

14º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2023

AVALIAÇÃO DO USO COMBINADO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOAROMA FRUTAL.

LUANA LETÍCIA DA SILVEIRA¹, CHRISTIANN DAVIS TOSTA², DANIELE SOUZA DE CARVALHO³

¹ Graduanda em Engenharia de Biosistemas, Bolsista PIBIC, IFSP, Câmpus Avaré, luana.silveira@ifsp.edu.br.

² Professor Colaborador, IFSP, Câmpus Matão, cdtosta@ifsp.edu.br.

³ Professora Orientadora, IFSP, Câmpus Avaré, danisc31@ifsp.edu.br.

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

RESUMO: O presente estudo testou o uso combinado de resíduos agroindustriais visando a produção do hexanoato de etila por *Neurospora sitophila* n° CTT 5055. Um grama da biomassa gerada, na etapa do pré-inóculo, foi adicionado ao meio com concentração de 10% m/v de resíduos agroindustriais em água destilada em diferentes proporções, sendo o tratamento 1- 1:1:1; de bagaço-de-cana, bagaço de malte e casca de banana respectivamente. Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados em shaker de bancada a 200 rpm e 30°C, sendo coletadas as amostras a cada 24 horas até completar 72 horas de fermentação. O experimento foi registrado através de um cromatograma gerado por um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC). A comparação do tempo de retenção, bem como a comparação do espectro de massas das amostras foram utilizadas como parâmetros de confirmação do pico alvo. Em todas as amostras houve a produção do bioaroma de interesse, observando-se a maior produção. Observando-se a maior produção no tempo de 48 horas, produzindo 2,34 mg/L do bioaroma frutal.

PALAVRAS-CHAVE: *Neurospora sitophila*; Bagaço de cana-de-açúcar; Bagaço de malte; Casca de banana; Hexanoato de etila.

EVALUATION OF THE COMBINED USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES AS A CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF FRUCTAL BIOAROMA.

ABSTRACT: This study tested the combined use of agro-industrial waste for the production of ethyl hexanoate by *Neurospora sitophila* n° CTT 5055. One gram of the biomass generated in the pre-inoculum stage was added to a medium with a concentration of 10% m/v of agro-industrial waste in

distilled water in different proportions, the treatment being 1:1:1; cane bagasse, malt bagasse and banana peel respectively. After inoculation, the erlenmeyer flasks were incubated in a bench shaker at 200 rpm and 30°C. Samples were taken every 24 hours until 72 hours of fermentation were completed. The experiment was recorded using a chromatogram generated by a gas chromatograph coupled to a flame ionization detector (GC-FID). Comparison of the retention time and the mass spectrum of the samples were used as parameters to confirm the target peak. All the samples produced the bioaroma of interest, with the highest production observed. The highest production was observed at 48 hours, producing 2.34 mg/L of the fruity bioaroma.

KEYWORDS: *Neurospora sitophila*; Sugarcane bagasse; Malt bagasse; Banana peel; Ethyl hexanoate.

INTRODUÇÃO

A realização da produção de aromas pode ser por meio da produção biotecnológica, a qual ocorre em condições brandas, utilizando-se de microrganismos, atraindo consumidores que buscam por produtos naturais e saudáveis, colaborando com o meio ambiente. Além disso, pode-se incluir a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais no processo, seja para contribuir no crescimento de biomassa ou até mesmo como substrato no processo fermentativo (Carvalho, 2011; Nnolim; Okoh; Nwodo, 2020).

O Brasil por ser um país agrícola é uma ótima fonte de diferentes resíduos que podem ter valor agregado. Neste contexto, o uso de substratos advindos de resíduos agroindustriais torna-se atrativo pela redução de custo no processo biotecnológico aliado à redução de impacto ambiental. Por esses motivos, a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos tem sido considerada uma boa alternativa para novos substratos, além de ajudar na redução do impacto ambiental (Prakash, 2018).

O gênero *Neurospora*, pertencente a um grupo de fungos filamentosos, é relatado como produtor de hexanoato de etila, um éster caracterizado por possuir intenso aroma frutal amplamente utilizado na indústria de alimentos (Carvalho, 2011).

O hexanoato de etila, é um éster com fórmula molecular $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, caracteriza-se por ser um líquido incolor com ponto de ebulição a 168°C e forte aroma frutal, com descritores sensoriais de abacaxi, maçã, morango, banana, butiá, pêra, pêsego, floral, vinho e conhaque. (Carvalho et al., 2012).

Portanto o objetivo desse trabalho foi produzir e avaliar o melhor tempo de produção de hexanoato de etila em 120 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados glicose, peptona, extrato de malte, extrato de levedura, PDA, éter de etílico, hexanoato de etila e 2-heptanol.

A *Neurospora sitophila* n° CCT 5055 foi obtida da Fundação Andre Tosello e para a produção do aroma foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte e casca de banana combinados, que foram doados e mantidos em refrigeração, durante a realização do trabalho.

A linhagem de *Neurospora sitophila* foi repicada em 4 tubos contendo PDA (Potato Dextrose Agar) por 72 horas, após foram acrescidos de 10 mL de água estéril, raspados e transferidos para Erlenmeyer 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 gerada foi recolhida através de um sistema de filtração a vácuo em condições estéreis.

Um grama da linhagem de *Neurospora* foi adicionado ao meio com a combinação de resíduos agroindustriais sendo eles: bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte e casca de banana na proporção 1:1:1, exceto no branco.

Após os erlenmeyers foram 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 120 horas e congeladas para posterior análise. Foram realizados um branco e 8 repetições da combinação dos resíduos.

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 obtido 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.

Como parâmetros de identificação foram utilizados a comparação com o tempo de retenção do pico alvo com o do padrão analítico do hexanoato de etila bem como a comparação do espectro de massas da amostra.

Cada amostra que apresentou no cromatograma, um pico com tempo de retenção idêntico ao do padrão de hexanoato de etila foi analisado num espectrômetro de massas para a confirmação da identidade do analito. Cada análise foi registrada em um sistema cromatógrafo gasoso acoplado em um espectrômetro de massas (Thermo Scientific). A temperatura da interface CG-EM será 250°C e a energia de impacto de +70eV com modo scan com faixa de razão massa/carga de 35 a 350.

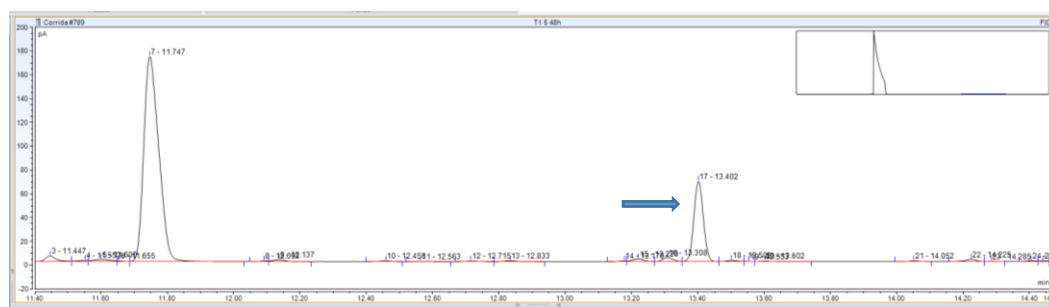
Os resultados obtidos passaram por análises, obtendo-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação o tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de hexanoato de etila nos resíduos agroindustriais acontece uma vez que a *Neurospora*, tem a capacidade de secretar enzimas extracelulares, utilizando os compostos presentes nos resíduos de bagaço de malte, o qual possui: maltose, celulose, hemicelulose, vitaminas, aminoácidos, lipídios, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, cobre, boro, manganês, zinco, amoníaco e carbono orgânico (Carvalho, 2011), no bagaço de cana de açúcar que consiste basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (Rodrigues et al., 1993) e na casca de banana que a apresenta compostos fenólicos, fibras, proteínas e minerais (Carvalho, 2015).

Todas as amostras extraídas passaram por um cromatógrafo gasoso e mostraram que continham o analito de interesse. É possível observar na figura 1 o exemplo de um cromatograma obtido de uma amostra do tratamento, onde o pico do hexanoato de etila está presente.

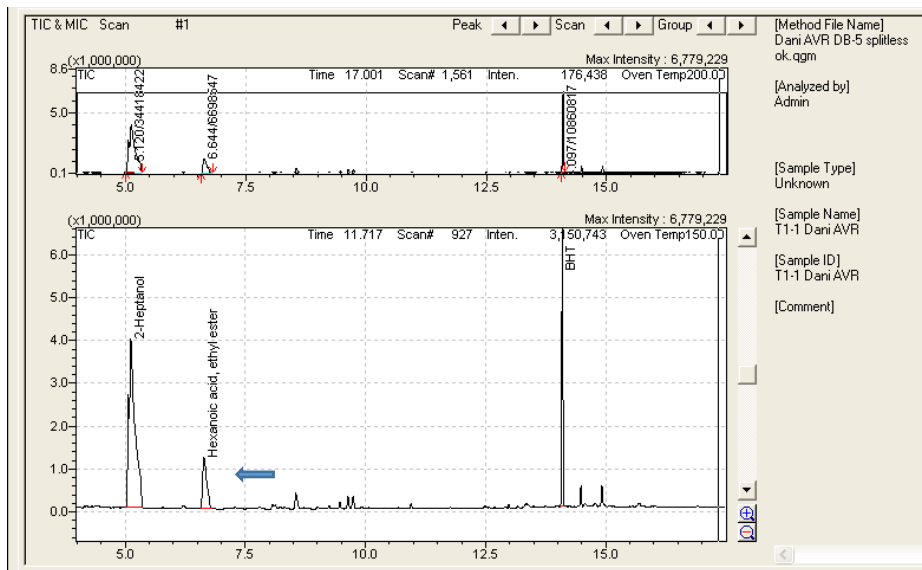
Figura 1: Cromatograma do tratamento após 48 horas.



Fonte: Autoria própria.

A identificação do hexanoato de etila foi feita por meio do espectro de massa e índice de retenção acordados com padrão e comparando os espectros com bibliotecas de bancos de dados espectrais de massa de Adams (2007) e NIST8, com similaridades superiores a 97%.

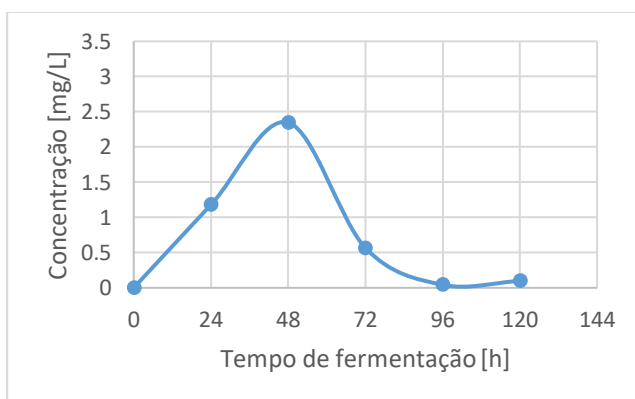
Figura 2: Cromatograma e espectro de massas obtido nas amostras com 48 horas de fermentação.



Fonte: Autoria própria.

Foi produzido diferentes quantidades de hexanoato de etila conforme pode ser observado na figura 3, sendo que a maior produção foi com o tempo de 48 horas de fermentação, produzindo 2,34 mg/L do bioaroma frutal.

Figura 3: Produção do hexanoato de etila obida durante 120 horas de fermentação a 30°C e 200rpm com o uso combinado dos resíduos.



Fonte: Autoria própria.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a produção de hexanoato de etila ocorreu a partir das 24 horas tendo seu ápice com 48 horas com a combinação do bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte e casca de banana na proporção 1:1:1 a uma temperatura de 30°C sob agitação de 200 rpm,

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

D.S.C contribuiu na criação do projeto, em toda a orientação, instruções, passo a passo, além de participar também da análise de dados e correções do material desenvolvido.

L.L.S. contribui na parte prática do desenvolvimento, na elaboração do material científico desenvolvido e na análise e tabulação dos dados.

C.D.T. contribuiu com a análise no cromatógrafo gasoso acoplado no espectrômetro de massas.

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

AGRADECIMENTOS

Ao programa financiador PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) pela bolsa de estudo e ao IFSP Campus Avaré por proporcionar toda infraestrutura necessária.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. (2007). **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA.

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

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.

CARVALHO, V. S. (2015). **Aproveitamento da casca da banana na elaboração de barras de cereais: avaliação dos compostos bioativos, características físicas e sensoriais**. Tese. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, Brasil.

NNOLIM, N. E.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. **Biotechnology Reports**, v. 27, 2020. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00483

PRAKASH, H.; CHAUHAN, P. S.; GENERAL, T.; SHARMA, A. K. T.. Development of eco-friendly process for the production of bioethanol from banana peel using inhouse developed cocktail of thermo-alkalizable depolymerizing enzymes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 7, p. 1003–1016, 2018.

RODRIGUES, R.C. e PEIXOTO, R.R. Avaliação nutricional do bagaço de cana-de-açúcar de microdestilaria de álcool para ruminantes. **Rev. Bras. Zootecnia**. v 22: 212-221. 1993.