



PRODUÇÃO DE 6-PENTIL- α -PIRONA A PARTIR DO
Trichoderma harzianum EMPREGANDO BAGAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR

Natália Cristina Ladeira
Vânia Jordão Peixoto

Projeto de Final de Curso

Orientadoras

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Elisabete dos Santos Barbosa, M.Sc.

Setembro de 2009

PRODUÇÃO DE 6-PENTIL- α -PIRONA A PARTIR DO
Trichoderma harzianum EMPREGANDO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR

Natália Cristina Ladeira
Vânia Jordão Peixoto

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenharia de Alimentos.

Aprovado por:

Aline de Souza Ramos, D.Sc.

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc.

Orientado por:

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Elisabete dos Santos Barbosa, M.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Setembro de 2009

Ladeira, Natália Cristina. , Peixoto, Vânia Jordão.

Produção De 6-Pentil- α -Pirona a partir do *Trichoderma Harzianum* Empregando Bagaço de Cana-de-Açúcar / Natália Cristina Ladeira e Vânia Jordão Peixoto. Rio de Janeiro : UFRJ/EQ, 2009.

xi, 43 p.; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009

Orientadoras: Selma Gomes Ferreira Leite e Elisabete dos Santos Barbosa

1. Aroma de coco. 2. Fermentação em estado sólido. 3. 6-Pentil- α -Pirona. 4. Projeto Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Selma Gomes Ferreira Leite e Elisabete dos Santos Barbosa. I. Título.

Aos nossos pais, por toda dedicação e apoio

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido a realização deste trabalho.

Aos nossos pais, pelo amor, dedicação e incentivo ao nosso crescimento pessoal e profissional.

À professora Selma Gomes Ferreira Leite, pela carinhosa orientação dada durante a realização do projeto final.

À Elisabete dos Santos Barbosa, por toda atenção e orientação nos experimentos e apoio e compreensão nas horas difíceis.

Ao Henrique Muniz Bechara por nos ajudar na realização dos experimentos.

À Danielle de Almeida Carvalho, por ter viabilizado as análises no CG-EM na FIOCRUZ.

Aos amigos de faculdade: Erika, Thais, Thalyta e Vinicius pela agradável convivência e por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO DE 6-PENTIL- α -PIRONA A PARTIR DO *Trichoderma harzianum* EMPREGANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Natália Cristina Ladeira
Vânia Jordão Peixoto

Orientadoras: Selma Gomes Ferreira Leite
Elisabete dos Santos Barbosa

6-Pentil- α -pirona (6-PP) é uma lactona insaturada com aroma característico de coco e uso aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), porém de síntese química difícil. Sendo assim, o presente trabalho teve como principal objetivo verificar a produção de 6-PP por fermentação em estado sólido realizada pelo fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* a partir do resíduo agrícola bagaço de cana-de-açúcar. Para determinar as melhores condições de produção foi gerado um planejamento fatorial fracionário cujas variáveis foram: glicose, MgSO₄, ZnSO₄, (NH₄)₂SO₄, FeSO₄, CaCl₂, KCl, KH₂PO₄, que são os componentes do meio reacional. As fermentações foram conduzidas em frascos de 250 mL contendo 4,5g de bagaço de cana-de-açúcar adicionados de 10 mL da solução nutriente e 1 mL da suspensão com os esporos. Os frascos foram incubados a 28 °C por 9 dias, sendo realizadas extrações do aroma no terceiro, quinto, sétimo e nono dias, utilizando-se 1,0 g do fermentado obtido homogeneizados em 10 mL de diclorometano, com agitação constante, durante 20 minutos. Para analisar o aroma produzido, utilizou-se cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Com os resultados obtidos a partir da cinética de produção do aroma, observou que no sétimo dia de cultivo o aroma apresentava sua concentração máxima. Para a avaliação dos componentes da solução nutritiva utilizada no processo, foi realizado um planejamento fatorial fracionado, acrescentando a variável sacarose. As extrações foram feitas no sétimo dia de fermentação e os resultados mostraram que das 9 variáveis estudadas, apenas 3, a glicose, sacarose e sulfato de magnésio, apresentaram-se significativas para avaliação dos componentes do meio quando avaliadas separadamente. Já considerando as interações podemos perceber que foram significativas as interações entre glicose x sacarose e glicose x sulfato de amônio.

Palavras-chave: 6-Pentil- α -Pirona, Fermentação em estado sólido, aroma de coco

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – 6-Pentil- α -pirona, p. 06

Figura 2.2 – Aromas e suas fórmulas estruturais , p. 08

Figura 2.3 – Biossíntese de uma δ -lactona saturada, p. 11

Figura 2.4 – *Trichoderma* spp. em placa de Petri, p. 18

Figura 4.1 - Curva-padrão para quantificação de 6-PP, p. 26

Figura 4.2 - Cinética de produção de 6-PP por fermentação em estado sólido (FES), p. 27

Figura 4.3 – Teor de umidade durante a cinética de FES, p. 28

Figura 4.4 – Diagrama de Pareto para a variável de resposta 6-PP, p. 30

Figura 4.5 – Gráfico de correlação entre os valores previstos pelo modelo e observados experimentalmente, p. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Aromas e respectivos microrganismos produtores, p. 09

Tabela 2.2 – Composição do bagaço da cana-de-açúcar, p.16

Tabela 2.3 – Composição das fibras presentes no bagaço da cana-de-açúcar, p. 17

Tabela 3.1 – Composição da solução nutriente utilizada na fermentação do bagaço de cana-de-açúcar, p. 21

Tabela 3.2 – Variáveis e domínios experimentais avaliados no planejamento fatorial fracionário, p. 23

Tabela 4.1 – Resultados do planejamento fatorial fracionado para a avaliação de produção de 6-PP, p. 29

Tabela 4.2 – Resultados da análise de regressão do planejamento fatorial fracionado (variáveis normalizadas), p. 31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-PP – 6-Pentil- α -Pirona

FES – Fermentação em estado sólido

a_w – Atividade de água

CG-EM – Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas

Gli - Glicose

Sac - Sacarose

Sulf. Mg – Sulfeto de Magnésio

Sulf. Am – Sulfeto de Amônio

Sulf. Zn – Sulfeto de Zinco

Cl. de Ca – Cloreto de Cálcio

Fosf. de Pot. – Fosfato de Potássio

Cl. de Pot. – Cloreto de Potássio

Sulf. Ferroso – Sulfeto Ferroso

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 2 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 | Introdução | 5 |
| 2.2 | O aroma 6-Pentil-α-pirona | 5 |
| 2.3 | Obtenção biotecnológica de aromas | 6 |
| 2.3.1 | Histórico da produção de aromas por vias biotecnológicas | 7 |
| 2.3.2 | Produção de 6-Pentil- α -pirona por <i>Trichoderma</i> | 10 |
| 2.3.3 | Etapas da produção de aromas por vias biotecnológicas | 13 |
| 2.4 | Fermentação em estado sólido | 13 |
| 2.5 | Resíduos agroindustriais | 15 |
| 2.5.1 | Bagaço da cana-de-açúcar | 16 |
| 2.6 | <i>Trichoderma harzianum</i> | 17 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 | Microrganismos e forma de conservação | 21 |
| 3.2 | Preparo dos meios e condições de cultivo para a produção de 6-PP | 21 |
| 3.3 | Obtenção de inóculo | 22 |
| 3.4 | Cinética de produção de 6-PP | 22 |
| 3.5 | Medida do teor de umidade em FES | 22 |
| 3.6 | Avaliação dos componentes da solução nutriente | 22 |
| 3.7 | Métodos analíticos | 23 |
| 3.7.1 | Extração com solvente orgânico para detecção do 6-PP | 23 |
| 3.7.2 | Quantificação de 6-PP por CG-EM | 23 |
| 3.8 | Construção da curva padrão de 6-PP | 24 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 4.1 | Construção da curva-padrão | 26 |
| 4.2 | Cinética de produção do 6-PP | 26 |
| 4.3 | Medida do teor de umidade em FES | 28 |
| 4.4 | Avaliação dos efeitos dos componentes da solução nutriente | 28 |

| | | |
|------------|-----------------------------------|-----------|
| 5 | CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 35 |
| 5.1 | Conclusões | 35 |
| 5.2 | Sugestões | 36 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

Introdução

1- INTRODUÇÃO

Substâncias aromatizantes são importantes para a indústria alimentícia e farmacêutica por aumentarem a aceitação dos produtos pelos consumidores. Dos 100 compostos de aroma produzidos microbianamente, poucos são produzidos em escala industrial, devido à falta de conhecimentos das rotas metabólicas envolvidas na biossíntese desses compostos (RAMOS, 2006).

Os aromas são formados por substâncias químicas, como ésteres, ácidos, cetonas, aldeídos, alcoóis e terpenos. Os aromas sintéticos ou idênticos ao natural são assim classificados por possuírem moléculas com as mesmas estruturas dos aromatizantes naturais. A diferença entre um aroma idêntico e um autêntico está no método de obtenção dessas moléculas. Enquanto nos aromas naturais elas são obtidas a partir de produtos de origem animal ou vegetal, por processos físicos, as demais são geradas por reações químicas de síntese em laboratórios. Quando essa síntese dá origem a moléculas que não existem na natureza, os aromas são considerados artificiais ou sintéticos.

A procura por novos aromas e pela sua produção biotecnológica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, pois são extremamente importantes para a indústria alimentícia e farmacêutica, aumentando a aceitação dos produtos pelos consumidores. De acordo com uma pesquisa realizada nos Estados Unidos pelo Food Marketing Institute, em 1993, a qualidade sensorial de um alimento tem sido apontada pelos consumidores como sendo mais importante que o valor nutricional, o preço ou a segurança alimentar (DRUZHININA *et al.*, 2006).

Embora muitos aromas sintéticos estejam disponíveis a baixo custo, o impacto negativo do termo “artificial” faz com que as substâncias de origem natural sejam preferidas. Como dito anteriormente, só é considerado aroma natural aqueles que são obtidos a partir de produtos de origem animal ou vegetal, por processos físicos. Por isso, métodos biotecnológicos são uma alternativa economicamente interessante e várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver bioprocessos para a produção de aromas sob condições controladas (RAMOS, 2006).

O 6-pentil- α -pirona (6-PP) tem um aroma característico de coco e é produzido por síntese química, onde são requeridas sete reações sob altas temperaturas (490°C), sendo um processo difícil e caro de ser utilizado. Por este motivo, a produção de 6-PP por processos fermentativos pode ser uma interessante alternativa para a rota química. A presença de 6-PP

tem sido detectada em culturas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus* spp (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000).

Recentemente, a fermentação em estado sólido (FES) tem sido utilizada como modelo para estudar o metabolismo e fisiologia de microrganismos. Vários autores têm citado as vantagens práticas e econômicas da FES, entre elas a alta produtividade, o baixo investimento de capital e o baixo consumo de energia. Modificações dos parâmetros ambientais e nutricionais, tais como temperatura e composição do meio de cultivo, podem ser realizadas para aumentar ainda mais a produção, assim como a possibilidade da utilização de resíduos agrícolas. Nessa etapa, o planejamento estatístico de experimentos é recomendável, pois permite maximizar a resposta com esforço mínimo (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000).

O aroma de coco (6-pentil- α -pirona), produzido por espécies de *Trichoderma*, é um composto importante para a indústria de alimentos, sendo usado na indústria de bebidas, doces, iogurtes, etc. Sua forma natural, obtida apenas pela extração do aroma do próprio coco seco ou pela produção por microrganismos, é bastante desejada, despertando o interesse na avaliação das condições de fermentação, no caso do uso dos microrganismos (PRAPULLA *et al.*, 1992).

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitos, pertencente ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. Estes são fungos cosmopolitas de rápido crescimento, com capacidade de utilizar diversos substratos e com resistência a substâncias nocivas (CHAVERRI *et al.*, 2003). É de fundamental importância conhecer o máximo de características de um microrganismo para o aproveitamento de todo o seu potencial biotecnológico e emprego adequado em um bioprocessamento. Estes fungos não são considerados importantes patógenos humanos, embora recentemente tenham sido relatadas ocasionais infecções oportunistas causadas principalmente por *Trichoderma longibrachiatum* (DRUZHININA *et al.*, 2006).

Desta forma, o presente trabalho teve como principal objetivo a produção de 6-PP pelo fungo *Trichoderma harzianum*. Para isso, empregou-se bagaço de cana-de-açúcar na fermentação em estado sólido e o planejamento estatístico de experimentos como ferramenta em algumas etapas da avaliação da composição do meio reacional.

Revisão Bibliográfica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Introdução

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) (WELSH *et al.*, 1989), aroma natural representa um óleo essencial, uma oleoresina, essência ou extrato, proteína hidrolisada, ou destilada, ou qualquer produto originado a partir da torrefação, aquecimento ou ação enzimática, que contém os constituintes do aroma proveniente de uma especiaria, fruta ou suco de fruta, vegetal ou suco de vegetal, fungo comestível, erva, casca, raiz, folha ou material similar a planta, carne vermelha, pescado, galinha, ovos, produtos derivados do leite, ou produtos derivados da fermentação, cuja função relevante nos alimentos é aromatizar ao invés de nutrir.

Essa definição de aroma natural compreende, assim, produtos que são convertidos por células vivas ou parte delas, incluindo enzimas.

Durante um longo tempo, os aromas eram obtidos principalmente de óleos essenciais extraídos de espécies vegetais. No entanto, os componentes sensorialmente ativos estão frequentemente presentes em baixas concentrações, o que torna seu isolamento difícil e dispendioso (JANSSENS *et al.*, 1992).

Atualmente, muitos aromas sintéticos estão disponíveis a baixo custo. O isolamento, a identificação e a síntese da vanilina no século XIX foram o marco inicial da indústria moderna de aromatizantes. Alimentos contendo aromas sintéticos tendem a ser evitados porque o consumidor suspeita de que possam ser tóxicos ou causar algum tipo de dano à saúde (KRINGS e BERGER, 1998).

Como uma fonte alternativa para a produção de aromas, o desenvolvimento de processos biotecnológicos usando microrganismos capazes de produzir compostos orgânicos voláteis aromáticos vem se tornando cada vez mais atrativos (BUZZINI *et al.*, 2003).

2.2 – O aroma 6-Pentil- α -pirona

A 6-pentil- α -pirona (6-PP) é uma lactona insaturada, também denominada 6-Pentil-2-pirona ou 6-*n*-pentil-2H-piran-2-ona (Figura 2.1). Ela possui aroma característico de coco e está presente em frutas, o que faz com que possa ser empregada na aromatização de alimentos. A substância também apresenta potente atividade antifúngica, provavelmente relacionada com a capacidade de ser adsorvida pelas membranas hidrofóbicas das células (BONNARME *et al.*, 1997).

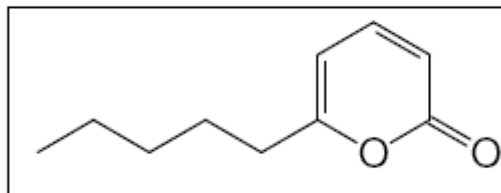


Figura 2.1 – 6-Pentil- α -pirona

2.3 – Obtenção biotecnológica de aromas

Atualmente, muitos aromas sintéticos estão disponíveis a baixo custo. O isolamento, a identificação e a síntese da vanilina no século XIX foram o marco inicial da indústria moderna de aromatizantes. Mas a síntese química apresenta as desvantagens da formação de uma mistura de isômeros e o impacto negativo do termo “artificial” que caracterizam seus produtos. Alimentos contendo aromas sintéticos tendem a ser evitados porque o consumidor suspeita que possam ser tóxicos ou causar algum tipo de dano à saúde (KRINGS e BERGER, 1998).

No mundo oriental, as antigas origens da Biotecnologia estão na produção de vários itens, como fabricação de cerveja, vinho e vinagre, queijos, pães e outros cereais. Hoje, a produção desses alimentos e bebidas vem melhorando graças ao aumento do conhecimento científico dos organismos usados (DAMASO *et al.*, 2008).

A maioria dos aromas naturais é resultado de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais, encontrados em baixas concentrações. Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos filamentosos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias. Fungos do gênero *Ceratocystis* produzem uma grande quantidade de aromas de frutas ou de flores (pêssego, abacaxi, banana, citrus e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo. A *Ceratocystis frimbiata* tem potencial para síntese de éster, cresce rapidamente e produz uma grande variedade de aromas (UENOJO & PASTORE, 2006).

Como dito anteriormente, vários autores têm citado as vantagens práticas e econômicas da FES para produção de aromas. A técnica de FES envolve o crescimento e metabolismo dos microrganismos na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato sólido ou resíduo. Processos usando substratos sólidos são economicamente importantes para países

como o Brasil, com uma abundância de resíduos agro-industriais e biomassa, que podem ser usados como matérias-primas baratas. Essa técnica tem muitas vantagens em comparação com a fermentação submersa, incluindo rendimentos superiores e menos demanda de energia (DAMASO *et al.*, 2008).

Resíduos agroindustriais como casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, bagaço de uva, bagaço de mandioca, bagaço de beterraba doce podem ser utilizados como substratos em bioprocessos para a produção de compostos de maior valor agregado, como enzimas, etanol, proteínas, ácidos orgânicos e compostos de aroma, desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (UENOJO & PASTORE, 2006).

2.3.1 – Histórico da produção de aromas por vias biotecnológicas

Por milhares de anos, os seres humanos têm usado técnicas para produzir alimentos com aromas atrativos, de maneira acidental ou intencional, muitas vezes sem se dar conta de que microrganismos estavam envolvidos na maioria dos casos. Com os avanços científicos, verificou-se que microrganismos poderiam sintetizar substâncias de odor característico e muitas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de processos para a bioprodução de aromas sob condições controladas (VANDERHAEGEN *et al.*, 2003).

Os microrganismos são frequentemente associados à falta de qualidade ou à deterioração de alimentos. Entretanto, as biotecnologias de alimentos empíricas, praticadas há milênios, são as raízes da moderna tecnologia de alimentos e bebidas como cerveja, vinho, vinagre, queijos, pães e vegetais fermentados. Estes devem seu perfil de aroma típico à capacidade metabólica de numerosos microrganismos (CHIAPPINI, 2004).

O primeiro relato publicado sobre a capacidade de bactérias e fungos selecionados produzirem fragrância foi realizado por Omelianski, em 1923. Em seu trabalho, o autor destacou as leveduras como um dos grupos mais importantes de microrganismos, que produz, em cultura, um forte aroma etéreo, de variada intensidade, que lembra o odor de frutas como morango, abacaxi, maçã, pêra e melão. Omelianski realizou uma série de experimentos com microrganismos isolados do leite e de algumas frutas, onde variou a composição do meio de cultura e obteve, em diferentes substratos, o que chamou de aroma de morango, aroma de fruta impuro e aroma de queijo (CHIAPPINI, 2004).

A relação entre a fisiologia microbiana e a produção de metabólitos com odor, entretanto, só veio a ser identificada em estudos realizados nos anos 50. A partir daí, um

número significativo de trabalhos sobre compostos aromatizantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras começou a ser publicado (CHIAPPINI, 2004).

As pesquisas foram inicialmente direcionadas à avaliação da biossíntese e à identificação de compostos de aromas específicos. Uma primeira lista de compostos voláteis em alimentos compreendia umas poucas centenas de constituintes. Com o advento de modernos instrumentos de análise, particularmente a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o número de compostos identificados aumentou significativamente e uma compilação recente apontou mais de 10.000 compostos (CHIAPPINI, 2004). A figura 2.2 apresenta algumas fórmulas estruturais de compostos aromatizantes.

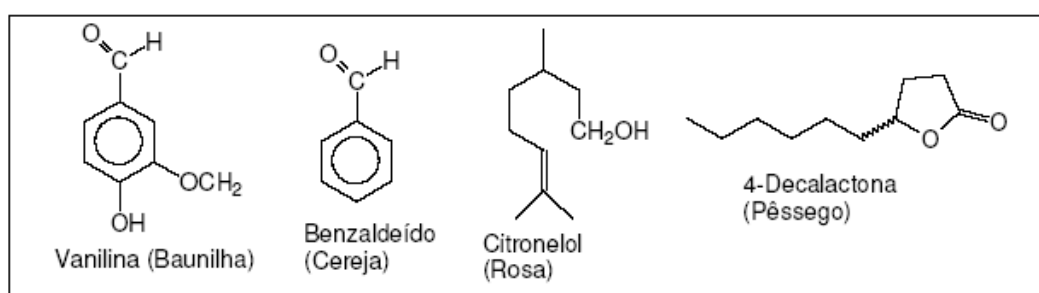


Figura 2.2 – Aromas e suas fórmulas estruturais (JANSSENS *et al.*, 1992; FERON, BONNARME e DURAND, 1996).

Tecnologias complementares contribuíram para a caracterização estrutural dos compostos aromatizantes, como os ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi*, o aroma de coco detectado em cultivos de *Trichoderma viride*, *Myocacia uda*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trichoderma harzianum*, o agradável aroma de maçã percebido no cultivo da levedura *Dipodascus aggregatus* e muitos outros. O desenvolvimento de métodos biotecnológicos para a obtenção de aromas específicos pode se tornar bastante árduo porque a maior parte dos aromas naturais é o resultado da mistura de compostos que podem chegar a centenas (CHIAPPINI, 2004). Na tabela 2.1, pode-se observar alguns aromas produzidos por distintos microrganismos.

Tabela 2.1 – Aromas e respectivos microrganismos produtores (JANSSENS et al., 1992; KRINGS e BERGER, 1998)

| Substância | Microrganismo |
|---|--|
| Fungo filamentoso | |
| Vanilina | <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> |
| Benzaldeído | <i>Ischnoderma benzoinum</i> |
| Salicilato de metila | <i>Phellinus</i> sp. |
| Benzoato de metila, benzoato de etila | <i>Polyporus tuberaster</i> , <i>Phellinus</i> sp. |
| 2-Feniletanol | <i>Ascoidea hylecoeti</i> |
| Citronelol | <i>Mycena pura</i> |
| Geosmina | <i>Chaetomium globosum</i> |
| Linalool | <i>Wolfiporia cocos</i> |
| Linalool, citronelol, geraniol, a-terpineol | <i>Chaetocystis fimbriata</i> |
| Cumarinas | <i>Pleurotus euosmus</i> |
| Metil-cetonas | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Aureobas pullulans</i> |
| Pirazinas | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 4-Decalactona | <i>Ceratocystis moniliformis</i> |
| 6-pentil- α -pirona | <i>Trichoderma viride</i> |
| Leveduras | |
| Acetato de etila | <i>Hansenula anomala</i> |
| Furaneol | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> |
| Citronelol, geraniol, linalool | <i>Kluyveromyces lactis</i> |
| 4-Decalactona | <i>Sporobolomyces odoros</i> , <i>S. roseus</i> |
| Lactonas macrolíticas | <i>Torulopsis bombicola</i> |
| Feniletanol e ésteres | <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| Bactérias | |
| Diacetil | <i>Lactobacillus lactis</i> |
| Ácidos graxos de cadeia curta | <i>Aerobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Propionobacterium</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. |
| Metil-cetonas | <i>Pseudomonas oleovorans</i> |
| Geosmina | <i>Streptomyces citreus</i> |
| Pirazinas | <i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. |
| Borneol, isoborneol | <i>Pseudomonas pseudomallei</i> |

O desafio de produzir compostos químicos do aroma por meio de biossíntese, entretanto, vem sendo vencido com entusiasmo pelas companhias produtoras. Elas apontam

como vantagens deste método a produção de múltiplos componentes, que contribuem para um perfil balanceado do aroma; a obtenção de novos efeitos de aroma, com características únicas, não obtidos com processos tradicionais; a obtenção de perfis de aroma que são considerados naturais pelos consumidores; e a potencialidade para a produção de volumes que atendam ao mercado internacional. Uma análise do custo-benefício da produção de aromas por microrganismos demonstrou que, para compostos aromatizantes com valor de mercado a partir de US\$ 200 por quilograma, a rota microbiana torna-se econômica, enquanto para aromas com preços inferiores a este valor a produção por biossíntese não é conveniente. Isto quer dizer que o valor de mercado do composto aromatizante e a elasticidade de seu preço irão tornar vantajosa ou não a biossíntese de um aroma (CHIAPPINI, 2004).

2.3.2 – Produção de 6-Pentil- α -pirona por *Trichoderma*

O 6-PP foi identificado como a principal substância volátil produzida pelo fungo *Trichoderma viride* (COLLINS e RALIM, 1972).

A presença de 6-PP tem sido detectada em culturas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus spp.* (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000). Ainda não se tem bem estabelecido as vias metabólicas de biossíntese com a maioria dos estudos envolvendo a pesquisa da produção de lactonas saturadas. Esses estudos indicam que as moléculas de lactonas saturadas são formadas a partir de sucessivas β -oxidações de ácidos orgânicos hidroxilados ou de seus precursores lipídicos até formarem um carbono hidroxilado na posição C-4 ou C-5. Então, γ - e δ - lactonas podem ser formadas pela esterificação (lactonização) das hidroxilas em C-4 ou C-5 com o grupo carboxílico da mesma molécula, conforme apresentado na figura 2.3. É possível também a formação dessas moléculas a partir de vários ceto-ácidos depois da redução até seus correspondentes hidroxil-ácidos ou através de uma via biosintética alternativa envolvendo o metabolismo do ácido glutâmico (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 1993).

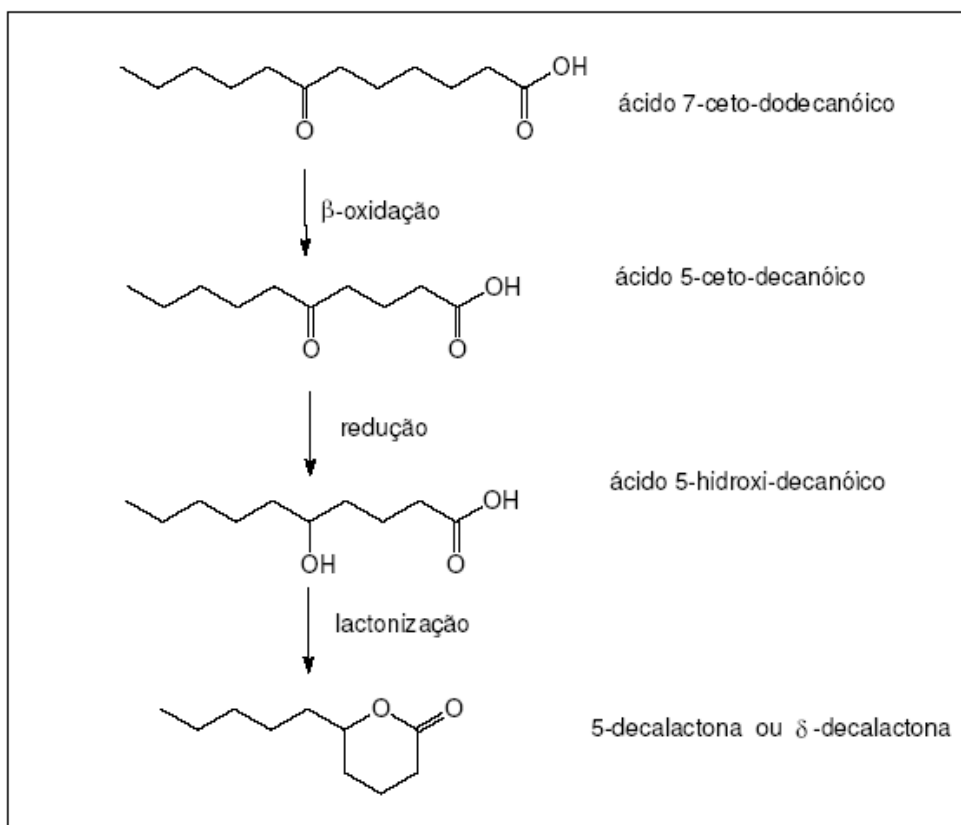


Figura 2.3 – Biossíntese de uma δ -lactona saturada (WELSH *et al.*, 1989)

Diversos fatores influenciam na produção de 6-PP, e um desses fatores é a seleção do microrganismo. Observou-se variações na produção de 6-PP entre diferentes espécies de *Trichoderma* e também entre linhagens da mesma espécie que mostrou que das 108 espécies de *Trichoderma* testadas por Bonnarne *et al.* (1997), apenas uma linhagem de *Trichoderma viride* foi capaz de produzir mais de 300 mg/L.

Os cultivos que foram realizados em pH 5,0-6,0 e incubados em temperaturas que variaram entre 20°C e 30°C tiveram a biossíntese significativa observada durante a fase de crescimento. (GALINDO *et al.*, 2004).

Foram avaliados também os fatores nutricionais. Constatou-se que altas relações carbono/nitrogênio são favoráveis à biossíntese de 6-PP e que a formação de biomassa ocorre quando essa relação é baixa. Além de ter que estar presente em baixas concentrações, o nitrogênio na forma de íon amônio parece estimular a produção do aroma (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 1993).

A produção de 6-PP pode ser uma resposta antagonista do fungo a situações desfavoráveis. Rocha-Valadez *et al.* (2006) verificaram algumas modificações fisiológicas,

como crescimento microbiano, taxas de produção e esporulação no escalonamento de frascos com capacidade de 500 ml agitados para biorreator de 10L de capacidade. Os autores observaram que a biossíntese ocorreu de forma mais rápida e atribuíram as alterações ocorridas ao maior estresse hidrodinâmico e às forças de cisalhamento que foram submetidas no bioreator ao fungo.

Kalyani, Prapulla e Karanth (2000) realizaram um estudo comparando a fermentação em submerso (sob agitação) e a fermentação em superfície (sem agitação), empregando o *Trichoderma harzianum*. Nesse estudo, eles verificaram que cultivando o fungo em superfície, os resultados foram melhores.

Quando o fungo foi cultivado em submerso, também foi observada uma diminuição na concentração de 6-PP na metade após um determinado período de fermentação. Essa queda não deve ser atribuída à perda do aroma por volatilização, pois esse composto tem ponto de ebulição de 92-93°C a 0,35 mmHg (KALYANI *et al.*, 2000).

Quando foi observado baixos rendimentos, mesmo na presença de uma quantidade significativa de carboidratos no meio de cultivo, levaram Prapulla *et al.* (1992) a sugerirem uma possível inibição na produção do aroma causada pela presença do produto. Foi adicionado então pelos autores um extrato contendo 6-PP no início da fermentação e com isso eles verificaram total inibição da produção de aroma, mas não foi observado qualquer modificação macro e microscópica ou na quantidade de biomassa de *Trichoderma viride*.

Algumas técnicas já foram testadas com a intenção de remover o 6-PP durante o processo para que seja reduzido o seu efeito inibitório. Prapulla *et al.* (1992) adicionaram no início do cultivo um adsorvente (Amberlite XAD-2) que conseguia reter quase todo o aroma e com isso conseguiram elevar a produção de 90-100 mg/L para 248 mg/L. A pervaporação contínua do sistema é uma técnica que também pode ser empregada, porém apresenta efeitos negativos no desempenho do microrganismo (RITO-PALOMARES *et al.*, 2000).

Embora a maioria das informações encontradas esteja relacionada ao cultivo do microrganismo em submerso, uma alternativa prática e econômica para a produção de aromas é a fermentação em estado sólido. As concentrações de 6-PP obtidas por essa técnica são bem mais altas do que as encontradas para o meio líquido, sugerindo que o efeito inibitório limitante de uma possível produção industrial seja minimizado (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000). Entretanto, poucos trabalhos com esse enfoque foram realizados até o momento.

2.3.3 – Etapas da produção de aromas por vias biotecnológicas

Visto que o Brasil é um grande produtor de resíduos agrícolas e um acúmulo deste material representa graves problemas ambientais, projetos de pesquisa têm sido desenvolvidos desde 1986 para a utilização como substrato, já que são ricos em carboidratos e outros nutrientes. A maior vantagem encontrada no emprego desses materiais é o custo extremamente baixo, além da diminuição da poluição ambiental. Nesse sentido, vários resíduos podem ser utilizados, tais como: casca e bagaço de frutas, casco e bagaço de mandioca, bagaço de cana, polpa de beterraba, farelo de trigo, casca e farelo de arroz, sabugo e farelo de milho, resíduos da banana, casca de coco verde, entre outros (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

O desenvolvimento de qualquer bioprocessamento por fermentação inclui as seguintes etapas: a seleção do microrganismo e substrato adequados, a avaliação dos parâmetros do processo e o isolamento e purificação do produto (PANDEY, 2003).

Os materiais sólidos empregados podem ser utilizados pelo microrganismo apenas como resíduo físico. Nesse caso, o isolamento do produto é relativamente mais simples e de menor custo. Em contrapartida, substratos provenientes da prática agroindustrial, além de atuarem como resíduo, são fontes de carbono e energia para o microrganismo. No entanto, tais materiais podem sofrer lixiviação e aumentar as dificuldades no processo de purificação (PANDEY, 2003).

Assim, na escolha do resíduo é importante considerar a disponibilidade e o valor do material, bem como a sua eficiência na produção e recuperação do produto.

Muitos fungos filamentosos desenvolveram seu habitat terrestre sobre substratos úmidos e seus metabólitos são bem adaptados a esse ambiente, por isso eles são os que mais se adaptam a FES. (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Após a escolha do microrganismo e do substrato, deve ser feita a seleção e avaliação dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos do processo, tais como: tamanho de partícula, umidade inicial, pH e pré-tratamento do substrato; umidade relativa, temperatura de incubação, agitação; idade e tamanho do inóculo (PANDEY, 2003).

2.4 – Fermentação em estado sólido

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente

nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, podem crescer em substratos sólidos (AIDOO *et al.*, 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003). Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses microrganismos (PINTO *et al.*, 2005).

O interesse pela FES tem surgido devido a fatores como a fase sólida servir de resíduo para o crescimento dos microrganismos. Além disso, ela é uma alternativa para o aproveitamento e a valorização de resíduos agroindustriais com aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A temperatura é um dos parâmetros de maior influência sobre o processo fermentativo, uma vez que afeta a germinação de esporos, o crescimento microbiano, a formação de produto e a esporulação (GALVAN, 2004).

A FES também apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como resíduo para o crescimento das células microbianas;
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo (PINTO *et al.*, 2005).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS & MOLIN, 2003). Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água (a_w), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Para o entendimento da FES, a umidade tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois esta última

afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO *et al.*, 2005).

2.5 – Resíduos agroindustriais

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (PINTO *et al.*, 2005).

Os substratos para FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria (PANDEY, 2003). Eles são recursos naturais renováveis, produzidos em grandes quantidades, o que, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de resíduo para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Considerando-se o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais. Nesse sentido, a FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais. Ela agrega valor a essas matérias-primas por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros. Assim, ela contribui para uma maior diversificação do agronegócio nacional. Em escala comercial, uma das principais aplicações da FSS é a produção de ácido cítrico a partir de farelo de trigo. Esse processo, conhecido por *Koji.*, representa um quinto de todo o citrato produzido anualmente no Japão (PANDEY *et al.*, 2001).

2.5.1 – Bagaço da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar ocupa cerca de 18,768 milhões de hectares de área cultivada em todo o mundo, gerando uma produção de 1,164 bilhões de toneladas. No âmbito mundial, o destaque vai para o Brasil, que detém cerca de 26% dessa produção. No Brasil, a área colhida com cana-de-açúcar tem significado, em média, 8,4% de toda a área colhida no país, sendo superada apenas pelo milho, pela soja, pelo feijão e pelo arroz (SHIKIDA e ALVES, 2001).

A importância econômica da cana-de-açúcar está diretamente ligada aos produtos (açúcar e álcool) e subprodutos (bagaço, vinhoto, leveduras, etc.) advindos da industrialização desta planta e da sua multiplicidade de funções. O bagaço da cana, resultante da extração do caldo após o esmagamento nas moendas, pode ser utilizado na co-geração de energia elétrica, como componente para a ração animal, como adubo e/ou para a produção de celulose (TEIXEIRA *et al.*, 1997).

A composição química do bagaço da cana é mostrada nas tabelas 2.2 e 2.3. Devido ao baixo conteúdo de cinzas, o bagaço da cana apresenta vantagens em comparação a outros resíduos como a palha de arroz e a palha de trigo, que têm 17,5% e 11% respectivamente, para o uso em processo biotecnológicos como a FES usando microrganismos (SOCCOL e VADENBERGHE, 2003).

Tabela 2.2 – Composição do bagaço da cana-de-açúcar (TEIXEIRA *et al.*, 1997)

| Parâmetro | Fração (%) |
|----------------------------|------------|
| Carbono | 22 |
| Oxigênio | 23 |
| Hidrogênio | 3 |
| Cinzas | 2 |
| Umidade | 50 |
| Fibras | 46 |
| Sólidos solúveis em água | 2 |
| Sólidos insolúveis em água | 3 |

Tabela 2.3 – Composição das fibras presentes no bagaço da cana-de-açúcar (TEIXEIRA *et al.*, 1997)

| Fibra | Fração (%) |
|--------------|------------|
| Celulose | 41 |
| Hemicelulose | 25 |
| Lignina | 20 |

Nos últimos anos, um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, tem sido usado em bioprocessos que empregam o bagaço da cana como substrato para a obtenção de enzimas, o enriquecimento protéico, entre outros. Entretanto, os fungos filamentosos pertencentes à classe dos basidiomicetos têm se destacado, pois degradam os polissacarídeos da parede celular e também a lignina (SOCCOL e VADENBERGHE, 2003).

2.6 – *Trichoderma harzianum*

O gênero *Trichoderma* são fungos cosmopolitas de rápido crescimento, com capacidade de utilizar diversos substratos e com resistência a substâncias nocivas (CHAVERRI *et al.*, 2003). É de fundamental importância conhecer o máximo de características de um microrganismo para o aproveitamento de todo o seu potencial biotecnológico e emprego adequado em um bioprocessos (DRUZHININA *et al.*, 2006). Na figura 2.4 pode-se ver o cultivo de *Trichoderma spp.* em placa de Petri.



Figura 2.4 – *Trichoderma spp.* em placa de Petri. (No detalhe, esporos do fungo) (PRATES *et al.*, 2007)

O *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrole, pode proteger plantas contra patógenos de solo (COOK & BAKER, 1983) e promover crescimento de plantas (WINDHAM *et al.*, 1986), através de um fator que regula o crescimento e germinação de sementes. O gênero tem sido estudado extensivamente como fonte potencial de celulases (STERNBERG, 1976). GHOSE & GROSH (1979) sugerem que o sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose cristalina é o de *Trichoderma*.

Isolados de *Trichoderma harzianum* têm diferido na sua capacidade de atacar certos fungos fitopatogênicos, tais como: *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanias dermaatium* (ELAD *et al.*, 1982).

As espécies de *Trichoderma* são abundantes na madeira em decomposição e no solo por causa do seu sucesso nas variadas interações heterotróficas, incluindo decomposição, parasitismo e eventualmente endofitismo. Não são considerados importantes patógenos humanos, embora recentemente tenham sido relatadas ocasionais infecções oportunistas causadas principalmente por *Trichoderma longibrachiatum* (DRUZHININA *et al.*, 2006).

Fungos do gênero *Trichoderma* tem temperatura de crescimento em torno de 30° C. Caracterizam-se por colônias brancas, que crescem rapidamente em meios de cultura de rotina e que têm hifas septadas, abundantes esporos verdes e conidiosporos pouco definidos. A sua reprodução é assexuada (GUARRO *et al.*, 1999).

Além de produzir metabólitos de interesse econômico, *T. harzianum* é capaz de degradar uma grande variedade de substâncias biopoliméricas, como celulose e hemicelulose, o

que exige um grande número de enzimas extracelulares trabalhando sinergicamente para permitir a hidrólise até os monômeros correspondentes. Várias dessas enzimas são de interesse para a indústria têxtil, de papel, produtora de alimentos e ração animal (MACH e ZEILINGER, 2003).

Materiais e Métodos

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Microrganismos e forma de conservação

Os experimentos foram realizados com o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* 4040, isolado do solo de areia de praia, cedido pelo Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As culturas foram crescidas em tubos de ensaio contendo meio agar-batata-dextrose (HIMEDIA). Após cerca de sete dias a temperatura ambiente, as culturas foram mantidas a 12°C, com repiques a cada dois meses.

3.2 – Preparo dos meios e condições de cultivo para a produção de 6-PP

O resíduo agrícola utilizado para a fermentação foi o bagaço da cana-de-açúcar.

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, onde 4,5 g do resíduo seco foi impregnado com 10,0 mL da solução nutriente com a composição (g/L) apresentada na tabela 3.1. Estes foram mantidos a 28°C ±1°C em estufa bacteriológica e sem agitação.

Tabela 3.1 – Composição da solução nutriente utilizada na fermentação do bagaço da cana-de-açúcar.

| Componente | Composição (g/L) |
|---|------------------|
| Glicose | 30 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,5 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,001 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,94 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,008 |
| KCl | 0,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 |

O resíduo e a solução nutriente foram autoclavados a 115°C durante 20 minutos. Esse meio é semelhante ao utilizado por Martins (2003) e Ramos (2006), e foi o ponto de partida para os experimentos de avaliação.

3.3 – Obtenção do inóculo

Os esporos utilizados como inóculo para a produção de 6-PP foram produzidos em agar-batata-dextrose (HIMEDIA) após cerca de sete dias de cultivo, suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) e quantificados em câmara de Neubauer (média de duas contagens). O meio de produção de 6-PP foi inoculado com 1 mL de uma suspensão com $4,0 \times 10^6$ esporos/mL.

3.4 – Cinética de produção de 6-PP

Os cultivos foram realizados conforme o item 3.2 e inoculados conforme o item 3.3. A produção de 6-PP por *T. harzianum* 4040 foi avaliada após 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo. Amostras foram retiradas em triplicata, sendo utilizado um frasco de cultivo por amostra.

3.5 – Medida do teor de umidade em FES

Amostras de 0,5g de material fermentado foram colocadas em placas de Petri e incubadas em estufa a 60°C até atingir massa constante. O teor de umidade da amostra foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{(\text{massa úmida} - \text{massa seca}) * 100}{\text{massa úmida}}$$

3.6 – Avaliação dos componentes da solução nutriente

O planejamento fatorial fracionário foi empregado na avaliação da produção de 6-PP por *T. harzianum* 4040. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, frascos Erlenmeyer contendo 4,5 g de resíduo agrícola foram impregnados com uma solução nutriente. A fermentação teve sete dias de duração e a variável de resposta foi a concentração de 6-PP. Foi aplicado um planejamento 2^{9-5} . Para avaliar o efeito de 9 variáveis nos níveis descritos na Tabela 3.1, foram realizados, aleatoriamente, 16 experimentos acrescidos de 3 pontos centrais.

Nesta etapa foi utilizada como fonte de carbono glicose e sacarose para observar qual a melhor fonte para o microrganismo em questão.

Tabela 3.2: Variáveis e domínios experimentais avaliados no planejamento fatorial fracionário.

| Variável independente | Níveis | | |
|---|--------|---------|---------|
| | - | 0 | + |
| Glicose (g/L) | 0,0000 | 15,0000 | 30,0000 |
| Sacarose (g/L) | 0,0000 | 15,0000 | 30,0000 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L) | 0,0000 | 0,7500 | 1,5000 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/L) | 0,0000 | 0,0010 | 0,0005 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) | 0,0000 | 0,4700 | 0,9400 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L) | 0,0000 | 0,0050 | 0,0100 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L) | 0,0000 | 0,0040 | 0,0080 |
| KCl (g/L) | 0,0000 | 0,5000 | 0,2500 |
| KH ₂ PO ₄ (g/L) | 0,0000 | 0,5000 | 1,0000 |

As concentrações dos componentes da solução nutriente descrita no item 3.2 foram utilizadas como ponto de partida, sendo consideradas no planejamento como máximas. A concentração mínima foi considerada como 0 g/L para avaliar se a substância poderia estar ausente na solução nutriente.

Os resultados foram analisados com o auxílio do *Software Statistica 7.0* (Statsoft).

3.7– Métodos analíticos

3.7.1 – Extração com solvente orgânico para detecção do 6-PP

A extração do aroma produzido pelo fungo foi realizada da seguinte forma: após o período de fermentação, foi retirado 1,0 g de amostra e adicionados 10,0 ml de diclorometano. Em seguida, a amostra foi agitada por 20 minutos em placa de agitação magnética (Fisatom) e o sobrenadante foi filtrado em membrana milipore 0,25 µm. As amostras foram conservadas no freezer até o momento da análise cromatográfica.

3.7.2 – Quantificação de 6-PP por CG-EM

O aroma produzido foi identificado e quantificado em cromatógrafo gasoso acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) *Agilent 6890N* com ionização por impacto de elétrons, equipado com uma coluna DB-5 com 30,0 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de fase (5% fenil-metil-siloxano).

A temperatura do injetor era de 240°C e a temperatura do massas era de 250°C.

A temperatura da coluna variou da seguinte forma:

- Temperatura inicial: 40°C, mantida por 2 minutos;
- Aquecimento de 40°C a 120°C, a uma taxa de 20°C/min;
- Temperatura constante a 120°C, mantida por 2 minutos;
- Aquecimento de 120°C a 210°C, a uma taxa de 10°C/min;
- Temperatura constante a 210°C por 5 minutos.

Foram injetados 1 µL da amostra em modo *split* 1:100. A vazão do gás de arraste (hélio) foi mantida constante a 1,2 mL/min.

3.8 – Construção da curva padrão de 6-PP

A construção da curva-padrão foi feita com soluções de 6-pentil- α -pirona (grau de pureza de 96% - Sigma-Aldrich) nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 mg/L. Um gráfico foi construído para correlacionar a concentração de 6-PP com a área do cromatograma.

A concentração do composto de interesse, em µg/g de resíduo, foi então determinada por:

$$[\text{composto de interesse}] = \frac{(\text{quantificação do composto pelo CG-EM}) * (\text{volume de amostra extraída})}{\text{grama de resíduo utilizado}}$$

Resultados e Discussão

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Construção da curva-padrão

Na figura 4.1 pode-se verificar a curva padrão obtida para a quantificação do 6-PP.

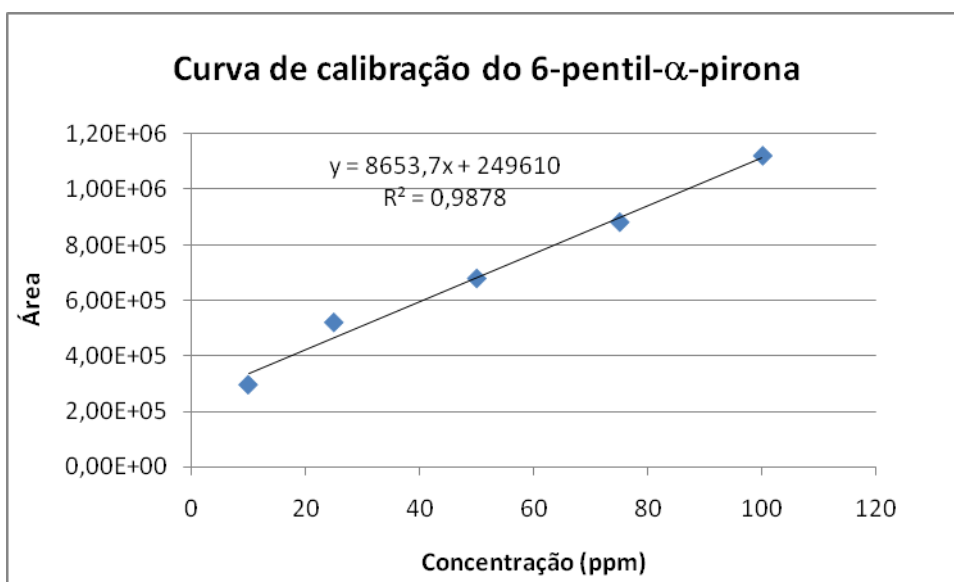


Figura 4.1 – Curva-padrão para quantificação de 6-PP

O alto valor de R^2 observado significa um bom ajuste da equação linear aos dados experimentais. Portanto, a curva-padrão gerada pôde ser utilizada para os cálculos de concentração de 6-PP, durante os experimentos de fermentação.

4.2 - Cinética de produção do 6-PP

O potencial do bagaço de cana-de-açúcar como um resíduo no processo de FES na produção de 6-PP, utilizando o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum*, tem sido demonstrado por Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), o qual obteve uma alta produção do composto aromatizante.

O perfil cinético de produção de 6-PP (Figura 4.2) permitiu determinar o tempo necessário para a máxima produção do composto aromatizante nas condições de FES estabelecidas.

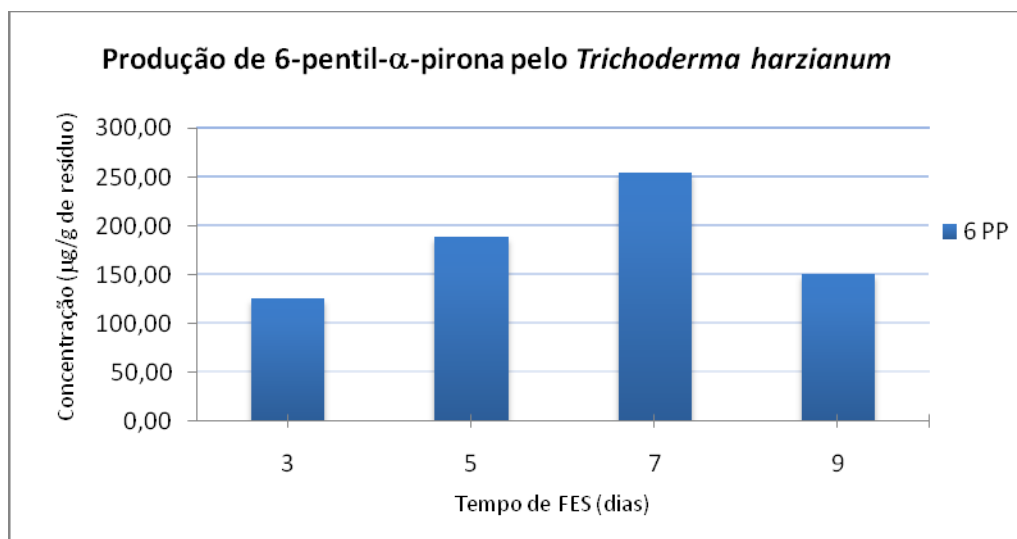


Figura 4.2 – Cinética de produção de 6-PP por fermentação em estado sólido (FES)

O gráfico da figura 4.2 mostra que a maior concentração do aroma (254 $\mu\text{g/g}$ de resíduo) foi atingida no sétimo dia de cultivo. Este resultado, diferente do encontrado por Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), que utilizaram o mesmo microrganismo empregando bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a FES e obtiveram 2800 $\mu\text{g/g}$ de resíduo após 10 dias de cultivo, pode ser explicado pela diferença na composição dos meios de cultivo, a linhagem da espécie de *Trichoderma harzianum*, a origem do resíduo e as condições de extração.

Estudos realizados por Martins (2003) e Ramos (2006) utilizando a mesma linhagem de *T. harzianum* (4040) também obtiveram a maior taxa de produção de 6-PP no sétimo dia de cultivo, porém utilizando como resíduo o pó da casca do coco verde.

Foi observado que em fermentações em estado líquido (submersas), a maior produção do aroma obtido, descrita na literatura, foi de 474 mg/L após 5 dias de (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2004).

O declínio da concentração após o sétimo dia de cultivo pode estar relacionado ao acúmulo de 6-PP e a sua possível degradação como mecanismo de defesa do microrganismo aos seus efeitos tóxicos de acordo com o que é relatado por Galindo e colaboradores, 2004.

4.3 – Medida do teor de umidade em FES

A partir dos resultados apresentados no gráfico 4.3, observou-se que a umidade foi decrescente com o tempo de processo e que no sétimo dia apresentou uma diminuição de aproximadamente 5%.

A queda na produção do aroma após o sétimo dia de cultivo talvez possa ser explicado devido a diminuição da umidade, além da possível toxicidade do 6-PP já explicado anteriormente.

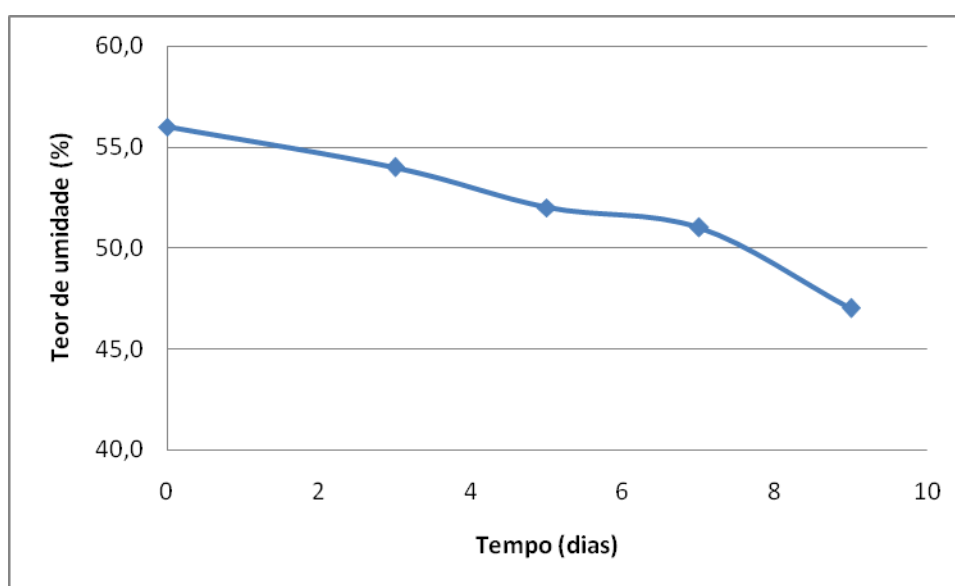


Figura 4.3 – Teor de umidade durante a cinética de FES

4.4 – Avaliação dos efeitos dos componentes da solução nutritiva

Para a avaliação dos efeitos dos componentes do meio de cultivo líquido foi empregado planejamento fatorial fracionado. Os efeitos de 9 variáveis foram estudadas em 16 experimentos acrescidos de 3 pontos centrais. A extração do aroma procedeu de acordo com a concentração máxima obtida (no 7º dia de cultivo) determinada conforme descrito no item 4.2.

Os domínios experimentais foram determinados de modo a incluir as concentrações dos componentes utilizados por Martins (2003) e Ramos (2006) na produção de 6-PP em cultivo sólido, porém utilizando como resíduo o bagaço da cana-de-açúcar. O nível mínimo foi determinado como de concentração 0 g/L no meio líquido, para avaliar se a substância poderia estar ausente na solução nutritiva.

Para redução de custo do processo, avaliou-se a variável sacarose (açúcar cristal) como uma possível substituta para a glicose. Os resultados encontrados por Sarhy-Bagnon *et al.* (2000) mostraram que em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar o microrganismo foi capaz de utilizar sacarose.

A Tabela 4.1 mostra os resultados encontrados em 16 experimentos, em que as maiores taxas de produção de 6-PP são encontradas nas combinações 15 e 16 do planejamento. Com base na Tabela 4.1 também podemos notar que nos experimentos onde o sulfato de magnésio está presente, a taxa de produção é sempre maior quando comparado aos experimentos onde está ausente.

Tabela 4.1 – Resultados do planejamento fatorial fracionado para a avaliação de produção de 6-PP

| N° Exp | Fatores (g/L) | | | | | | | | | Resposta ($\mu\text{g/g}$ de suporte) |
|--------|---------------|----------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|------|---------------------------------|--|
| | Glicose | Sacarose | MgSO ₄ | ZnSO ₄ | NH ₄ SO ₄ | FeSO ₄ | CaCl ₂ | KCl | KH ₂ PO ₄ | 6-PP |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 27,9 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0,001 | 0 | 0,01 | 0,008 | 0,5 | 0 | 35,4 |
| 3 | 0 | 0 | 1,5 | 0 | 0,94 | 0,01 | 0,008 | 0 | 0 | 40,9 |
| 4 | 0 | 0 | 1,5 | 0,001 | 0,94 | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 46,7 |
| 5 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0,94 | 0,01 | 0 | 0,5 | 0 | 134,5 |
| 6 | 0 | 30 | 0 | 0,001 | 0,94 | 0 | 0,008 | 0 | 1 | 152,4 |
| 7 | 0 | 30 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0,008 | 0,5 | 1 | 188,5 |
| 8 | 0 | 30 | 1,5 | 0,001 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 177,9 |
| 9 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0,94 | 0 | 0,008 | 0,5 | 0 | 212,3 |
| 10 | 30 | 0 | 0 | 0,001 | 0,94 | 0,01 | 0 | 0 | 1 | 223,4 |
| 11 | 30 | 0 | 1,5 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0,5 | 1 | 233,6 |
| 12 | 30 | 0 | 1,5 | 0,001 | 0 | 0 | 0,008 | 0 | 0 | 245,7 |
| 13 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,008 | 0 | 1 | 207,6 |
| 14 | 30 | 30 | 0 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 217,8 |
| 15 | 30 | 30 | 1,5 | 0 | 0,94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 289,6 |
| 16 | 30 | 30 | 1,5 | 0,001 | 0,94 | 0,01 | 0,008 | 0,5 | 1 | 323,5 |
| 17 (C) | 15 | 15 | 0,75 | 0,0005 | 0,47 | 0,005 | 0,004 | 0,25 | 0,5 | 189,7 |
| 18 (C) | 15 | 15 | 0,75 | 0,0005 | 0,47 | 0,005 | 0,004 | 0,25 | 0,5 | 199,7 |
| 19 (C) | 15 | 15 | 0,75 | 0,0005 | 0,47 | 0,005 | 0,004 | 0,25 | 0,5 | 207,3 |

O modelo estatístico incluiu parâmetros que tiveram valores de p inferiores a 0,05 de acordo com o diagrama de Pareto (figura 4.4) para a variável de resposta 6-PP.

Os compostos do meio líquido de cultivo quando estudos sozinhos é possível perceber que o sulfato de amônio, sulfato de zinco, cloreto de cálcio, fosfato de potássio, cloreto de potássio e sulfato ferroso não foram significativos nas concentrações estudadas ($p > 0,05$), sendo as variáveis significativas glicose, sacarose, sulfato de magnésio e a curvatura. Já considerando as interações podemos perceber que foram significativas as interações entre glicose x sacarose e glicose x sulfato de amônio.

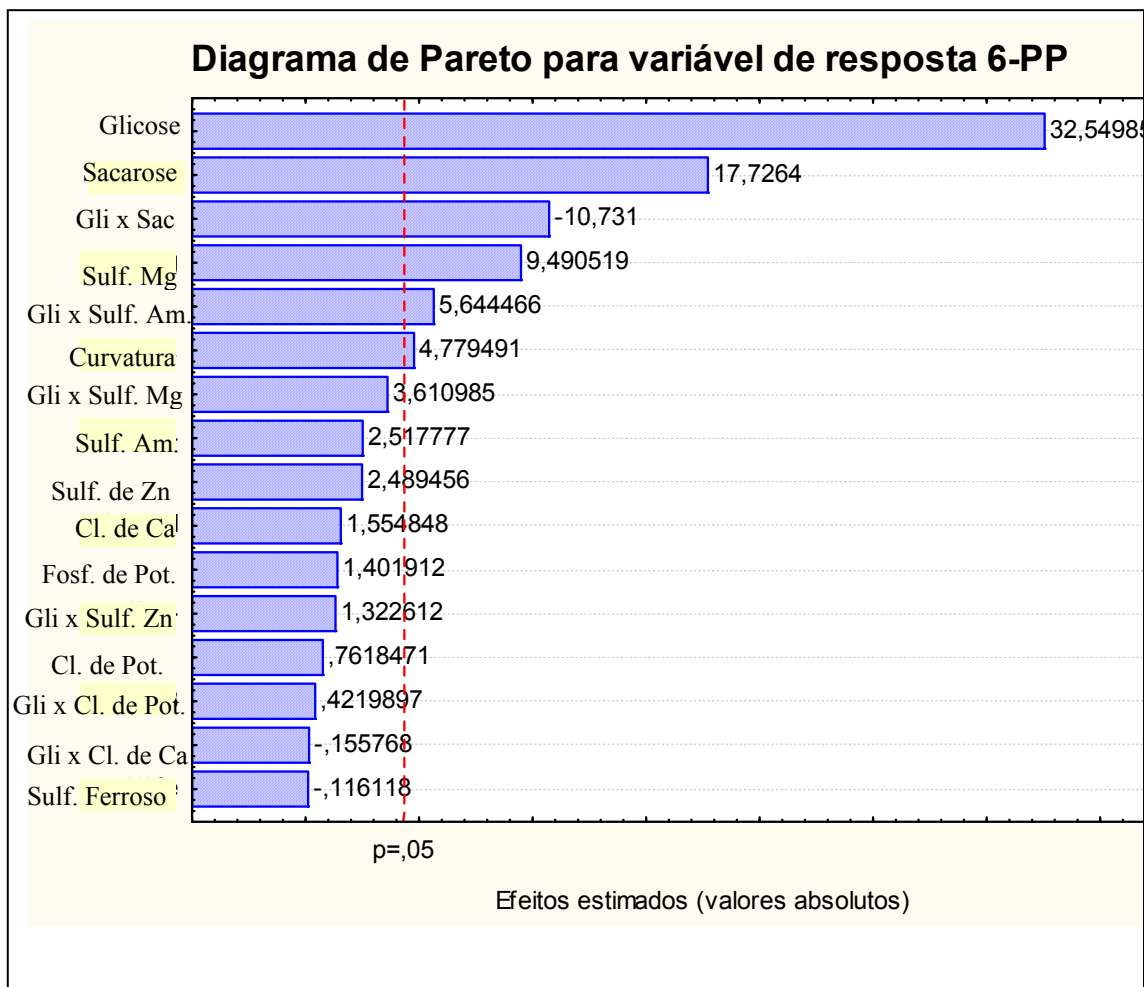


Figura 4.4 – Diagrama de Pareto para a variável de resposta 6-PP

O modelo experimental apresentou valor de R^2 de 0,9988 e R^2 ajustado de 0,98921, considerado adequado para representar os dados experimentais.

A equação a seguir foi obtida para representar o domínio estudado (variáveis normalizadas):

[6-PP] = ESCREVER A EQUAÇÃO QUE A ALINE JÁ DEIXOU pronta..

Os coeficientes de regressão, desvios-padrão e valores de p associados aos parâmetros da equação estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados da análise de regressão do planejamento fatorial fracionado (variáveis normalizadas)

| | Coefficiente | <i>p</i> |
|-------------------------------|--------------|----------|
| Intersecção | 176,5474 | 0,000001 |
| Glicose | 71,8313 | 0,000943 |
| Sacarose | 39,1188 | 0,003167 |
| Sulfato de Magnésio | 20,9437 | 0,010921 |
| Sulfato de Zinco | 5,4938 | 0,130506 |
| Sulfato de Amônio | 5,5563 | 0,128123 |
| Sulfato Ferroso | -0,2563 | 0,918168 |
| Cloreto de Cálcio | 3,4312 | 0,260229 |
| Cloreto de Potássio | 1,6812 | 0,525732 |
| Fosfato de Potássio | 3,0937 | 0,295989 |
| Glicose x Sacarose | -23,6813 | 0,008572 |
| Glicose x Sulfato de Amônio | 7,9687 | 0,068864 |
| Glicose x Sulfato de Magnésio | 2,9187 | 0,316943 |
| Glicose x Sulfato de Zinco | 12,4562 | 0,029983 |
| Glicose x Cloreto de Potássio | -0,3438 | 0,890518 |
| Glicose x Cloreto de Cálcio | 0,9313 | 0,714066 |

Com relação às fontes de carbono, o modelo sugere que a glicose é a fonte de carbono mais significativa para a produção de 6-PP. Uma possível explicação para isto está no fato de que a glicose é um monossacarídeo e está prontamente disponível, ao contrário da sacarose, que por ser um dissacarídeo composto por moléculas de glicose e frutose, requer um tempo inicial para a hidrólise do carboidrato.

Observou-se também que nos experimentos em que a glicose foi utilizada como única fonte de carbono (tabela 4.1, experimentos de 9 a 12) a concentração final de 6-PP foi maior do que quando a sacarose foi utilizada sozinha (tabela 4.1, experimentos de 5 a 8). E quando as duas fontes de carbono foram utilizadas em conjunto, as maiores concentrações foram obtidas (tabela 4.1, experimentos 15 e 16).

Os valores previstos *versus* os valores observados podem ser visualizados na figura 4.5, confirmando que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos situam-se próximos à linha reta.

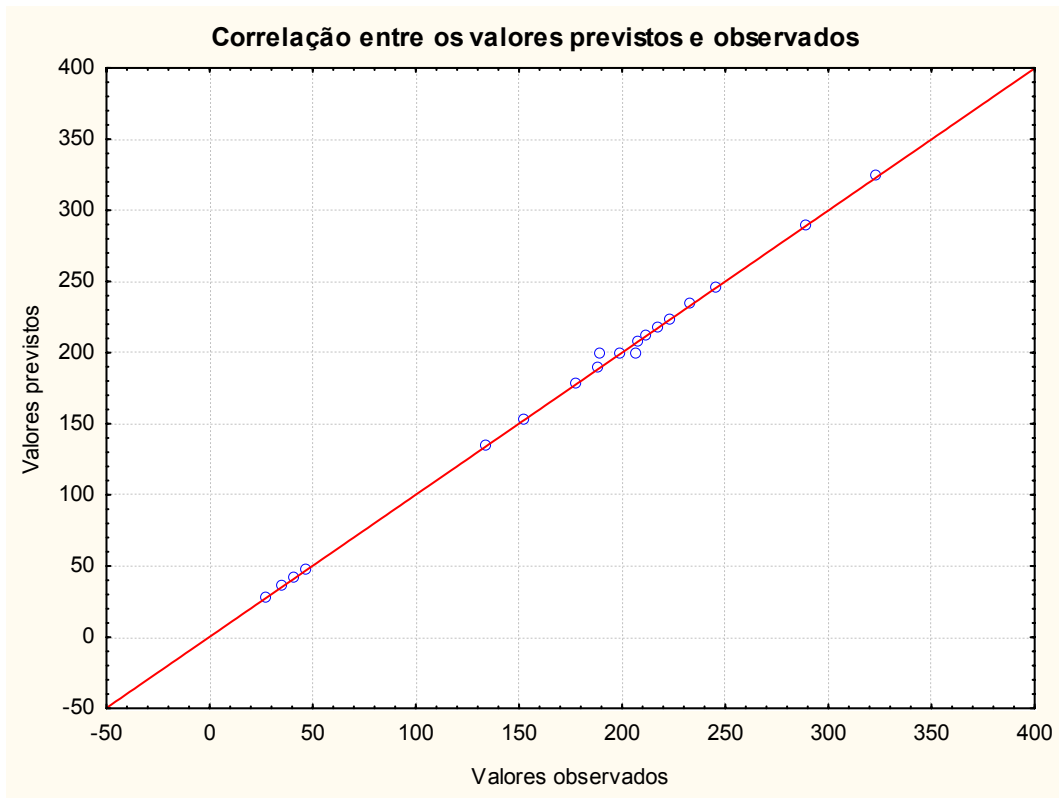


Figura 4.5 – Gráfico de correlação entre os valores previstos pelo modelo e observados experimentalmente.

Conclusões e Sugestões

5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – Conclusões

1. A linhagem *Trichoderma harzianum* 4040 mostrou habilidade em produzir o composto 6-PP no resíduo agroindustrial bagaço da cana-de-açúcar.
2. O bagaço da cana-de-açúcar se mostrou apropriado e eficiente para a produção do composto aromatizante, com taxas eficientes de produção.
3. A produção máxima de 6-PP foi obtida com 7 dias de cultivo nas condições experimentais utilizadas.
4. A substituição da sacarose pela glicose não apresentou grande eficiência visto que a produção de 6-PP foi maior quando utilizado a glicose.
5. É sugerida uma maior produção do composto aromatizante quando os componentes glicose e sacarose são utilizados em conjunto no meio de cultivo líquido nas suas concentrações máximas.

5.2 – Sugestões

1. Determinar a cinética de consumo de glicose e formação de biomassa.
2. Realizar correção da umidade e verificar se após o sétimo dia de cultivo a produção do composto aromatizante será maior ou manterá constante.
3. Avaliar a partir de um novo planejamento a eficiência das variáveis glicose e sacarose para otimizar a produção de 6-PP.
4. Desenvolver uma metodologia extrativa viável para recuperação do produto em larga escala.
5. Realizar etapa de purificação do composto aromatizante.

Referências Bibliográficas

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B.; **Solid state fermentations**. Advanced in Applied Microbiology, v.28, p.201-237, 1982.

BONNARME, P.; DJIAN, A.; LATRASSE, A.; FÉRON, G.; GINIÈS, C.; DURAND, A.; LE QUÉRÉ, J.-L. **Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma* sp. From vegetable oils**. Journal of Biotechnology, v. 56, p. 143-150, 1997.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.; PAGNONI, U.M.; DAVOLI, P. **Production of flavoured volatile organic compounds (VOCs) by *Candida oleophila* GK10 – Optimisation using factorial design and response surface analysis**. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 668-675, 2003.

CARLSON, R. **Designs for explorative experiments in organics synthetic chemistry**. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 73, p.151-166, 2004.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L.A.; SAMUELS, G.J.; GEISER, D.M.; **Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/ *Hypocrea lixii* complex**. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 27, p. 302-313, 2003.

CHIAPPINI, C.C.J. **Aromas naturais produzidos por microrganismos**. Revista Eletrônica de Jornalismo Científico, 2004

COLLINS, R.P.; HALIM, A.F. **Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 20, n. 2, p. 437-438, 1972.

COOK, R.J.; BAKER, K.P. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Societs, p.539, 1983.

DAMASO, M.C.T.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURIL, S. **Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, 2008.

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KUBICEK, C.P. **The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data.** Mycoscience, v. 47, p. 55-64, 2006.

DURAND, A. **Bioreactor designs for solid state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 113-125, 2003.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. **Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*.** Canadian Journal of Microbiologis, v.28, p.719-725, 1982.

GALINDO, E.; FLORES, C.; LARRALDE-CORONA, P.; CORKIDI-BLANCO, G.; ROCHA-VALADEZ, J.A.; SERRANO-CARREÓN, L. **Production of 6-pentyl- α pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks.** Biochemistry Engineering Journal, v. 18, p. 1-8, 2004.

GALVAN, D.; KRANZ, J. L.; STEFFEN, V.; HASAN, S. D. M. **Avaliação dos parâmetros operacionais da fermentação em estado sólido relativos à transferência de calor,** 2004.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. **The role of water in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 85-101, 2003.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M.; **Developments in fungal taxonomy.** Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUERVENOU, J.; GIAMARCHI, P.; COULOUARN, C.; GUERDA, M.; LE LEZ, C.; OBOYET, T. **Experimental design methodology and data analysis technique applied to optimise and organic synthesis.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 63, p.81-89, 2002.

HÖLKER, U.; LENZ, J. **Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages?** Current Opinion in Microbiology, v. 8, p. 301-306, 2005.

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

KALYANI, A.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. **Study on the production of 6-pentyl-apyrone using two methods of fermentation.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 610-612, 2000.

KRINGS, U.; BERGER, R.G.; **Biotechnological production of flavours and fragrances.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 49, p. 1-8, 1998.

LEE, W.C.C.; ZHANG, M. **Design of monolimb using finite element modelling and statisticsbased Taguchi method.** Clinical Biomechanics, v. 20, p. 759-766, 2005.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. **Experimental design and optimization.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 42, p. 3-40, 1998.

LUTZ, M.W.; MENIUS, J.A.; CHOI, T.D.; LASKODY, R.G.; DOMANICO, P.L.; GOETZ, A.S.; SAUSSY, D.L. **Experimental design for high-throughput screening.** Drug Discovery Today, v. 1, n. 7, 1996.

MACH, R.L.; ZEILINGER, S. **Regulation of gene expression, in industrial fungi: *Trichoderma*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 60, p. 515-522, 2003.

MARTINS, P.S.O. **Avaliação de técnicas para extração de aroma de coco produzido por *Trichoderma harrzianum*,** 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MUÑOZ, G.A.; AGOSIN, E.; COTORAS, M.; SAN MARTIN, R; VOLPE, D. **Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*.** FEMS Microbiology Letters, v. 125, p. 63-70, 1995.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 81-84, 2003.

PINTO, G.A.S; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e a valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5p. (Comunicado Técnico, 102).

PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G.; ENGEL, K.H.; TRESSL, R. **Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride***. Flavour and Fragrance Journal, v. 7, p. 231-234, 1992.

PRATES, H.S.; JUNIOR, J.L.; ROSSI, M.L. **Composição mineral de mudas cítricas com aplicações de *Trichoderma* spp.**, 2007.

RAGHAVARAO, K.S.M.S; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. **Some engineering aspects of solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation**. Eletronic Journal of Biotechnology, 1998. Disponível em <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/9/index.html>. Acesso em 04/08/2009.

RAMOS, A.S. **Avaliação da produção de aroma de coco por fermentação em estado sólido**, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. **Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes**. Journal of Chromatography B, v. 743, p. 403-408, 2000.

ROCHA-VALADEZ, J.A.; HASSAN, M.; CORKIDI, G.; FLORES, C.; GALINDO, E.;

SERRANO-CARREÓN, L. **6-Pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology.** *Biotechnology and bioengineering*, v. 91, n. 1, 2006.

SARHY-BAGNON, V.; LOZANO, P; SAUCEDO CASTAÑEDA, G.; ROUSSOS, S. **Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures.** *Process Biochemistry*, v. 36, p. 103-109, 2000.

SERRANO-CARREÓN, L.; FLORES, C.; RODRÍGUEZ, B.; GALINDO, E. ***Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system.** *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 1403-1406, 2004.

SHIKIDA, P.F.A; ALVEZ, L.R.A. **Panorama industrial, dinâmica de crescimento e estratégias tecnológicas da agroindústria canavieira paranaense.** *Nova Economia*, v.11, p. 123-124, 2001.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L.P.S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

STERNBERG, D.B. **Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role is sacharification of cellulose.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.31, p.648-654, 1976.

TEIXEIRA, D.E.; COSTA, A.F.; SANTANA, M.A.E. **Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores.** *Scientia Forestalis*, v. 52, p. 29-34, 1997.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. **Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, p. 509-515, 2006

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G; VERACHTERT, H. **Bioflavoring and beer refermentation.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 62, p. 140-150, 2003.

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

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R.A. **A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp.** Phytopathology, v.76, p.518-521, 1986.