 12, 17/01/2007 da ANVISA, aromas são definidos como “substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou/ sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos”; a Resolução reconhece que, os aromas obtidos através de métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, podem ser classificados como naturais.

Os bioaditivos são compostos obtidos por via biotecnológica, isto é, através de métodos microbiológicos ou enzimáticos, sendo considerados alternativas interessantes aos aditivos classicamente produzidos por vias sintéticas. Os processos de obtenção devem atender aos dois critérios exigidos pelo novo mercado consumidor, são eles, os produtos classificados como “naturais” e “ambientalmente amigáveis” (FELIPE et al., 2016).

A produção biotecnológica vem expandindo nos últimos anos, despertando grande interesse pela indústria de aromas, devido a crescente preferência dos consumidores por produtos que contenham em sua formulação matérias-primas naturais, em detrimento dos aditivos químicos, gerando um diferencial de mercado (BICAS, J. L; DIONISIO, A. P; PASTORE, G. M, 2009).

O mercado global de alimentos e bebidas naturais foi avaliado em US\$ 79,137 milhões em 2016 e estima-se que atinja US\$ 191,973 milhões em 2023, crescendo a uma taxa de 13,7% de 2017 a 2023 (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2019). A América do Norte e a Europa são os principais mercados para ingredientes alimentícios naturais,

representando aproximadamente 60% do mercado global (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2019).

O Brasil é o quarto maior mercado para produtos saudáveis. A indústria de aromas naturais ocupa uma parcela significativa do mercado de ingredientes naturais (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2019).

2.2. Ésteres

Os ésteres são substâncias orgânicas encontradas na natureza, e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios (COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C., 2004).

Eles se destacam como um dos mais importantes grupos de aroma. Apresentam descritores sensoriais como aromas frutais, florais, de vinho e de conhaque, por exemplo. Naturalmente são encontrados em diversos produtos alimentícios, tais como doces, geleias, compotas, produtos de panificação, bebidas alcoólicas e não alcoólicas (BRIGIDO, 2000).

Os ésteres aromáticos obtidos por métodos microbiológicos ou enzimáticos são considerados naturais de acordo com as Legislações do Brasil, dos Estados Unidos e da Europa, satisfazendo assim a tendência de consumo de produtos naturais em vários setores (TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K., 2015).

O hexanoato de etila, um éster com fórmula molecular $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, e possui um forte aroma frutal com descritores sensoriais como, por exemplo, de abacaxi, morango, pêssigo, banana. Podem ser aplicado em inúmeros produtos alimentícios tais como doces, geleias, sorvetes, produtos de panificação e bebidas alcoólicas (BURDOCK, G. A.; FENAROLI, G, 2010; CARVALHO et al., 2012).

2.3 Fungos e produção biotecnológica de aromas

Os fungos são capazes de utilizar como fonte de energia uma infinidade de substratos na natureza, os fungos são capazes de aproveitar nutricionalmente uma série de polímeros disponíveis, dentre os quais destacam-se os resíduos de origem vegetal (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010; BICAS et al, 2013).

Galvagno e Forchiassin (2010) afirmaram que os fungos são capazes de incorporar moléculas pequenas para utilizar como fonte de matéria e energia no seu desenvolvimento. Ao utilizar os polímeros presentes nos mais diferentes *habitats*, secretam no meio enzimas extracelulares que podem degradar macromoléculas a moléculas menores possíveis de incorporar e utilizar nutricionalmente. O fato dos fungos secretarem essas enzimas extracelulares e possuírem um crescimento filamentosos os torna um microrganismo facilmente adaptável à aproveitar amplas gamas de nutrientes dos mais diversos substratos para fermentação.

2.3.1. Metabolismo dos carboidratos

Os carboidratos são a maior fonte de carbono utilizada pelos fungos. No metabolismo dos carboidratos, durante a fermentação, a fonte de carbono é utilizada para o crescimento dos microrganismos naturalmente presentes no substrato ou adicionados para a melhoria do processo. A transformação da glicose até CO_2 e H_2O ocorre em duas etapas: glicólise, onde a glicose é convertida a piruvato e Ciclo de Krebs, onde o piruvato, por sua vez, é oxidado a CO_2 e H_2O , o piruvato é metabolizado a compostos que tenham as características olfativas (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010).

2.3.2 Metabolismo dos lipídios

Muitos lipídios contém glicerol esterificado com uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos, constituindo mono, di e triglicerídios. Os fosfolipídios são importantes constituintes das membranas celulares (juntamente a esteróis e glicerídeos), da parede celular e de muitos hormônios produzidos por fungos (anerdíol e siremina, por exemplo). Com a ação de lipases, o lipídios podem ser degradados a ácidos graxos e glicerol. O

catabolismo desses ácidos graxos, nos fungos, pode ocorrer por oxidação na posição α , β e ω , sendo mais comum ocorrer a β -oxidação nos peroxissomos. A cada ciclo, separase uma acetil-CoA e são formados NADH e FADH₂. O FADH₂ é oxidado pela ação de uma enzima oxidase. Em decorrência disto, as acetil-CoA geradas partem ao Ciclo de Krebs diretamente (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010).

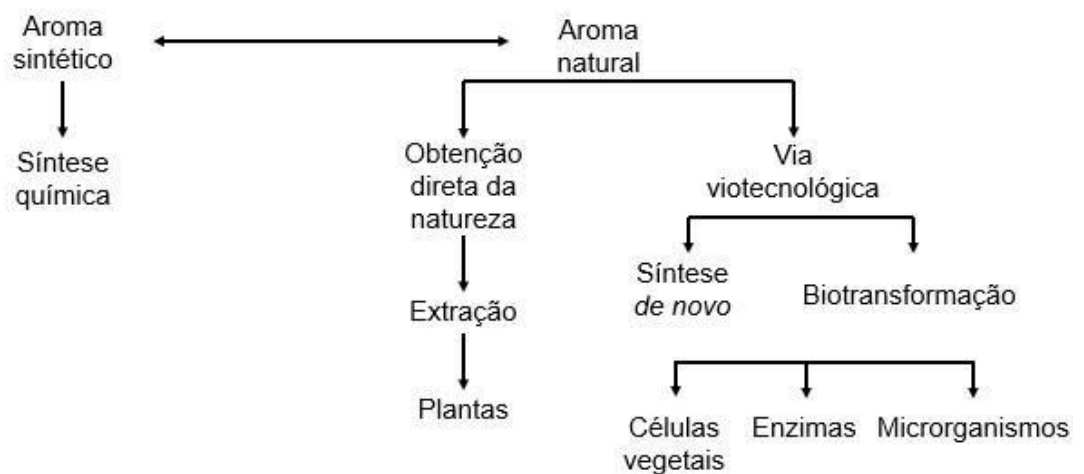
Após a lipólise, os ácidos graxos de cadeia longa podem ser oxidados, originando diversos grupos de aroma, como metil cetonas, lactonas, aldeídos, alcoóis e ésteres (CARVALHO, 2011; CARVALHO et al, 2012).

2.3.3 Produção de aroma por via biotecnológica.

Em geral, compostos de aroma são metabólitos secundários, ou seja, são substâncias produzidas por microrganismos, que não são essenciais para o seu metabolismo. Estes compostos contribuem, inclusive, para inibir competitivamente espécies que poderiam ocupar o mesmo nicho (MARÓSTICA, 2006).

Na Figura 1, é possível observar, de maneira simplificada, os métodos para obtenção de compostos de aroma.

Figura 1 – Métodos para obtenção de compostos de aroma.



Fonte: Adaptado de AKACHA, N. B.; GARGOURI, M., (2015).

Os aromas obtidos por síntese *De novo* podem ser produzidos a partir de diferentes substratos. Essa rota de obtenção apresenta um produto final obtido de diversos compostos de aroma, por vias metabólicas complexas, a partir de meio de cultura simples e sem a adição especial de substratos ao meio, recrutando todo o arsenal metabólico do fungo (GALLAGE, N.J.; MOLLER, B.L, 2015).

Os aromas obtidos por biotransformação, são por sua vez, resultado de uma reação química catalisada por microrganismos e sistemas enzimáticos. Geralmente desenvolvidas por culturas em crescimento previamente formadas ou enzimas purificadas (BICAS et al, 2013). Os processos de biotransformação são caracterizados pela adição de precursores ou intermediários e devem ser desenvolvidos de forma que seja possível fazer o escalonamento da produção posteriormente (MOLINA et al., 2013). Já aqueles obtidos por bioconversão, desenvolvem-se em duas ou mais reações químicas, ou seja, se difere da biotransformação por ocorrer em mais etapas. Ambos são processos caracterizados por reações catalizadas enzimaticamente (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010).

Ao produzir aromas por via biotecnológica, destacam-se alguns benefícios, entre eles, a geração de moléculas de aroma de elevada pureza, a produção contínua ao decorrer do ano sem interferência da sazonalidade, a adoção de parâmetros de processo menos rigorosos reduzindo, dessa forma, custos de energia bem como o uso de reagentes prejudiciais ao meio ambiente e condições de processos controláveis e otimizáveis (BERGER, 2015).

As empresas apontam como vantagens da produção de aromas por biossíntese: (i) a produção de múltiplos componentes que contribuem para um perfil balanceado do aroma, (ii) a obtenção de novos efeitos de aroma com características únicas não atingidas através do processo tradicional, (iii) a obtenção de aroma de perfil considerado natural pelos consumidores e (iv) a potencialidade para a produção de volumes que atendem ao mercado internacional (Chiappini, 2008).

A produção biotecnológica de ésteres pode ocorrer por dois processos: através da alcoólise de compostos acil-coA ou por esterificação de um ácido com um álcool (CARVALHO, et al 2012).

2.3.4 *Neurospora*

Neurospora, do gênero ascomiceto, é utilizada de maneira segura em processamento de alimentos há anos desde que espécies do gênero das Neurosporas foram reconhecidas pelos regulamentos da Food and Drug Administration (FDA) como sendo um fungo GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja um microrganismo seguro (PERKINS, D. D; DAVIS, R. H., 2000).

Em 2011, Carvalho estudou a produção de hexanoato processo de hexanoato de etila por via biotecnológica utilizando meio sintético, extrato de malte com óleo de soja, e resíduos agroindustriais, manipueira e bagaço de malte como substratos para produção do bioaroma, trabalho qual gerou patente juntamente ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

2.4. Resíduos agroindustriais

2.4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Segundo Kawa (2015) o Brasil é líder mundial na produção de açúcar e álcool, produtos provenientes da cana-de-açúcar num processo que gera resíduo (bagaço de cana-de-açúcar). A celulose e a hemicelulose são as duas formas de carboidratos mais abundantes da natureza sendo que ambas representam cerca de 70% do peso seco de todos os resíduos agrícolas. “As fibras do bagaço da cana contêm, como principais componentes, cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina, sendo este último responsável pelo seu poder calórico.” (FAPESP, 1998).

Segundo a CropLife (2020), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do planeta, sendo o estado de São Paulo o maior estado produtor, correspondendo a 55% da produção do país. As pesquisas e desenvolvimento de energias limpas e renováveis, bem como a obtenção produtos biodegradáveis impulsionou a valorização da pesquisa com a cadeia produtiva da cana-de-açúcar. Seus subprodutos e resíduos podem ser empregados, na alimentação humana e animal e na fertilização de solos. São, ainda, produtos derivados da cana-de-açúcar: biocombustível, bioplástico, bebidas, alimentos e bioenergia, bagaço, melaço, torta de filtro, vinhaça, álcool bruto, entre outros. A expectativa é que sejam colhidas da safra 2020/21 de cana-de-açúcar no Brasil 642,1 milhões de toneladas do vegetal.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – a produção de cana-de-açúcar de 2020 foi estimada em 677,9 milhões de toneladas. Em relação ao ano de 2019, apesar da queda de 0,3% na área destinada à colheita, as estimativas de produção apresentaram acréscimo de 1,6% e de 1,9% no rendimento médio (SIMIÃO, 2021). Segundo o portal Nova Cana (2021), o estado de São Paulo, líder na produção brasileira de cana-de-açúcar – qual detém 52% da produção total do país, obteve crescimento de 2,7% na produção em relação ao ano de 2019. Na safra 2020/2021, o açúcar alcançou 1,6 milhões de toneladas, apresentando aumento de 126% em sua produção.

Por se tratar de um material constituído por quantidades relativamente alta de açúcares, o bagaço de cana-de-açúcar, segundo Gámez et al. (2006), é um material apto para fermentações quando utilizado como substrato.

Em estudo, foi determinado que mais de 55% dos sólidos solúveis apresentados nos testes realizados se tratavam de açúcares (RODRIGUES et al., 2003). Cerca de 40 a 50% do bagaço de cana-de-açúcar é constituído por celulose, e, 23-35%, por hemicelulose. O restante trata-se de frações de lignina, cera mineral e outros componentes (JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C.E., 2002; WYMAN, 1999).

O bagaço de cana-de-açúcar é resultado da extração máxima do conteúdo celular rico em açúcares solúveis. Dessa forma, além de açúcares, o bagaço da cana-de-açúcar possui fragmentos da parede celular que não foram extraídos durante a moagem, conforme expõe a Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar.

Composição %	
Carbono	39,7 - 49
Oxigênio	40 - 46
Hidrogênio	5,5 - 7,4
Nitrogênio e cinzas	0- 0,3
Fibra	46
Celulose	26,6 - 54,3
Hemicelulose	14,3 - 24,4
Lignina	22,7 - 29,7

Fonte: Adaptado de Silva (2007).

2.4.2 Bagaço de malte

O Brasil ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produção de cerveja (CERVBRASIL, 2014)

O bagaço de malte, subproduto gerado durante a etapa de obtenção do mosto na produção de cerveja é rico em proteínas e fibras, e suas características funcionais o tornam potencialmente interessante para o aproveitamento em diversas áreas, e não só na alimentação de ruminantes, como geralmente é empregado. Este resíduo é rico em lignina, celulose e hemicelulose, e representa 85% do resíduo gerado pela indústria cervejeira. Todos os anos, o Brasil produz cerca de 2,6 milhões de toneladas de bagaço de malte (NIGLIO, F. S. R.; GERMER, S. P. M et al., 2021; RIGO et al., 2017). É estimada uma geração de 100 Kg para um tanque de 5 mil litros, equivalendo a uma geração de aproximadamente 500 Kg de resíduo por mês (MARSARIOLI, 2019).

Segundo a FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, a produção mundial de cevada foi de 141.423.028 toneladas em 2018. O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção média de 14 bilhões de litros por ano (LOPES; MORALES; MONTAGNOLLI, 2017).

Carvalho (2011) analisou a composição do bagaço de malte obtendo aproximadamente: 62g/L de carboidratos totais, 10g/L de lipídios, 40g/L de nitrogênio total e complementou que, há a presença de micronutrientes P, K, Ca, Mg, S, Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni e Pb.

Segundo Cordeiro et al. (2012), a composição do bagaço de malte corresponde, em porcentagem, a: 75,45% de umidade, 1,29% de cinzas, 15,46% de carboidratos, 5,37% de proteínas totais, 2,43% de gorduras totais e 3,98% de fibra bruta.

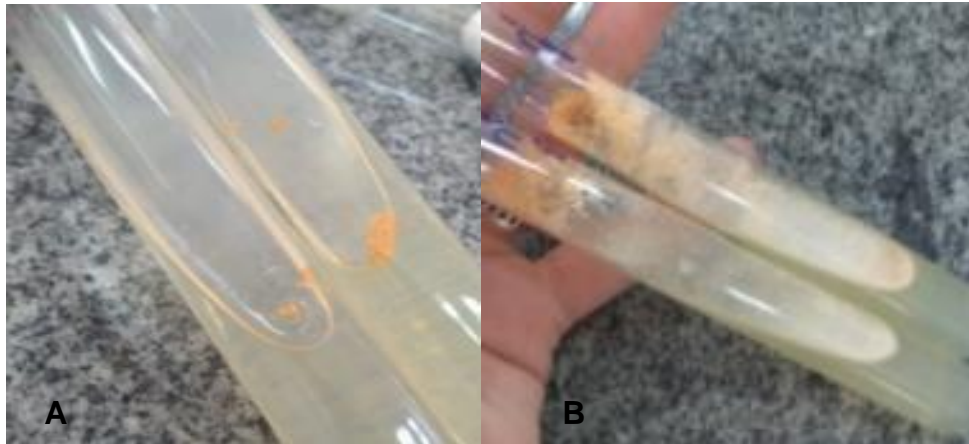
Devido a composição desses resíduos em açúcares fermentáveis e outros nutrientes, segundo Panda et al (2016) os microrganismos são capazes de utiliza-los como substratos em fermentações e, dessa forma, gerar produtos de importância industrial, biomoléculas, por exemplo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Manutenção e repicagem da linhagem de *Neurospora*.

Na Figura 2 observa-se o crescimento da linhagem de *Neurospora* após a repicagem para obtenção dos esporos que foram posteriormente empregados na produção de biomassa. O mesmo resultado foi obtido no procedimento que foi realizado periodicamente para manutenção do microrganismo.

Figura 2 – Repicagem dos esporos de *Neurospora*. (A) Esporos no momento da repicagem feita com a técnica do estriamento. (B) Crescimento dos esporos após 72 horas de incubação a 30°C em PDA.

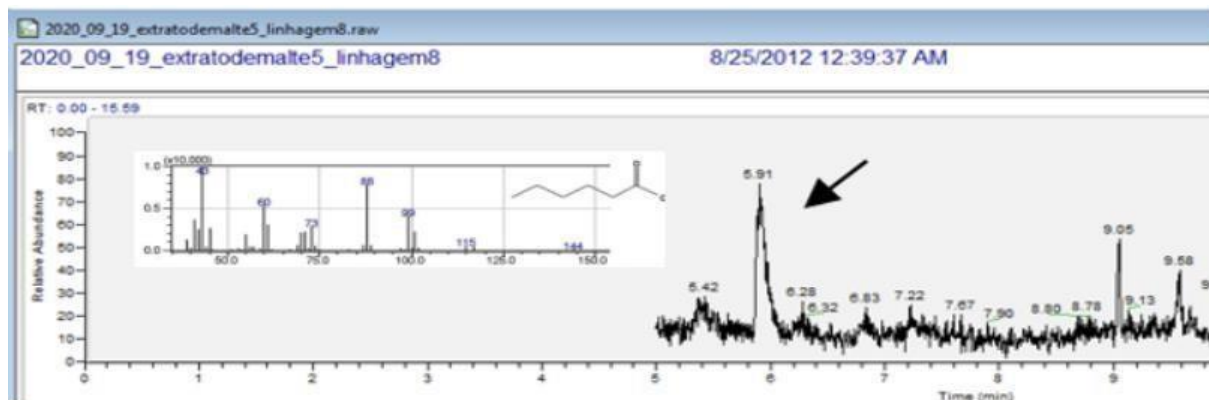


3.2. Identificação de hexanoato de etila nas amostras fermentadas

3.2.1. Extrato de malte e óleo de soja

Na Figura 3 observa-se que houve a detecção do composto alvo nas amostras fermentadas em extrato de malte e óleo de soja pela linhagem de *Neurospora* sp, conforme o pico indicado pela seta, sendo portanto, a linhagem adequada para o uso nos resíduos agroindustriais.

Figura 3 – Cromatograma obtido no CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido da amostra de extrato de malte 5% acrescido de óleo de soja 1% em 24 horas de fermentação.



Foi detectada a produção de hexanoato de etila no meio de cultura extrato de malte com óleo de soja, conforme esperado uma vez que Carvalho (2011) detectou a produção deste composto na concentração de 8,07 mg.L⁻¹ neste meio de cultura. No entanto, destaca-se que a linhagem de *Neurospora* sp utilizada foi distinta da utilizada no presente trabalho.

3.2.2. Bagaço de malte

Para a identificação do hexanoato de etila, foi obtido o cromatograma da amostra fermentada de bagaço de malte analisada e o espectro de massas do pico indicado pela seta conforme Figura 4.

Figura 4 - Cromatograma obtido do CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido na amostra com 5% de bagaço de malte em 24 horas de fermentação.

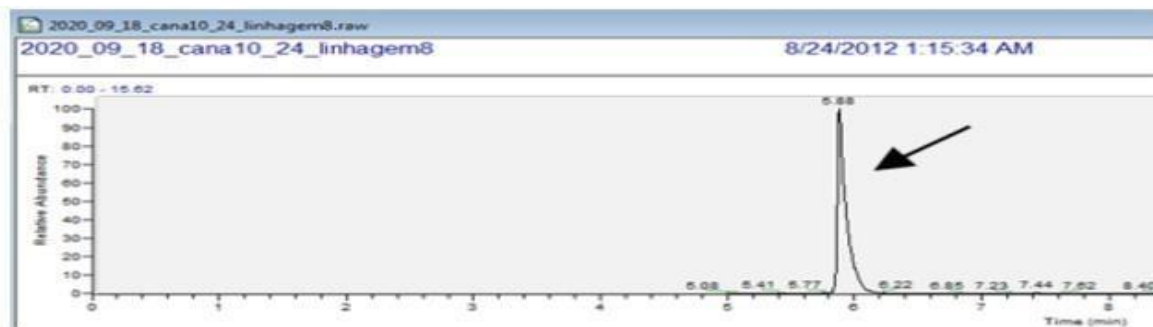


Os resultados obtidos vêm de encontro à literatura – isto é, foi detectada a produção de hexanoato de etila no meio. Em 2011, Carvalho já havia relatado o uso inédito do resíduo bagaço de malte na produção de hexanoato de etila por *Neurospora sitophila* FGSC1135. Neste trabalho, detectou-se ~ 10 mg.L⁻¹ do composto com 24 horas de fermentação.

3.2.3. Bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 5, pode-se observar o resultado da corrida cromatográfica obtida, onde confirma-se que houve produção de hexanoato de etila, por *Neurospora* sp. Destaca-se que, no momento da elaboração da parte prática do presente trabalho, em 2020, não haviam relatos do uso do bagaço de cana-de-açúcar como substrato na produção de hexanoato de etila por *Neurospora*.

Figura 5 - Cromatograma do CG-EM e espectro de massas do hexanoato de etila obtido na amostra com 5% de bagaço de cana-de-açúcar em 24 horas de fermentação.



Após a verificação da presença de hexanoato de etila nos meios estudados, foi realizada a etapa de quantificação do composto.

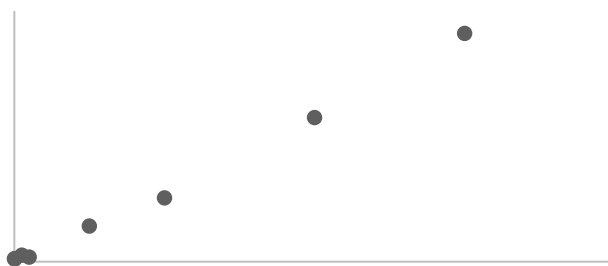
3.3. Quantificação

3.3.1. Curva de calibração

A curva de calibração obtida para os cálculos das concentrações de hexanoato de etila existentes nas amostras fermentadas pode ser observada no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Curva de calibração obtida e utilizada na etapa de quantificação do hexanoato de etila das amostras.

Curva de calibração



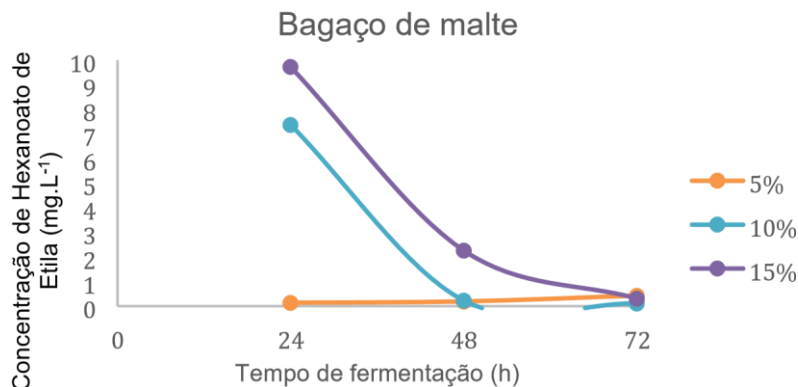
3.3.2. Produção de aroma nas fermentações

3.3.2.1 Bagaço de malte

A produção de hexanoato de etila nas diferentes concentrações de bagaço de malte pode ser observada no Gráfico 2.

Neste resíduo, a maior concentração observada de hexanoato de etila foi às 24 horas de fermentação (9,72 mg.L⁻¹) no meio mais concentrado, próximo à concentração de hexanoato de etila detectado por Carvalho (2011), onde foi obtido 10mg. L⁻¹ do composto com 24 horas de fermentação. Foi observada pouca diferença entre as cinéticas das fermentações nas concentrações de 10% e 15% dos substratos. Já a produção de hexanoato de etila no substrato a 5% foi significativamente inferior ao produzido nos substratos com concentrações de 10 e 15%.

Gráfico 2 – Produção de hexanoato de etila na fermentação de bagaço de malte por *Neurospora* sp em diferentes concentrações.



A partir dos nutrientes oferecidos pelo substrato a base de bagaço de malte, é possível que a *Neurospora* tenha utilizado em seu metabolismo, como fonte de nutrientes para seu crescimento e desenvolvimento, o amido, as proteínas, os lipídios, e ainda, a

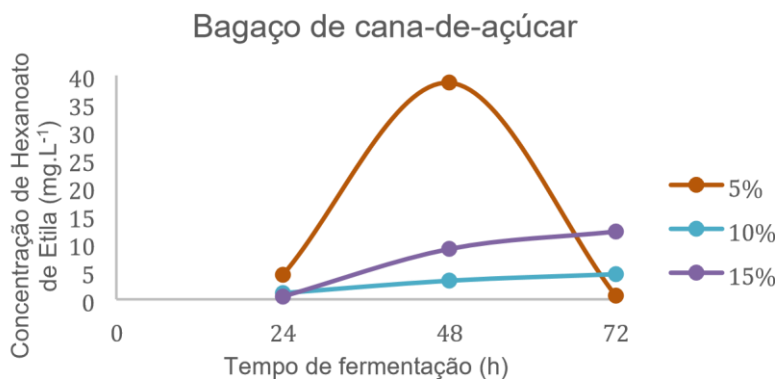
celulose, hemicelulose e lignina, uma vez que Bicas et al. (2013) afirmou que, na natureza, os fungos são capazes de utilizar uma abundância de polímeros existentes como fonte nutricional, onde destacam-se resíduos de origem vegetal.

Os compostos voláteis podem ser originados a partir de lipídios seguindo diversas vias metabólicas, onde a via primária inclui a α - β -oxidação, além da oxidação por enzimas lipoxigenases. A produção de éster por via microbiológica deve ocorrer por acoólise do acil-CoA e álcoois aos seus ésteres correspondentes. Portanto, o hexanoato de etila deve ser sintetizado principalmente a partir do hexanyl-CoA e etanol. Outra possibilidade é a esterificação de um ácido com um álcool (CARVALHO et al, 2012).

3.3.2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

A maior concentração de hexanoato de etila, de aproximadamente 39 mg.L⁻¹, encontrada no meio de bagaço de cana-de-açúcar foi observada na amostra fermentada por 48 horas, no substrato com concentração de 5%, após esse tempo, ocorreu a queda da concentração do composto produzido. Já nas outras duas concentrações testadas de substrato (10 e 15%), a maior quantidade de hexanoato de etila observada ocorre às 72 horas de fermentação, no entanto, em quantidades expressivamente inferiores quando comparadas ao meio com 5% de resíduo, conforme Gráfico 3.

Gráfico 3 – Produção de hexanoato de etila na fermentação de bagaço de cana-de-açúcar por *Neurospora sp* em diferentes concentrações.



Fungos dos mais diversos habitats são relacionados à degradação de celulose, componente geralmente presentes em paredes celulares associadas a lignina, hemicelulose e substâncias pécticas (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010) substância abundantes no bagaço de cana-de-açúcar.

É requerido nutricionalmente, por um fungo, em um meio de cultivo para fermentação, uma fonte de carbono para atuar na composição da biomassa do microrganismo, hidratos de carbono, utilizados pelos fungos para crescimento celular, e, para composição elementar de uma célula fúngica, é requerido uma fonte de Nitrogênio que, junto ao Carbono (45% a 55%), Oxigênio (16% a 22%), e Hidrogênio (7% a 10%) formarão de 12% a 16% da matéria seca da biomassa de um fungo (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010).

Durante a fermentação, o bagaço de cana-de-açúcar oferece à *Neurospora sp* os principais requisitos nutricionais, segundo Galvagno e Forchiassin (2010), além disso, o bagaço de cana-de-açúcar é rico em polímeros como a celulose, hemicelulose e a lignina (SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S., 2007) componentes da parede celular não extraídos na moagem do vegetal, e que, conforme dito anteriormente, são facilmente utilizados por fungos filamentosos na natureza como fonte de nutrientes, uma vez que os fungos excretam enzimas capazes de degradar macromoléculas, presentes nesses polímeros do resíduo, a moléculas menores para serem incorporadas e metabolizadas pelo microrganismo (GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. 2010).

Os compostos voláteis formados na fermentação, por exemplo, o hexanoato de etila, são resultados do metabolismo secundário dos microrganismos, sendo substâncias não essenciais ao seu metabolismo (MARÓSTICA, 2006). A formação desses compostos ocorre através da alcoólise de compostos acil-CoA ou por esterificação de um ácido com um álcool (CARVALHO, et al 2012) proveniente do mecanismo de remoção de ácidos e álcoois do meio, pelo fato do acúmulo destes ser tóxico ao microrganismo (SCHARPF et al., 1986).

O aroma obtido possui vasta aplicabilidade, uma vez que, segundo a classificação da Food and Drug Administration (FDA), não há conhecimento sobre metabólitos secundários nocivos a serem produzidos pelas cepas de nenhuma espécie de *Neurospora* (PERKINS, D. D; DAVIS, R. H., 2000).

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a linhagem utilizada de *Neurospora sp.* é produtora de hexanoato de etila em bagaço de malte e de bagaço de cana-de-açúcar. A concentração do hexanoato de etila não aumenta proporcionalmente à concentração do meio de cultivo de bagaço de cana-de-açúcar, já no resíduo bagaço de malte, a concentração do aroma aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração do meio de cultivo. São necessários novos estudos para verificar a otimização do processo de obtenção deste aroma nos resíduos.

REFERÊNCIAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Ingredientes Naturalmente Saudáveis**. Disponível em: <https://aditivosingredientes.com.br/artigos/artigos-editoriaisgeral/ingredientesnaturalmentesaudaveis>. Acesso em: 20 set. 2019.

AKACHA, N. B.; GARGOURI, M., 2014. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 675–706, 2015.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº12, de 17 de janeiro de 2007. Estabelece o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 14 set. 2020.

BERGER, R. G. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 38-43, julho. 2015.

BICAS, J. L.; MOLINA, G.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Compostos de Aroma. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. **Biotecnologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Athrnru, 2013. p. 273-296.

BICAS, J. L.; DIONISIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach to flavor industry. **Chemical Reviews**. Campinas/SP, v. 109, n. 9, p. 4518-4531, julho. 2009.

BRIGIDO, B. M. **Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora sp.*** 2000. 172f. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Campinas/SP, 2000.

BURDOCK, G. A.; FENAROLI, G. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6ªed. Editora Taylor & Francis, 2009.

CARVALHO, D. S. **Produção de aroma frutal por linhagens de *Neurospora sp* em meios sintéticos e resíduos agroindustriais**. 2011. 174p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CARVALHO, D. S.; MOLINA, G.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Fruity aroma production by *Neurospora sithophila*: Influence of precursors. **Current Topics in Biotechnology**, Campinas-SP, n. v7, p. 45-45-49. 2012.

CERVBRASIL. **Anuário 2014**. Disponível em:

<http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/anuariofinal2014.pdf>. Acesso em 02 de julho de 2020.

CHIAPPINI, C.C. Aromas naturais produzidos por micro-organismos. **Food Ingredients**, São Paulo, n. 4, ed. 4, p. 23-24, 2008.

CORDEIRO, L. G.; EI-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. João Pessoa - PB, Brasil, v.7, n. 3, p. 20-22, setembro. 2012. Disponível em: <<http://revista.gvaa.com.br>>. Acesso em 25 de janeiro de 2021.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; Merçon, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meio dos Aromas. **Química Nova na Escola**. V. 6, n. 1, p. 36. 2004.

CROPLIFE. **Cana-de-açúcar: mais de 500 anos sendo uma importante cultura para a economia brasileira**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/conceitos/canadeacucar-mais-de-500-anos-sendo-uma-importante-cultura-para-a-economiabrasileira/>>. Acesso em 08 de novembro de 2021.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Sistema FAOSTAT**. Roma: FAO, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 25 maio 2020

FAPESP. **Propriedades do bagaço da cana-de-açúcar**. 1998. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/1998/04/01/propriedades-do-bagaco-da-canadeacucar/>>. Acesso em 04 de junho de 2019.

GALLAGE, N.J.; MOLLER, B.L. Vanillin–Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid. **Molecular Plant**. v. 8, n° 1, p. 40–57. 2015.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos Fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; DE AZEVEDO, J. L. **Fungos**. Caxias do Sul -RS: EDUCS, 2010. p. 121170.

GÁMEZ, A.; GONZALES-CABRIALES, J. J.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G. & VAZQUEZ M. - J. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**. Reynosa, México, v. 74, n. 1, p. 78, maio. 2006.

GAO, W.; WU, K.; CHEN, L.; FAN, H.; ZHAO, Z.; GAO, B.; WANG, H.; WEI, D. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 41, 2016.

JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C.E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. Ind.

Industrial and Engineering Chemistry Research. Hanover, Estados Unidos, v. 41, n. 6, p. 1454-1461, março. 2002.

KAWA, L. **Resíduos da produção de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/sucroenergetico/156845-residuosdaproducao-de-cana-de-acucar.html#.XRIJluhKjIV>>. Acesso em 30 de junho de 2019.

LOPES, P. R. M.; MORALES, E. M.; MONTAGNOLLI, R. N. Cerveja brasileira: do campo ao copo. **Revista Agronomia Brasileira, Jaboticabal**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2017.

MADEIRA, J. V; NAKAJIMA, V.M; MACEDO, J. A; MACEDO, G. A. Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian Citrus residues. **Chemical Engineering Research and Design**. Campinas – SP, v. 92, n. 10, p. 18021810, outubro. 2014.

MARÓSTICA, M. R. J. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. 2006. 195. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006.

MARSARIOLI, M. **Identificação e avaliação de geração de resíduos em processo de produção de cerveja em microcervejaria e proposição de reutilização**. 2019.70 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Ambientais Sustentáveis) - Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, 2019.

MOLINA, G.; BICAS, J. L.; MORAES, E. A.; MARÓSTICA JR., M.; PASTORE, G. M. In: TUOHY, M. G. Recent Developments and Industrial Perspectives in the Microbial Production of Bioflavors. **Applications of Microbial Engineering**, p. 122–157. 2013

NIGLIO, F. S. R.; GERMER, S. P. M. G. **Adição de bagaço de malte de cevada em linguças frescas agrega valor e reduz custos de produção**. Scielo em perspectiva. Disponível em: <<https://pressreleases.scielo.org/blog/2021/10/04/adicao-de-bagacodemalte-de-cevada-em-linguicas-frescas-agrega-valor-e-reduz-custosdeproducao/#.YYnLsGDMLIV>>. Acesso em 08 de novembro de 2021.

NOERENBERG, S; REICHARDT, B; ANDELFINGER, V; EISENREICH, W; ENGEL K, H. Influence of the stereochemistry on the sensory properties of 4-mercapto-2-heptanol and its acetyl-derivatives. **J Agri Food Chem**. V. 61, p. 2062-2069. 2013.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable for production of vital enzymes and organic acids. **Environmental research**, v. 146, p. 161- 172. 2016.

PASTORE, G. M; PARK, Y. K; MIN, D. B. Production of Fruity Aroma by Neurospora from Beiju. **Mycol Res**. V. 98, p. 13001302.1994.

PERKINS, D. D; DAVIS, R. H. Evidence for Safety of Neurospora Species from Academic and Commercial Uses. **Appl. Environ. Microbiol**. Universidade de Stanford, v. 66, n. 12, p. 5107-5109, dezembro. 2000.

RIGO, M.; BEZERRA, J. R. M. V.; RODRIGUES, D. D.; TEIXEIRA, A. M. Avaliação físico-química e sensorial de biscoitos tipo cookie adicionados de farinha de bagaço de malte como fonte de fibra. **Ambiência**, Guarapuava, v. 13, n. 1, p. 47-57, 2017. rever a citação no texto

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLLO, M. Batch xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess Biosystem Engineering**. Lorena, SP, Brasil, v. 26, p.103–107, novembro. 2003.

SALES, A.; PAULINO, B, N.; PASTORE, G. M.; BICAS, J. L. Biogenesis of aroma compounds. **Current Opinion in Food Science**. Campinas-SP, Brasil, v. 19, p. 77-84, fevereiro. 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799317300760?casa_token=XU64sFpMdqoAAAAA:98rPbAlyU2yQLW963uKCQ3JdjMsm41ljAVNrxnJFJ12dR89ILmKkEII3UL7iOBHuTV_tlvCyEBQ>. Acesso em 16 de novembro de 2021.

SCHARPF, J.G.; SEITZ, E.W.; MRRIS, J.A., FARBOOD, M.I. In: **Biogenesis of aromas**, Washington, DC, ACS Symposium Series, v. 317, p. 323-346. 1986.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32. 2007.

SIMIÃO, J. **Produção de cana-de-açúcar no Brasil em 2020 é revisada para 677,9 mil t pelo IBGE**. Nova Cana. Disponível em:

<<https://www.novacana.com/n/cana/safra/producao-cana-acucar-brasil-2020revisada677-9-mi-t-ibge-130121>>. Acesso em 15 de janeiro de 2021.

STREBE, C. E. **Aromas naturais, uma forte tendência de mercado**. Disponível em:

<<https://www.duasrodas.com/aromas-naturais-uma-forte-tendencia-de-mercado-2/>>. Acesso em 09 de novembro de 2021.

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 27, p. 241-246, 2015.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 2003. 134p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência de Alimentos). - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Environment and Resources**. Hanover, Estados Unidos. v. 24, p. 189-226. 1999.

YAMAUCHI, H; OBATA, T; AMACHI, T; HARA, S. Production of characteristic odors by *Neurospora*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3115-3116, 1991.

YOSHIZAWA, K; YAMAUCHI, H; HAUSO, 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.