



## A BIOTECNOLOGIA APLICADA AOS AROMAS

*A alimentação é o mais antigo e tradicional setor da biotecnologia. Avanços recentes nesta área proporcionaram novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de aromas.*

### **O AROMA NA ESCOLHA DOS ALIMENTOS**

Os aromas sempre fizeram parte da história da humanidade. Nos primórdios da civilização, tinham a função de verificar se um alimento não estava estragado ou diferenciar plantas nocivas das comestíveis. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico na área de alimentos, os aromas assumiram a função de melhorar a qualidade sensorial dos alimentos. Grande parte do sabor de um alimento é diretamente influenciado pelo seu aroma.

Estudos demonstram que as características sensoriais, em particular o aroma, têm efeito sobre a escolha do

consumidor. Historicamente, gregos e romanos perfumavam seus vinhos com rosas, violetas, ervas e condimentos exóticos, trazidos da China, Índia e Egito pelos mercadores venezianos. Na Europa, esses ingredientes foram misturados, também, aos alimentos para torná-los mais palatáveis. Durante o século XIX, avanços na química orgânica tornaram possível que importantes substâncias aromatizantes, como a vanilina e a cumarina, fossem sintetizadas e adicionadas aos produtos alimentícios.

Os aromas dão sabor e odor aos alimentos industrializados. Sem eles, enlatados, congelados, empacotados e desidratados não teriam nenhum

atrativo, já que os processos industriais e de armazenamento destroem grande parte do sabor original.

Além da inovação em equipamentos, a indústria alimentícia tem utilizado aditivos cada vez com maior frequência, com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor e modificar ou manter seu estado físico geral.

Os aditivos utilizados em alimentos dividem-se em diversas classes. Entre elas, os aromatizantes possuem especial importância por conferirem propriedades organolépticas que caracterizam cada sabor e aroma dos mais diversos produtos.

# Biotecnologia em Aroma

O cheiro de determinados alimentos pode ser o principal argumento para consumi-los, e as características de um alimento dependem mais do aroma do que apenas do gosto, sendo que ambos constituem o sabor ou *flavour*.

1.000 substâncias que, em conjunto, conferem um aroma característico. Um exemplo é o aroma natural de café. O café torrado apresenta um aroma tão complexo que já foram identificados mais de 1.000 componentes na sua constituição.

Dentre as funções químicas dos principais componentes aromáticos utilizados na elaboração de aromas sintéticos destacam-se entre as mais importantes os ésteres, os ácidos, os hidrocarbonetos, os alcoóis, os aldeídos, os acetais, os éteres, os compostos heterocíclicos, os fenóis, as cetonas, as lactonas, os compostos nitrogenados e os compostos sulfurados.

Aromas são substâncias responsáveis pelas propriedades organolépticas de um gênero alimentício. Não possuem nenhuma qualidade nutritiva, mas desenvolvem papel essencial na aceitação do produto. O gosto e o cheiro são, de fato, os fatores determinantes da aceitação desse pelos consumidores e estimulam o apetite. Além disso, agregam prazer e satisfação mental, independentemente de saciar ou não a fome.

Embora utilizem os mesmos receptores celulares, aromas e perfumes não são percebidos exatamente segundo o mesmo mecanismo. Um perfume é inspirado diretamente pelo nariz, o fluxo de ar carregado dos compostos voláteis passa pela mucosa olfativa antes de dirigir-se em direção aos pulmões. A interação dessas moléculas com seus receptores celulares específicos conduz ao estímulo do nervo olfativo e, conseqüentemente, à percepção do odor pelo indivíduo.

As moléculas que compõem o aroma representam um baixo percentual da massa total do alimento (0,05% a 1%). O resto desta massa (a matriz) aprisiona as moléculas aromatizantes que se liberam no palato, misturando-se com a saliva no ato da mastigação, e entram em contato com os receptores da língua (as papilas) que geram os gostos. Em seguida, os compostos voláteis são expulsos da matriz e dirigidos, por via retronasal, para a fossa olfativa, pela expiração do ar contido nos pulmões. A adição de sal (NaCl), ao aumentar a polaridade da matriz, favorece a saída dos compostos aromáticos, geralmente pouco polares. A reunião das percepções



Portanto, o sabor de um produto pode ser definido como o conjunto de sensações de natureza psicofisiológica decorrentes do contato com os receptores sensoriais do nariz e com as estruturas táteis e os receptores sensoriais da boca.

A fisiologia reconhece que os alimentos devem obrigatoriamente possuir sabor agradável para que sejam consumidos em quantidades adequadas por períodos prolongados de tempo. Os condimentos e os aromatizantes estão situados no mesmo nível de importância que os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas e minerais), devendo ser considerados como componentes essenciais da alimentação humana.

Nesta classe de aditivos é onde existe o maior número de substâncias, uma vez que os aromas são muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de

## A QUÍMICA DOS AROMAS

Em maior ou menor grau, representantes de praticamente todas as funções de química orgânica possuem propriedades organolépticas, sendo utilizados na elaboração de imitação de aromas. Ainda não se pode estabelecer uma relação precisa entre estrutura química e perfil de sabor, embora ocorram algumas semelhanças com determinados grupos e séries de compostos. De uma maneira geral, observa-se perda de poder aromatizante à medida que aumenta o peso molecular e se reduz a pressão de vapor. Conseqüentemente, moléculas de cadeia ramificada são geralmente mais úteis para o criador de aromas do que suas contrapartes de cadeia reta.

A fixação ou persistência do odor é relacionada com a baixa volatilidade do composto, porém, a recíproca não é verdadeira.

provocadas pelo gosto e pelo odor é chamada de *flavor*.

O aroma de um alimento provém de uma mistura complexa constituída por grande número de compostos (mais de 300 no caso do tomate, por exemplo). Esses compostos devem ser suficientemente voláteis para que sua composição atinja o limiar da percepção. Na prática, a massa molar destes compostos não excede 400 unidades de massa. Cada composto participa de forma diferente na percepção global do aroma, em função de sua nota e potência olfativa, definida pela sua contribuição no odor do alimento. Todos não apresentam o mesmo impacto no perfil organoléptico de um produto. Um único composto, ou um pequeno grupo de compostos é, as vezes, suficiente para reproduzir a nota típica de um alimento. Também ocorre frequentemente que a reunião de todos os compostos identificados não permite a constituição satisfatória do aroma.

As moléculas responsáveis pelo aroma são constituídas de um esqueleto hidrocarbonato que pode ser linear, cíclico ou aromático. A maior parte das funções químicas presentes nessas cadeias pode ser encontrada em sete grandes famílias: os alcoóis, os compostos carbonilados (principalmente os aldeídos), os ésteres, os éteres, os fenóis e, finalmente, os derivados sulfurados ou azotados.

As moléculas hidrocarbonadas não funcionalizadas são quase sempre derivados terpênicos, geralmente em C10 ou C15. Permitem muito raramente descrever um aroma sozinho e suas propriedades organolépticas somente se revelam em associação com outros compostos.

Das moléculas funcionais que representam tipicamente a nota do produto do qual são extraídas, pode-se citar, por exemplo, o cinamaldeído, o mentol ou o acetato de isoamila, que possuem, respectivamente, o odor de canela, de menta e de banana. Outras moléculas podem produzir uma nota geral que não é típica de um produto alimentício em

particular. Assim, o *cis*-3-hexenol possui o odor típico de grama recém cortada.

A estereoquímica de um composto também influi no seu *flavor*. Assim, a (R)-carvona é associada a menta-crespa (*Mentha crispa* L.), enquanto que a (S)-carvona é representativa da semente de alcaravia (*Carum carvi* L.).

Da mesma forma, a  $\gamma$ -heptalactona de configuração (R) possui uma nota herbácea doce e picante, enquanto que o enantiomero (S) apresenta um odor frutado, gorduroso, de coco, menos intensa do que a forma (R). As diferentes estruturas dos compostos aromatizantes e as sensações que provocam levaram naturalmente ao estudo das relações estrutura/odor ou estrutura/*flavor*. O desconhecimento das estruturas tridimensionais dos receptores celulares torna essa tarefa extremamente árdua.

## COMPOSTOS AROMÁTICOS

Fala-se de compostos aromáticos quando uma molécula atende a certos critérios. Cada um deles sendo necessário, porém não suficiente. De fato, para que um composto seja dito aromático, ele precisa ter  $4n + 2$  elétrons  $\pi$  ( $n = 0, 1, 2, \dots$ ); além do que todos os elétrons  $\pi$  devem ser do mesmo plano.

Se essas duas condições forem respeitadas, o composto é aromático. Se um composto possuir somente  $4n$  elétrons  $\pi$ , será chamado de anti-aromático. Assim, existem três tipos de compostos: os aromáticos, que possuem  $4n + 2$  elétrons  $\pi$ ; os anti-aromáticos, que possuem somente os

$4n$  elétrons  $\pi$ ; e os compostos não-aromáticos, que não são nem aromáticos nem anti-aromáticos.

A aromaticidade deve ser vista como uma energia de estabilização. Se um composto tem a possibilidade, por equilíbrio tautomérico, de tornar-se aromático, é esta forma que será privilegiada, pois é ela que confere maior estabilidade. Por exemplo, uma cetona existe sob duas formas, a forma cetona (mais abundante) e a forma enol (forma minoritária). Tem-se então um equilíbrio entre as duas formas, mesmo se esse equilíbrio for fortemente deslocado no sentido da forma cetona.

Os heterocíclicos voláteis constituem igualmente uma família importante de moléculas odorantes, particularmente interessante no campo da química dos aromas. Representam mais de um quarto dos 5.000 compostos voláteis isolados e caracterizados até hoje nos alimentos. Possuem geralmente limiares de percepção baixíssimos, da ordem do ppb ou menos, e oferecem uma ampla gama de notas olfativas e/ou gustativas.

As estruturas dos heterocíclicos intervindo no campo da química dos aromas são diversas e variadas. O exame das substâncias odorantes identificadas nos alimentos deixa transparecer uma maior importância de algumas famílias de heterocíclicos, dentre as quais encontram-se as furonas, as lactonas, as piridinas, as pirazinas, os pirróis, as piranonas, as oxazolas e os tiazoles.

As furanonas são heterocíclicos



# Biotecnologia em Aroma

cos muito presentes nos alimentos. Por exemplo, a sotolona 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona, composto quirais, cujos dois enantiômeros possuem odores comparáveis, porém patamares de percepção diferentes, é um aroma importante da cereja, do vinho e do café. Sua nota principal é um odor de “caramelo”, que

Possuem notas características de manteiga, de óleo de coco e de numerosas frutas (pêssego, damasco, etc.). As lactonas identificadas em frutas apresentam uma configuração majoritariamente (R). Assim, a (R)-g-decalactona predomina no pêssego, enquanto que a (S)-d-decalactona é presente no leite.

Alguns pirróis, piridinas e tiazolas

derivados de pirazina foram identificados em grande número de alimentos cozidos, como o pão, a carne, o café torreficado, o cacau ou as avelãs; são compostos aromatizantes extremamente potentes.

Devido a sua volatilidade, os heterocíclicos trazem uma forte contribuição à nota de cabeça dos alimentos onde estão presentes. São relativamente raros em frutas e legumes frescos e nunca foram encontrados em pêras ou em bananas. Em contrapartida, sua contribuição é predominante nos aromas dos compostos preparados por aquecimento, como o café, o cacau ou a carne.

As propriedades organolépticas do café somente se revelam após a torrefação. Enquanto que para as carnes, pode-se tirar o máximo de sabor graças às diversas técnicas culinárias de cozimento, como assar, grelhar, banho-maria, etc.; o churrasco é um deles!

Os precursores dos compostos heterocíclicos são os constituintes fundamentais dos alimentos: aminoácidos, peptídios, glicídios, lipídios e vitaminas. Dois grandes processos influem na origem de sua formação: as reações enzimáticas ou de fermentação; e as reações não enzimáticas, mais conhecidas como Maillard, e que surgem por ocasião dos diversos tratamentos térmicos pelos quais podem passar os alimentos, como cozimento, torrefação, conservação, etc. A essas reações pode-se também associar as reações de degradação térmica dos açúcares, dos aminoácidos e das vitaminas.

As reações enzimáticas ocorrem principalmente em frutas e legumes, laticínios e bebidas fermentadas. Essas reações microbiológicas implicam numerosas enzimas que pertencem, na maioria dos casos, às famílias das hidrolases, das oxidases e das isomerases. São usadas em vários setores da indústria agroalimentícia para a preparação de pratos prontos e de bebidas fermentadas.

O mecanismo de formação das lactonas pela ação dos microorganismos



desaparece quando o grupo hidroxilo é metilado.

Da mesma forma, as lactonas também apresentam grande interesse para a aromatização dos alimentos.

apresentam odor de grelhado extremamente pronunciado. Esta pode ser atribuída a função acetila, carregada por um dos átomos de carbono situado em a do átomo de azoto. Mais de 80

já foi amplamente estudado. Por exemplo, a g-nonalactona identificada na cerveja forma-se pela ação de levedura sob o ácido 4-oxo-nonanoico, ele mesmo proveniente da oxidação do ácido linoléico no processo de maltagem e da ebulição do malte. O 2-isobutil-tiazola, identificado no tomate é formado a partir de dois aminoácidos, a cisteína e a leucina. A decarboxilação enzimática da cisteína leva a cisteamina (2-aminotiol), a qual condensa-se com o isovaleraldeído proveniente da leucina via degradação de Strecker. Essa reação de condensação leva a 2-isobutiltiazolidina, para depois, pela ação da oxidase, transformar-se em 2-isobutiltiazola.

Com execução das furanas e lactonas, a maior parte dos heterocíclicos identificados nos aromas são formados mais pelas reações de Maillard do que por processos enzimáticos. Esses processos de escurecimento não enzimáticos fazem intervir açúcares redutores, geralmente glicose ou frutose, e aminoácidos ou dipeptídeos. Sob a ação do calor e do tempo esses últimos combinam-se para formar intermediários chamados Amadori ou Heyns. Mesmo não apresentando propriedades olfativas e gustativas particulares, esses dois últimos compostos possuem uma importância estratégica no campo dos aromas alimentícios, pois levam a um grande número de compostos aromáticos e não somente heterocíclicos.

A enolização desses compostos, seguida da perda de uma molécula de aminoácido, leva as redutonas e dehidroredutonas. Passam depois por uma reação de retroaldolização que leva a formação de aldeídos e de compostos  $\alpha$ -dicarbonilados.

Uma das etapas mais importantes das reações de Maillard é a etapa de degradação de Strecker. Trata-se da formação de aldeídos e de aminocetonas pela reação de um aminoácido com um composto  $\alpha$ -dicarbonilado. As múltiplas possibilidades de combinação do conjunto desses compostos explica a formação de um grande número de heterocíclicos no decorrer do cozimen-

to dos alimentos. No decorrer dessas reações, pode-se também observar a presença de pigmentos castanhos chamados melanoidinas. Essa massa escura obtida no final da reação representa, em peso, quase a totalidade dos produtos inicialmente introduzidos, enquanto que os compostos aromáticos voláteis constituem somente uma ínfima fração.

Dentre o grande número de compostos obtidos por degradação dos açúcares, os 3(2H)- e 2(5H)-furanos, tais como o furaneol e a sotolona, fazem parte dos compostos importantes no campo dos aromas. O estudo das “reações modelo” entre um só açúcar, tal como a ramnosa, por exemplo, e aminoácidos, nas condições da reação de Maillard (aquecimento em meio aquoso) permite colocar em evidência a formação do furaneol.

No caso da obtenção das oxazolas e de seus derivados reduzidos, esses compostos são obtidos pela reação dos  $\alpha$ -aminocetonas e dos aldeídos liberados por ocasião da reação de Strecker.

A descoberta de novas moléculas, presentes somente no estado de traços, e participando do *flavor* do alimento permite inovar no campo da química dos aromas. De fato, essas substâncias podem ser utilizadas pelos profissionais para atender à demanda de novidades pelos consumidores.

## AROMA E BIOTECNOLOGIA - BIOAROMAS

O mais antigo e comercialmente tradicional setor da biotecnologia é o da alimentação. A produção ou o refino de alimentos por este processo pode incluir ácido alcoólico, ácido acético, ácido propiônico e fermentações ácidas lácticas que, em substratos complexos, frequentemente, ocorrem de forma misturada.

Os microorganismos são frequentemente associados à falta de qualidade ou à deterioração de alimentos. Entretanto, avanços recentes na biotecnologia de plantas e fungos, na tecnologia enzimática, na engenharia genética, no monitoramento de biopro-

cessos e nas técnicas de recuperação de produtos proporcionaram novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de aromas.

O primeiro relato publicado sobre a capacidade de bactérias e fungos selecionados produzirem fragrância foi realizado em 1923. Nesse trabalho, as leveduras foram destacadas como um dos grupos mais importantes de microorganismos que produz, em cultura, um forte aroma etéreo, de variada intensidade, que lembra o odor de frutas, como morango, abacaxi, maçã, pêra e melão. Os gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* e outros isolados de uva, de grãos úmidos de cevada, de suco de abacaxi, de folhas de ruibarbo, de queijo e de kumis foram citados como produtores de um agradável e complexo aroma de frutas. Uma série de experimentos foi realizada com microorganismos isolados do leite, do pão e de algumas frutas, onde variou a composição do meio de cultura e obteve-se, em diferentes substratos, o aroma de morango, aroma de fruta impuro e aroma de queijo.

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.

As pesquisas foram inicialmente direcionadas à otimização 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 a espectrometria de massas, o número de compostos identificados aumentou significativamente e uma compilação recente apontou mais de 10.000 compostos.

Tecnologias complementares contribuíram para a caracterização estrutural dos compostos aromatizan-

tes, como os ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi*, o aroma de coco detectado em cultivos de *Trichoderma viride*, *Myocacia uda*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trichoderma harzianum* e de espécies do gênero *Neurospora*, o agradável aroma de maçã percebido no cultivo da levedura *Dipodascus aggregatus*, os vinte compostos voláteis, predominantemente ésteres e terpenos, que foram identificados no meio de cultura de *Trichothecium roseum*, os monoterpênicos citronelol, linalol e geraniol que foram produzidos no cultivo de *Kluyveromyces lactis*, o aroma de ananás intenso e agradável que foi produzido pela levedura *Dipodascus magnusii*, os monoterpênicos com qualidade sensorial de leve aroma frutal produzido por duas linhagens de *Ambrosiozyma monospora*, e as notas frutais e florais produzidas por *Hansenula anomala*.

O desenvolvimento de métodos biotecnológicos para a obtenção de aromas específicos pode se tornar bastante árduo, pois a maior parte dos aromas naturais é o resultado da mistura de compostos que podem chegar a centenas. Produzidas em baixa concentração, essas misturas podem conter terpenos, aldeídos, ésteres, lactonas, alcoóis superiores e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo de fungos filamentosos e leveduras. O desafio de produzir compostos químicos do aroma por meio de biossíntese, entretanto, vem sendo vencido com entusiasmo pelas empresas produtoras, que 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.

A biotecnologia criou os bioaromas, termo utilizado para designar aromas de origem enzimática ou por fermentação.

Além de serem menos agressivos ao meio ambiente, os processos biotecnológicos produzem aromas considerados naturais. O interesse dos cientistas atualmente é determinar a contribuição de cada componente no aroma global de um produto ou matriz alimentícia. A importância sensorial de cada componente, expressa como unidade de odor ou valor do aroma, geralmente depende de sua concentração ativa e do “limiar” do composto, determinado experimental e preferencialmente na própria matriz alimentícia.

Os bioaromas são comparados a substâncias químicas de aromas gerados biologicamente, derivados de fermentação microbiana, pela ação enzimática ou processamento de enzimas, e através do metabolismo de plantas.

O elemento chave incluiu um selecionado biocatalisador capaz de executar, em uma única etapa, a transformação de um substrato, ou a sua conversão em múltiplas etapas, que tem início com o metabólito intermediário, ou uma síntese dos nutrientes básicos de uma fermentação, em um controlado e aperfeiçoado processo técnico.

Os microrganismos alimentícios clássicos ou geneticamente modificados e misturas de modelos que imitam alimentos foram os pontos de partida para o desenvolvimento de novos processos. Porém, a maioria dos aromas usados em alimentos processados industrialmente depende do potencial biossintético das células das plantas.

## BIOCATALISADORES DE CÉLULAS VEGETAIS

Após o sucesso do primeiro cultivo submerso de células vegetais nos anos de 1950, surgiram revisões na sua exploração comercial. O uso biotecnológico de células vegetais rompe o arranjo celular altamente estruturado de uma planta inteira, transferindo as células para um ambiente estéril de divisão ilimitado. Esse processo envolve o tratamento do tecido da planta com fitoatuadores e a conversão da crescente calosidade em uma suspensão

finamente espalhada para subcultivo em biorreatores.

A substância química uniforme em ambientes físicos, a ausência da comunicação intercelular, e os estímulos de crescimento sintéticos, induzem a uma troca do metabolismo da célula para rotas primárias. Como resultado, *in vitro*, é comum que as células produtoras de aromas não contenham qualquer aroma volátil. Todavia, duas pesquisas citaram mais de 170 referências, que descrevem a formação de voláteis, o que indica, claramente, que as células *in vitro* retêm a informação genética exigida para a produção de aromas, sendo capazes de produzir aromas voláteis em condições satisfatórias. As etapas para a formação de aromas só podem ser expressas a baixos níveis, em períodos limitados, ou em razões quantitativas que diferem da planta inteira. Apesar destas desvantagens, a imensa diversidade de produtos originários de plantas secundárias, inigualável a qualquer outro biosistema, continuou mantendo vivo o interesse científico.

## SUBSTRATOS EXÓGENOS E A VITALIDADE DAS CÉLULAS

Os solventes orgânicos são uma das alternativas para aumentar o rendimento de produtos, prevenindo a inibição ou a degradação do substrato em sistemas bifásicos. Segundo estudos, os precursores de aromas lipofílicos também podem requerer o uso de solventes orgânicos. Um reator de transporte aéreo modificado, com agitação através de um fluxo imiscível de água solvente ao invés de ar, foi utilizado para aplicações em escala-piloto. Contudo, poucas pesquisas sistemáticas foram publicadas sobre os efeitos fisiológicos dos solventes em células vegetais *in vitro*.

Durante estudos para transformação de  $\beta$ -caroteno exógeno em células vegetais suspensas, vários solventes provaram ser úteis, sendo sua biocompatibilidade examinada. Todos os solventes escolhidos afetaram a vitalidade das células de limões, na

fase estacionária, após uma exposição de cinco horas; metanol, dimetilformamida, dioxano e etanol, foram os mais compatíveis. Em concentrações mais altas (> 2% v/v), o metanol apresentou efeitos menos tóxicos do que o etanol, mas estabilizou a vitalidade da célula. O tetrahydrofurano representou o grupo de solventes mais tóxicos. O comportamento inesperado das células tratadas com metanol e a perda da correlação entre estes resultados, além da constante dielétrica dos solventes, necessitam de um estudo mais aprofundado.

A bioconversão do exógeno geraniol em álcool monoterpeneo, característica presente em muitas culturas de células em suspensão, foi selecionado como uma característica metabólica para estudar a sensibilidade das enzimas das plantas envolvidas. Utilizando as mesmas espécies e condições de cultivo nos testes microscópicos de vitalidade, os efeitos adversos do etanol foram confirmados, enquanto, em contraste, o metanol foi observado como não sendo superior a dimetilformamida ou ao dioxano. Utilizando as mesmas condições de cultivo, mas em células suspensas de maçãs, um quadro diferente foi obtido: o etanol foi superior ao metanol em concentrações inferiores, e o dimetilformamida e o dioxano exibiram efeitos inibitórios em concentrações crescentes. O estudo concluiu que somente em muito baixas concentrações de dimetilformamida e dioxano e, para menores extensões, o etanol foi tolerado sem reduzir significativamente as atividades celulares.

Células suspensas de limão foram tratadas com várias concentrações de 1% v/v dioxano para eliminar a toxicidade do geraniol aplicado. Além das concentrações usadas nas experiências anteriores (8,7  $\mu$ M), o limiar crítico, determinado como a vitalidade das células na fase estacionária, estava na gama de 2-3 mM de geraniol. Foram encontrados valores limite semelhantes em suspensões de *Pelargonium fragrans* providos com limoneno ou terpenóides.

Por outro lado, as concentrações milimolares de componentes de óleo essencial foram prejudiciais, inclusive, após um curto prazo de exposição; o acúmulo de quantidades significantes de nutrientes no crescimento das culturas, como era esperado, deve ser claramente excluído.

O metabólito de plantas de interesse comercial é, frequentemente, armazenado intracelularmente. Para superar esse problema, particularmente em células imobilizadas, foi introduzido dimetilsulfóxido (DMSO) como agente permeabilizante; células de *Catharanthus roseus*, permaneceram viáveis nas condições de crescimento aplicadas. Porém, pesquisas sobre *Cinchona ledgeriana* em suspensão apresentaram resultados opostos. Concentrações de DMSO cor-relataram com o aumento da liberação do produto e com danos as células; muitas das membranas permeabilizadas não recuperaram sua integridade. A atividade extracelular de peroxidase (POD), e a alta atividade em muitas suspensões de células, foi medida por um marcador metabólico. Após quatro horas de incubação na presença de 0,1% v/v de DMSO, o total de atividade peroxidase foi notavelmente reduzido; em concentrações maiores de solvente, foram observadas atividades inferiores e redução da vitalidade das células. As sensibilidades relativas da fase tronco e fase estacionária das células foram bastante semelhantes. Outras técnicas de ceifa, como eletroporação ou ultrassonificação foram menos destrutivas.

## MELHORA NUTRICIONAL

Enquanto técnicas aprimoradas de acumulação ainda estão sendo desenvolvidas, a chave para o sucesso comercial continua sendo o desafio científico. A estratégia convencional tem sido variar e modificar o ambiente químico da célula. Embora demorado e um pouco fortuito, estes esforços obtiveram alguns resultados positivos como, por exemplo, substratos menos dispendiosos, como soro penetrante ou

xarope de milho, e com um meio mais adequadamente divisor; os agentes gelificantes para culturas de calosidades, condicionando fatores e elicitores.

Os elicitores bióticos e abióticos induzem reações de defesa da planta e podem ser agrupados entre os fatores externos de stress. O stress no cultivo de células das plantas, por definição, restringe o crescimento, mas pode induzir as enzimas para caminhos secundários. Por exemplo, em células imobilizadas de pimenta, o aumento do acúmulo de capsaicina a baixas concentrações de oxigênio foi observado pelo fenômeno de stress.

Células suspensas de pêra, cultivadas em um reator de transporte aéreo, foram usadas livremente para demonstrar o stress imposto por concentrações elevadas de oxigênio. As células da fase tronco deixaram de crescer quando a concentração limite foi excedida. Entre o quarto e sexto dias, a hidrólise da sacarose permaneceu, mas o crescimento sofreu inibição. Após esta longa fase de adaptação, chamada de “última fase secundária”, o crescimento e o consumo de glicose tiveram início novamente. O uso de gás capilar cromatográfico com solvente revelou a presença de alguns odores no ar. A concentração de oxigênio dissolvida não é um fator crucial para apoiar a respiração do transporte aéreo no cultivo de células, contudo um perfil de oxigênio cuidadosamente controlado pode ajudar a estabelecer condições de aumento da produção de voláteis.

Embora a sacarose tenha hidrolisado completamente após três dias, a atividade de  $\beta$ -frutosidase permaneceu alta até o sétimo dia. Em paralelo, culturas de células suspensas de limão cresceram muito lentamente. Baseado em um modelo de célula recentemente desenvolvido, a baixa atividade inicial de  $\beta$ -frutosidase foi sugerida como a causa. As atividades medidas foram, porém, duas vezes mais altas, em média, comparadas com pêra e hortelã, sendo mantidas além do décimo dia sem razão fisiológica aparente.

Foram monitoradas as concentra-

ções de componentes iônico na mesma suspensão de pêra. Com exceção da Pi, as concentrações de todos os íons quantificados permaneceram praticamente inalteradas durante o ciclo de crescimento completo. Menos de 20% da concentração férrea inicial e menos que 10% do cálcio e magnésio sofreram aumento. Valores de nitrato

e de amônia apresentaram aumentos fracos durante a fase tronco, e a concentração de nitrato caiu somente na fase estacionária, resultando em um fraco aumento de amônia. O crescimento, às vezes, mais lento das células em biorreator e os efeitos da pré-cultura podem responder por um consumo reduzido de nutrientes. O

efeito adverso de uma alta concentração de substratos na formação de metabólito secundário foi substancial, persistindo a linha de célula de tabaco em baixos níveis de Pi interno. Pode ser preditos efeitos semelhantes em formação secundária de outros componentes iônicos reguladores de nutrientes, como o cálcio.

## BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LOS AROMAS

Los aromas siempre han sido parte de la historia humana. En los primeros días de la civilización, tenía la función para comprobar si un alimento era rancio o plantas dañinas de diferencian comestible. Hoy en día, con el desarrollo tecnológico en el ámbito de la alimentación, aromas asumieron la función de mejorar la calidad sensorial de los alimentos. Gran parte del sabor de un alimento está directamente influenciado por su aroma.

El sector de la biotecnología comercial más antigua y tradicional es la comida. La producción y el refinado de los alimentos por este proceso pueden incluir alcohol, ácido acético, ácido propiónico y fermentaciones de ácido láctico en sustratos complejos ocurren a menudo en forma mixta.

Los microorganismos se asocian a menudo con la falta de calidad o deterioro de los alimentos. Sin embargo, los recientes avances en la biotecnología de plantas y hongos en la tecnología de enzimas, la ingeniería genética, el seguimiento de bioprocesos y los avances de recuperación de productos técnicos proporcionados nuevas oportunidades potenciales de la biotecnología en la producción de aromas.

La relación entre la fisiología microbiana y la producción de metabolitos con olor, sin embargo, sólo llegó a ser identificado en los estudios realizados en los años 50. A partir de entonces, un número significativo de estudios sobre compuestos de sabor producidas por bacterias, hongos filamentosos y levadura comenzó a publicarse.

La investigación se dirigió inicialmente a la optimización de la biosíntesis y la identificación de compuestos de aromas específicos. Una primera lista de compuestos volátiles en los alimentos consistía en unos pocos cientos de constituyentes.

Con el advenimiento de instrumentos analíticos modernos, particularmente la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el número de compuestos identificados se incrementó significativamente y una compilación reciente señaló más de 10.000 compuestos.

Las tecnologías complementarias contribuyeron a la caracterización estructural de compuestos aromatizantes, tales como los ésteres producidos por *Pseudomonas fragi*, el aroma de coco detectado en cultivos de *Trichoderma viride*, *Myocacia uda*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trichoderma harzianum* y especies de *Neurospora*, el aroma agradable de la manzana realizado en el cultivo de *Dipodascus aggregatus* levadura, veinte compuestos volátiles, predominantemente ésteres y terpenos, se han identificado en el medio de cultivo *Trichothecium roseum*, los monoterpenos citronelol, linalol y geraniol que se produjeron en el cultivo de *Kluyveromyces lactis*, el aroma intenso y agradable de la piña que ha sido producido por la levadura *Dipodascus*

*magnusii*, monoterpenos con la calidad sensorial del aroma de frutas luz producida por dos cepas de *Ambrosiozyma monospora*, y no-

tas frutales y florales producidos por *Hansenula anomala*.

El desarrollo de métodos biotecnológicos para obtener sabores específicos puede llegar a ser bastante difícil, porque la mayoría de los sabores naturales son el resultado de una mezcla de compuestos que pueden alcanzar cientos.

La biotecnología ha creado bioaromas, término utilizado para describir los aromas de origen enzimático o por fermentación. Además de ser menos nocivo para el medio ambiente, los procesos biotecnológicos producen aromas considerados naturales. El interés de los científicos es determinar actualmente la contribución de cada componente en el aroma global de un producto o matriz alimentaria. La importancia sensorial de cada componente expresado como una unidad de olor o aroma, valor generalmente depende de su concentración activa y el "umbral" del compuesto, determinado experimentalmente y preferiblemente en la matriz del alimento en sí.

