

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE β -CAROTENO PARA PRODUÇÃO
DE COMPOSTOS DE AROMAS NOROISOPRENÓIDES**

Tese de Doutorado

Mariana Uenojo

Engenheira de Alimentos

MSc. Ciência de Alimentos

Prof^a Dr^a Glaucia Maria Pastore

Orientadora

Campinas

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Ue5b Uenojo, Mariana
Biotransformação de β -caroteno para produção de compostos de aromas noroisoprenóides / Mariana Uenojo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biotransformação. 2. Carotenóides. 3. β -caroteno. 4. Aroma. 5. Cromatografia de gás. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Biotransformation of β -carotene for the production of noroisoprenoid-aroma compounds

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biotransformation, Carotenoids, β -carotene, Aroma, Gas chromatography

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Margarida Masami Yamaguchi

Luciana Francisco Fleuri

Mário Roberto Maróstica Junior

Gabriela Alves Macedo

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BIOTRANSFORMAÇÃO DE β -CAROTENO PARA PRODUÇÃO
DE COMPOSTOS DE AROMAS NOROISOPRENÓIDES

Tese de Doutorado

Mariana Uenojo

Engenheira de Alimentos

MSc. Ciência de Alimentos

Prof^a Dr^a Glaucia Maria Pastore

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
para a obtenção do Título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Campinas, de de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Glaucia Maria Pastore
Orientadora

Profª Drª Margarida Masami Yamaguchi

Profª Drª Luciana Francisco Fleuri

Prof Dr Mario Roberto Marostica Jr.

Profª Drª Gabriela Alves Macedo

Profª Drª Luciana Ferracini dos Santos

Prof Dr Marcelo Alexandre Prado

Prof Dr Yong Kun Park

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

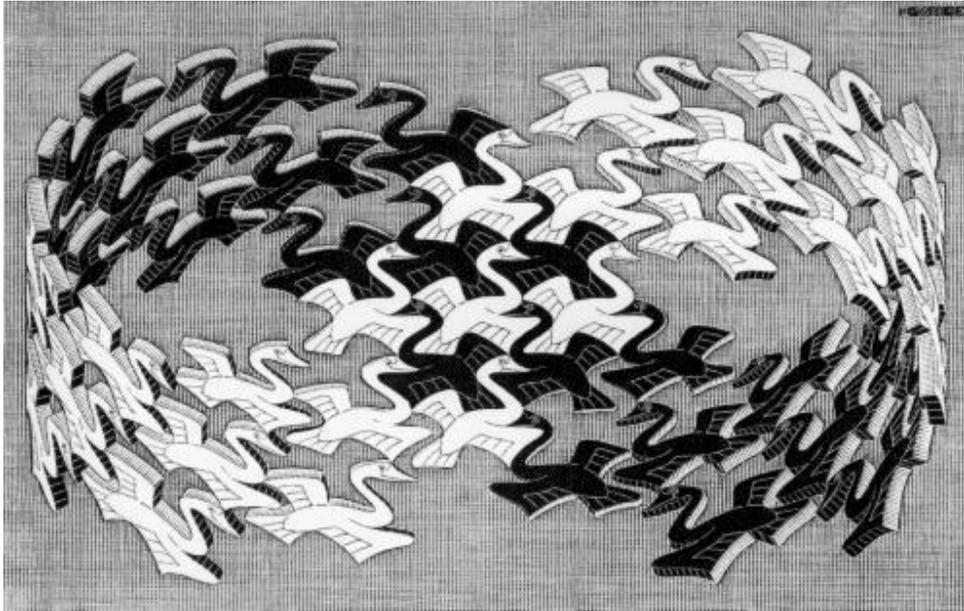
Fernando Pessoa

Aos meus pais

À minha irmã

Aos meus melhores amigos do homem

DEDICO



“Cisnes”, M. C. Escher, 1956

“E de um mar a outro mar, e ao longo de tantos rios diversos, através de tão longos tempos, esta pequena coisa que somos, – a criatura humana, – a caminhar, a trabalhar, a sofrer, a pensar, a resignar-se, a construir, a morrer, a sobreviver...

E, entre idiomas que se vão diversificando, a presença constante dos mesmos sonhos, do mesmo esforço, de uma ansiedade comum de realizar suas inquietações tão grandes, nesse pequeno prazo que vai do nascimento à morte de um homem, ou do começo ao fim de um ciclo histórico. E tudo isso entrelaçado, nas dimensões do espaço, do tempo e do pensamento, por estas terras que vamos vendo e as outras, que não vimos, e as que não veremos, afogadas em pó.”

Cecília Meireles, extraído de “Entre o chão e o céu”, 1953

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais.

À minha irmã.

À professora Glaucia pela orientação.

À Angélica, Haroldo e AnaP pela amizade.

Às Dani's (Gaúcha, Bio, Pole), Cd e Dora pela atenção.

Aos amigos da turma 96.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“E que lições recolherá, do mundo vegetal, para os desvairados alunos humanos? Aceitação: consente em estar cativo na terra. Sonho: há luz, sol, estrelas, – porém muito longe. Bondade: teu doce mel é para as abelhas (que ferem). Disciplina: quando a Primavera ordena, vem-se, – não importa para quê. Humildade: que nome temos? Ignoramos. Renúncia: quando o vento quiser, leva-nos. Constância: em qualquer solidão, o mesmo perfume. Coragem: as primaveras se sucedem, embora com outras flores. Esperança: a eternidade não está na corola, mas na semente.”

Cecília Meireles, extraído de “Índia florida”, 1954

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Carotenóides.....	1
1.2 Produção de compostos de aromas.....	4
1.3 Breve histórico dos compostos noroisoprenóides.....	8
1.4 Compostos de aromas derivados de carotenóides.....	9
1.4.1 Iononas e compostos homólogos.....	13
1.4.2 Damasconas.....	15
1.4.3 Outros compostos noroisoprenóides.....	19
1.5 Produção de compostos noroisoprenóides.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Oxidação.....	24
2.2 Degradação térmica.....	25
2.3 Hidrólise ácida.....	26
2.4 Hidrólise enzimática.....	27
2.5 Co-oxidação enzimática.....	29
2.6 Biotransformação.....	32
2.7 Tecidos vegetais.....	37
2.8 Ocorrência de compostos de aromas noroisoprenóides.....	40
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Geral.....	45
3.2 Específicos.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Seleção de microrganismos biotransformadores de carotenóides.....	46
4.2 Seleção de linhagens produtoras de aromas a partir de β -caroteno.....	46
4.3 Produção de compostos de aromas derivados de carotenóides.....	48
4.4 Extração dos compostos de aromas das amostras de biotransformação.....	49
4.5 Análise cromatográfica dos compostos de aromas formados.....	49

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1	Seleção de microrganismos biotransformadores de carotenóides.....	51
5.2	Seleção de microrganismos produtores de aromas a partir de β -caroteno	52
5.3	Produção de compostos de aromas.....	57
6	CONCLUSÕES.....	94
7	REFERÊNCIAS bibliográficas	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alguns exemplos de carotenos e xantofilas	2
Figura 2. Diferentes classes e exemplos de compostos de aromas noro-isoprenóides de 9, 10, 11 e 13 carbonos obtidos da degradação de β -caroteno ..	11
Figura 3. Iononas e homólogos	15
Figura 4. Damasconas e damascenonas	17
Figura 5. Caminho proposto para formação de β -damascenona a partir da degradação de neoxantina	18
Figura 6. Compostos de aromas provenientes da degradação de carotenóides ..	20
Figura 7. Mecanismo proposto para formação de safranal a partir de zeaxantina	21
Figura 8. Exemplos de halo de degradação para duas linhagens testadas.	51
Figura 9. Fotomicrografia das linhagens selecionadas.	56
Figura 10. Compostos formados pela linhagem CS1, sem pré-inóculo.....	59
Figura 11. Compostos formados pela linhagem CS1, com pré-inóculo.....	59
Figura 12. Compostos formados pela linhagem CS3, sem pré-inóculo.....	61
Figura 13. Compostos formados pela linhagem CS3, com pré-inóculo.....	61
Figura 14. Compostos formados pela linhagem CS6, sem pré-inóculo.....	63
Figura 15. Compostos formados pela linhagem CS6, com pré-inóculo.....	63
Figura 16. Compostos formados pela linhagem CS11, sem pré-inóculo.....	65
Figura 17. Compostos formados pela linhagem CS11, com pré-inóculo.....	65
Figura 18. Compostos formados pela linhagem CS12, sem pré-inóculo.....	67
Figura 19. Compostos formados pela linhagem CS12, com pré-inóculo.....	67
Figura 20. Compostos formados pela linhagem CS13, sem pré-inóculo.....	69
Figura 21. Compostos formados pela linhagem CS13, com pré-inóculo.....	69
Figura 22. Compostos formados pela linhagem CS14, sem pré-inóculo.....	71
Figura 23. Compostos formados pela linhagem CS14, com pré-inóculo.....	71
Figura 24. Compostos formados pela linhagem CS17, sem pré-inóculo.....	73
Figura 25. Compostos formados pela linhagem CS17, com pré-inóculo.....	73
Figura 26. Compostos formados pela linhagem CS19, sem pré-inóculo.....	75
Figura 27. Compostos formados pela linhagem CS19, com pré-inóculo.....	75
Figura 28. Compostos formados pela linhagem CS20, sem pré-inóculo.....	77
Figura 29. Compostos formados pela linhagem CS20, com pré-inóculo.....	77
Figura 30. Compostos formados pela linhagem CF5, sem pré-inóculo.....	79
Figura 31. Compostos formados pela linhagem CF5, com pré-inóculo.....	79
Figura 32. Compostos formados pela linhagem CF9, sem pré-inóculo.....	81
Figura 33. Compostos formados pela linhagem CF9, com pré-inóculo.....	81
Figura 34. Compostos formados pela linhagem CF10, sem pré-inóculo.....	83
Figura 35. Compostos formados pela linhagem CF10, com pré-inóculo.....	83

Figura 36. Compostos formados pela linhagem CF19, sem pré-inóculo.....	85
Figura 37. Compostos formados pela linhagem CF19, com pré-inóculo.....	85
Figura 38. Compostos formados pela linhagem CF20, sem pré-inóculo.....	87
Figura 39. Compostos formados pela linhagem CF20, com pré-inóculo.....	87
Figura 40. TDN e TTN.....	92
Figura 41. Rotas possíveis para a formação de apocarotenóides e TTN a partir de β -caroteno	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Escala de intensidade de aroma	47
Tabela 2. Descritores e intensidades de aromas das linhagens selecionadas.....	52
Tabela 3. Índice de Kovats calculados	57
Tabela 4. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS1	58
Tabela 5. Compostos formados pela linhagem CS1	58
Tabela 6. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS3	60
Tabela 7. Compostos formados pela linhagem CS3	60
Tabela 8. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS6	62
Tabela 9. Compostos formados pela linhagem CS6	62
Tabela 10. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS11	64
Tabela 11. Compostos formados pela linhagem CS11	64
Tabela 12. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS12	66
Tabela 13. Compostos formados pela linhagem CS12	66
Tabela 14. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS13	68
Tabela 15. Compostos formados pela linhagem CS13	68
Tabela 16. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS14	70
Tabela 17. Compostos formados pela linhagem CS14	70
Tabela 18. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS17	72
Tabela 19. Compostos formados pela linhagem CS17	72
Tabela 20. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS19	74
Tabela 21. Compostos formados pela linhagem CS19	74
Tabela 22. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS20	76
Tabela 23. Compostos formados pela linhagem CS20	76
Tabela 24. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF5.....	78
Tabela 25. Compostos formados pela linhagem CF5.....	78
Tabela 26. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF9.....	80
Tabela 27. Compostos formados pela linhagem CF9.....	80
Tabela 28. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF10..	82
Tabela 29. Compostos formados pela linhagem CF10.....	82
Tabela 30. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF19..	84
Tabela 31. Compostos formados pela linhagem CF19.....	84
Tabela 32. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF20..	86
Tabela 33. Compostos formados pela linhagem CF20.....	86

RESUMO

Carotenóides são importantes constituintes dos alimentos, conferem coloração característica, e seus produtos de degradação podem levar à formação de compostos de aromas importantes nos alimentos. Compostos de aromas derivados de carotenóides, pertencentes à classe dos norisoprenóides, estão amplamente distribuídos na natureza. Devido ao seu alto potencial aromático, são de grande interesse para as indústrias de aromas e fragrâncias. No entanto, a ocorrência de compostos norisoprenóides nas fontes naturais está restrita a quantidades traços, dificultando a extração, elevando os custos para sua obtenção. Um processo alternativo para se obter compostos de aromas de 13 carbonos derivados de β -caroteno é sua biotransformação utilizando-se microrganismos. Exemplos desses compostos são β -ionona e β -damascenona, responsáveis pelas fragrâncias de algumas flores e constituintes dos aromas de chá, rosas, tabaco e de frutas como uvas, marmelo, carambola e tomate. Neste trabalho, 343 microrganismos previamente isolados foram selecionados pelo método da placa de acordo com sua capacidade de degradar carotenóides presentes no meio sólido; 84 cepas foram selecionadas de acordo com sua capacidade de produção de aromas, e destas, 15 linhagens apresentaram descritores e intensidades de aromas de interesse, segundo um painel não treinado de provadores, sendo selecionadas e submetidas à fermentação submersa para produção de compostos aromas derivados de β -caroteno presente no meio de cultura. Os compostos β -ionona, β -damascona e pseudoionona foram

detectados e quantificados. A β -ionona foi o principal produto obtido da degradação de β -caroteno, encontrado em maiores concentrações nas linhagens CS1 e CS13 em 120 h de fermentação em meio de cultura sem pré-inóculo. A linhagem CF9 apresentou a maior concentração do composto em 24 h de fermentação em meio de cultura com pré-inóculo. Compostos como 1,1,6-trimetil-1,2,3,4-tetraidronaftaleno (TTN) e apocarotenóides (aldeídos ou cetonas), formados aparentemente da clivagem da parte central do carotenóide, também foram detectados.

ABSTRACT

Carotenoids are important constituents of foods. Due to their color and the fact that their degradation leads to the production of aroma compounds, they play a role in the sensorial properties of foods products. Natural volatile compounds derived from carotenoids are widely distributed. Due to their often low flavor thresholds, many of them are highly potent aroma compounds of great interest for the flavor and fragrance industries. The occurrence of norisoprenoids in natural sources is restricted to trace amounts and extraction has turned out to be costly. Thus, biotechnological processes have been used. Several compounds with aroma properties have been isolated as result of microbial transformations. Examples are the flowery smelling C13-compounds β -ionone and β -damascenone responsible for the fragrance of some flowers, constituting an essential part of tea, roses, tobacco aromas and fruit as grapes, quince, star fruit and tomato. In this work, 343 microorganisms previously isolated with potential to biotransformation β -carotene presented in the culture medium were selected by plate method; 84 microorganisms presented capacity to produce aroma compounds and 15 strains were selected according to a non-trained panel listing to produce β -carotene derived aroma compounds. β -Ionone, β -damascone, and pseudoionone were detected. The β -ionone was the major compound; it was produced by strains CS1 and CS13 in the highest concentrations at 120 hour-fermentation when cultured in medium without pre-inoculation and the strain CF9 was the main producer of β -ionone in the medium with pre-inoculation at 24 hour-fermentation. Other

compounds as 1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen (TTN) and irregular terpenoids apparently derived from the central part of the carotenoid chain, were detected.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CAROTENÓIDES

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas (Astorg, 1997; Su et al., 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002; Fraser & Bramley, 2004), com uma produção estimada em 100 milhões de toneladas por ano (Zorn et al., 2003c; Fraser & Bramley, 2004), identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (Su et al., 2002; Maldonado-Robledo et al., 2003; Fraser & Bramley, 2004; Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2007). Somente microrganismos e plantas podem sintetizar carotenóides *de novo*. Nos animais, estes compostos são originários daquelas duas fontes e podem ser modificados durante o metabolismo e se acumular nos tecidos (Delgado-Vargas et al., 2000).

São responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho de frutas, vegetais, fungos e flores (Maldonado-Robledo et al., 2003; Ibdah et al., 2006), atraindo animais que facilitam a polinização e a dispersão de sementes (Ronen et al., 1999; Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2007). São utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões no ano de 2005 (Fraser & Bramley, 2004) e que irá superar a barreira de US\$ 1 bilhão em 2009 (Confectionery News, 2005; Rajan, 2005).

Carotenóides são compostos tetraterpenóides de 40 carbonos formados por 8 unidades isoprenóides (Rodrigues-Amaya, 1999; Ronen et al., 1999; Rodríguez-

Bustamante & Sánchez, 2007), unidos por unidades opostas no centro da molécula. Reações de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos carotenóides (Weeks, 1986; Rodrigues-Amaya, 1999; Delgado-Vargas et al., 2000). Podem ser classificados em *carotenos*, compostos contendo somente carbono e hidrogênio, ou *xantofilas*, carotenóides oxidados ou oxicarotenóides, que apresentam grupos com substituintes com oxigênio como os grupos hidróxi, ceto e epóxi (Britton, 1992; Astorg, 1997; Rodrigues-Amaya, 1999; Delgado-Vargas et al., 2000; Olivier & Palou, 2000). A figura 1 mostra alguns exemplos de carotenos e de xantofilas encontrados na natureza.

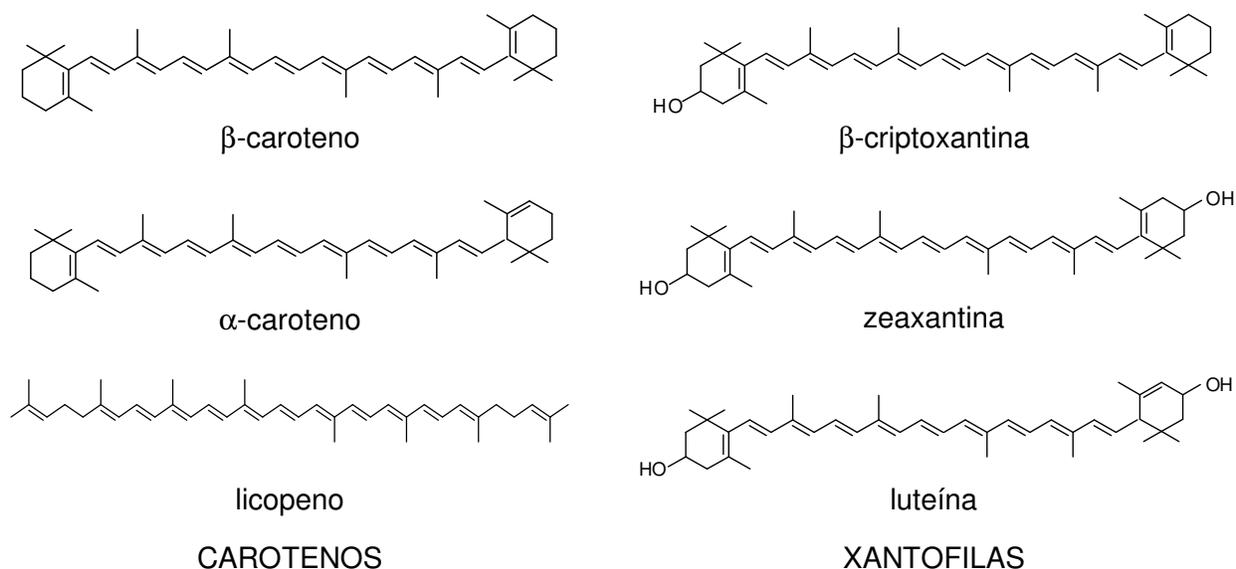


Figura 1. Alguns exemplos de carotenos e xantofilas (Rodrigues-Amaya, 1999).

Também podem ser classificados como *primários* ou *secundários*. Carotenóides primários são necessários na fotossíntese dos vegetais (β -caroteno, violaxantina, neoxantina) e os carotenóides secundários estão presentes em frutas e flores (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsantina) (Delgado-Vargas et al., 2000).

Carotenóides são lipofílicos, solúveis em lipídeos ou em solventes orgânicos não polares. A coloração é devida ao sistema de duplas ligações conjugadas, principalmente na configuração *trans*, sua forma natural. Possuem baixa energia no estado excitado e, portanto, a energia de transição está localizada na região do visível (400 a 500 nm). A cadeia carbônica é altamente reativa e susceptível ao ataque de reagentes eletrofílicos responsáveis pela instabilidade dos carotenóides à oxidação (Rodrigues-Amaya, 1999; Delgado-Vargas et al., 2000).

A principal característica dos carotenóides está na sua cadeia poliênica contendo de 3 a 15 duplas ligações conjugadas, responsável pelas características do espectro de absorção, cor e propriedades fotoquímicas das moléculas (Ronen et al., 1999). Sua estrutura confere propriedades especiais importantes nas funções e ações de todos os organismos vivos na natureza. São compostos essenciais na fotossíntese e para a vida na atmosfera com oxigênio (Delgado-Vargas et al., 2000; Olivier & Palou, 2000; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007). Devido à sua importância em ações biológicas, estão associados às propriedades antioxidantes e contra radicais livres, atividade pró-vitáminica A

(principalmente β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina), proteção e prevenção contra doenças cardíacas, degeneração macular e catarata, alguns tipos de cânceres (pulmão, mama, próstata e colo retal) (Astorg, 1997; Edge et al., 1997; Holden et al., 1999; Olson, 1999; Ronen et al., 1999; Olivier & Palou, 2000; Su et al., 2002; Fraser & Bramley, 2004; Hornero-Méndez & Mínguez-Mosquera, 2007) e no tratamento de doenças de fotossensibilidade como protoporfiria eritropoiética (eritrema induzido por luz), agindo como “protetores solares orais” (Olivier & Palou, 2000; Fraser & Bramley, 2004).

1.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMAS

O aroma é conhecido como um fator importante na determinação da qualidade do gosto e do sabor de um alimento (Uenojo, 2003). Sua percepção é um processo dinâmico de uma série de eventos combinados de odor e sabor, aparência, textura e temperatura (Goff & Klee, 2006; Ibdah et al., 2006; Solís-Solís et al., 2007), e leva o consumidor à aceitação ou à rejeição de um produto. Muitos aromas naturais são resultados de misturas de compostos químicos, biologicamente ativos, encontrados em baixas concentrações. As substâncias encontradas nestas misturas incluem terpenos, aldeídos, ésteres, lactonas, alcoóis superiores e outras moléculas complexas resultantes do metabolismo de plantas, ou podem ser obtidos de certas fontes animais. Fungos e leveduras possuem potencial para metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias (Welsh, 1994; Marques, 1998; Uenojo, 2003; Tieman et al., 2006; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007). Nos vegetais, os compostos voláteis gerados são

lipofílicos de baixo peso molecular, obtidos a partir do metabolismo primário e secundário das plantas, durante florescência e amadurecimento ou maturação (Goff & Klee, 2006).

Aproximadamente 5000 compostos voláteis têm sido identificados em alimentos atualmente disponíveis e quase não há dúvidas de que existam outros que serão identificados futuramente (Katz, 1986). As misturas complexas responsáveis pelo aroma de um produto podem ter mais de 1000 compostos para um único alimento e podem ser originadas por uma variedade de processos que incluem ação enzimática, auto-oxidação, processamento do alimento, interações químicas e ação microbiana (Katz, 1986; Stofberg, 1986).

Certos compostos de aromas também podem ser sintetizados quimicamente, mas as substâncias produzidas podem não ser consideradas naturais e não possuem o mesmo valor econômico dos compostos obtidos de fontes naturais. A complexidade estrutural de certos materiais dificulta a síntese química. Como resultado, a maioria dos aromas e fragrâncias é produzida pelo processo tradicional de extração de fontes vegetais e animais (Welsh, 1994). No entanto, o uso desses materiais depende da disponibilidade de matéria-prima, do custo de extração e da variabilidade de quantidade e qualidade no produto final de acordo com a região geográfica (Welsh, 1994).

A atual demanda do mercado consumidor por produtos 'naturais' e 'saudáveis' possibilita a síntese biotecnológica de compostos de aromas (Lugay, 1986; Stofberg, 1986; Welsh, 1994; Demyttenaere & Kimpe, 2001), por meio de processos utilizando-se células vegetais e culturas de tecidos, biocatálise,

biotransformação e síntese *de novo* utilizando-se microrganismos (Lugay, 1986; Stofberg, 1986; Daigle et al., 1999; Marasco & Schmidt-Dannert, 2003; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007) e os compostos obtidos podem ser rotulados como naturais (Araujo et al., 2002).

As legislações norte-americana e européia referem-se aos compostos de aromas naturais como os obtidos por processos físicos (extração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados da natureza, e o composto obtido deve ser idêntico ao já existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como 'natural' (Serra et al., 2005). Nos Estados Unidos, o Código Federal de Regulação define como aromas naturais os óleos essenciais, essência ou extrato; hidrolisado de proteína; destilados; produtos assados, de aquecimento ou de ação de enzimas; que contenham agentes aromatizantes derivados de sucos de frutas, leveduras comestíveis, ervas, cascas, flores, raízes, folhas ou materiais similares de plantas; carne, frutos do mar, frango, ovos, derivados de leite ou outros produtos fermentados, que possuam função de agentes aromatizantes em alimentos (Katz, 1986; Stofberg, 1986; Manley, 1994; Welsh, 1994; Reineccius, 1999; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, define como aromas naturais as substâncias obtidas exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais; os produtos de origem animal ou vegetal aceitáveis para o consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, em estado natural

ou após tratamento adequado como torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático ou outros. Compreendem os óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas e substâncias aromatizantes naturais isoladas (ANVISA, 2007).

Vários compostos de aromas foram identificados a partir da introdução e melhoramento de diversas técnicas instrumentais em química orgânica, como cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Janssens et al., 1992).

Uma estratégia eficiente para a detecção de compostos de aromas seria classificá-los segundo sua acessibilidade analítica nas seguintes categorias (López et al., 2002):

Categoria 1: compostos facilmente acessíveis do ponto de vista analítico, presentes em altas concentrações (acima de 1 mg L^{-1}), determinados após simples isolamento e análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Compreendem compostos como acetaldeído, alcoóis superiores e alguns acetatos, ácidos graxos e etil ésteres.

Categoria 2: compostos de acessibilidade analítica intermediária, presentes em concentrações entre $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, detectados após isolamento e pré-concentração e análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Neste grupo estão presentes os fenóis voláteis, algumas lactonas, derivados de vanilina, alguns ésteres minoritários e alguns isoprenóides como β -damascenona e β -ionona.

Categoria 3: compostos de acessibilidade analítica difícil, requerem o desenvolvimento de métodos específicos de isolamento, detecção ou uso de derivação química, apresentam mau comportamento cromatográfico e baixa estabilidade química. Compreendem compostos voláteis sulfurosos, aldeídos, alquil metoxipirazinas, furaneol, sotolon e alguns tióis aromáticos.

1.3 BREVE HISTÓRICO DOS COMPOSTOS NOROISOPRENÓIDES

A β -ionona foi sintetizada pela primeira vez em 1893 por Tiemann e Krüger numa tentativa de esclarecer a estrutura de um composto de aroma de impacto de óleo de orris obtido de *Iris palida*, as chamadas ironas. Em 1929 a β -ionona foi isolada de uma fonte natural, *Boronia megastigma* (Weeks, 1986; Winterhalter & Rouseff, 2002; Cooper et al., 2003). Em 1934, a picrocrocina, um β -D-glicosídeo de hidróxi-safranal, foi identificada como precursora de safranal em estigmas de açafão (*Crocus sativus*) por Kuhn e Winterstein (Weeks, 1986; Winterhalter & Rouseff, 2002).

Com o advento da cromatografia gasosa e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o número de compostos noroisoprenóides derivados de carotenóides identificados aumentou drasticamente durante as décadas de 1960 a 1980. Um fato marcante foi a identificação de rosa-cetonas, como a β -damascenona e β -damascona em óleo de *Rosa damascena* por Demole e colaboradores em 1967 e a publicação dos resultados somente após 20 anos, em 1987. Devido à diversidade do perfil de odores e extrema potencialidade, rosa-

cetonas têm se tornado uma das mais importantes descobertas no ramo de aromas e fragrâncias (Kotseridis, et al., 1998; Winterhalter & Rouseff, 2002).

Independentemente dos óleos essenciais, compostos de aromas derivados de carotenóides foram identificados em diversas fontes como tabaco, chá, frutas e vinho, estimulando as pesquisas destes importantes precursores de aromas (Winterhalter & Rouseff, 2002).

1.4 COMPOSTOS DE AROMAS DERIVADOS DE CAROTENÓIDES

Um número considerável de substâncias derivadas de carotenóides tem sido identificadas na natureza, muitas delas como compostos de aromas e fragrâncias (Schrader & Berger, 2001; Winterhalter & Rouseff, 2002; Zorn et al., 2003d; Dembitsky, 2005; Ferreira & de Pinho, 2004), de grande importância nas propriedades sensoriais dos produtos alimentícios (Enzell, 1985; Waché et al., 2003).

Compostos voláteis terpenóides, derivados de carotenóides, são componentes de aromas de muitas frutas, vegetais e flores (Simkin et al., 2004; Ferreira & de Pinho, 2004; Ibdah et al., 2006), de alto potencial aromático e de grande interesse para a indústria de aromas e fragrâncias, pois sua ocorrência nas fontes naturais está restrita a quantidades traços, o que torna custosa sua extração (Enzell, 1985; Waché et al., 2002a; Zorn et al., 2003d). Clivagem oxidativa de precursores tetraterpenóides, como os carotenóides, geram compostos sensorialmente ativos de 9, 10, 11 e 13 carbonos (Sánchez-Contreras et al., 2000; Winterhalter & Rouseff, 2002; Zorn et al., 2003d). Exemplos de aromas florais norisoprenóides de 13 carbonos são β -ionona e β -damascenona,

que possuem valores de *threshold* de 0,007 e 0,002 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água, respectivamente (Friedrich & Acree, 2002; Skouroumounis & Sefton, 2002; Suzuki et al., 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002; Zorn et al., 2003d; Goff & Klee, 2006). Nas plantas, β -ionona, α -ionona, diidroactinidiolida, damascenol e β -ciclocitral têm função antifúngica, de afastar herbívoros e até mesmo de atrair agentes polinizadores (Weeks, 1986; Schwartz et al., 2001; Ibdah et al., 2006).

Estruturalmente, iononas e damasconas possuem o esqueleto carbônico das megastigmanas. As diferenças devem-se à posição da função contendo oxigênio, localizado no carbono 9 na família das iononas e no carbono 7 na família das damasconas (Sefton et al., 1989; Winterhalter & Rouseff, 2002). Compostos norisoprenóides deficientes da função contendo oxigênio são chamados de megastigmanas. Além de iononas, damasconas e megastigmanas, outros compostos de diversidade estrutural têm sido descritos, incluindo espiroéteres, acetais e benzofuranos como, por exemplo, vitispirano e oxoedulano, presentes em vinho branco e tabaco, respectivamente (Winterhalter & Rouseff, 2002). A figura 2 apresenta as diferentes classes de compostos de aromas obtidos a partir da degradação de carotenóides.

O tabaco (*Nicotina tabacum*) é uma das maiores fontes de degradação de carotenóides, com mais de 100 compostos identificados (Wahlberg, 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002), incluindo metil cetonas de 13 carbonos, dióis, damasconas, biciclodamasconas, megastigmanas oxigenadas, hidroperóxidos e outros compostos norisoprenóides de 9, 10 e 11 carbonos (Enzell, 1985).

Iononas isoméricas e damasconas, como teaspirano e seus derivados oxigenados, têm sido identificados entre os compostos voláteis presentes em *Camellia sinensis*. Em chá, um composto típico é o C₁₃-espiroéter teaspirona que apresenta as notas chá, floral e doce (Kawakami & Kobayashi, 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002).

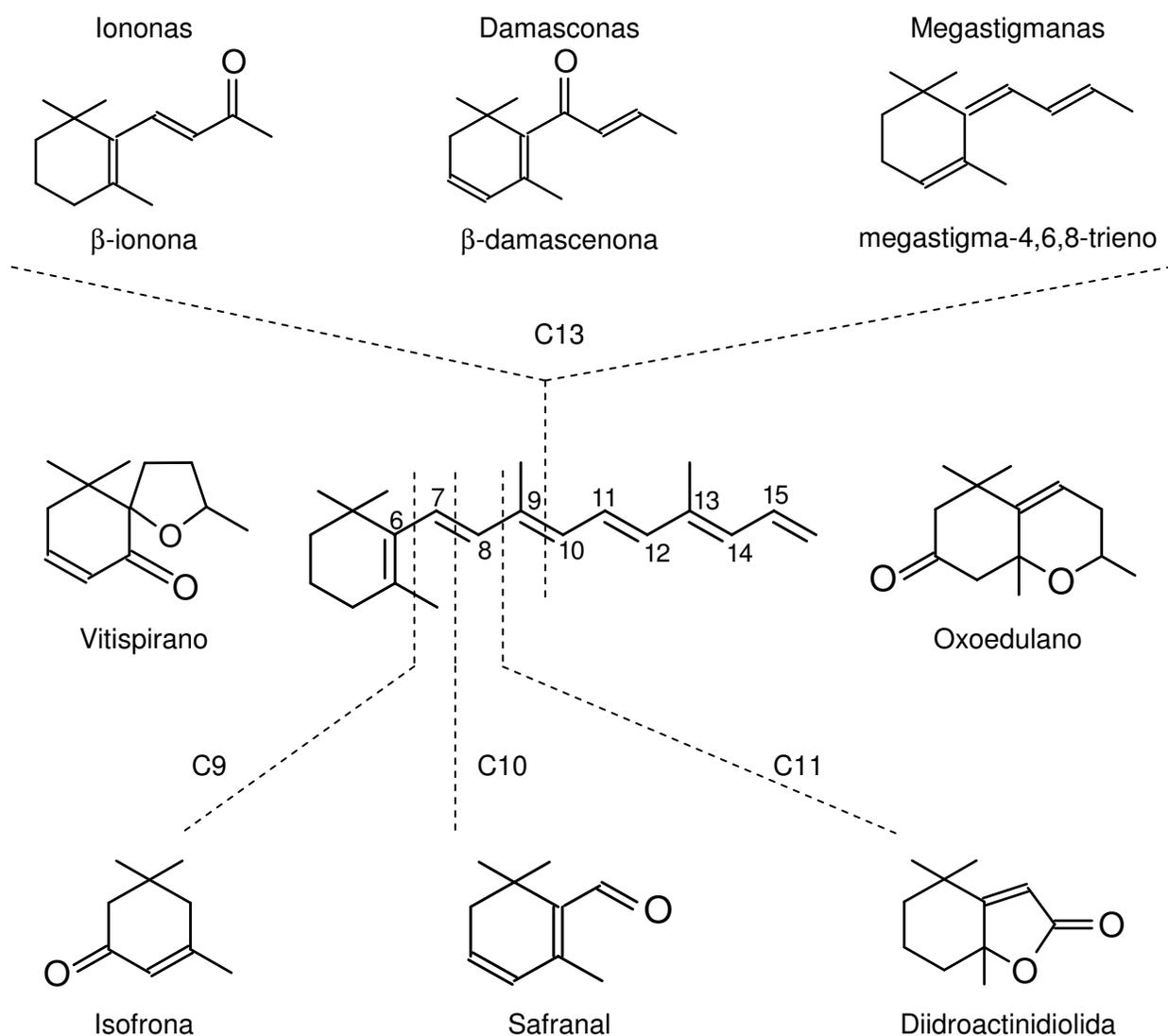


Figura 2. Diferentes classes e exemplos de compostos de aromas noroisoprenóides de 9, 10, 11 e 13 carbonos obtidos da degradação de β-caroteno (Winterhalter & Rouseff, 2002; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007).

Entre os constituintes voláteis de marmelo (*Cydonia oblonga* Mill.) encontra-se uma série de estruturas isoprenóides de 10 carbonos denominadas de lactonas e óxidos de marmelo, e quantidades traço de éteres de 12 carbonos estruturalmente relacionados, chamados de oxepino e oxepano de marmelo. Em carambola (*Averrhoa carambola*), compostos norisoprenóides de 13 carbonos, como β -damascenona, têm sido identificados. Em nectarina (*Prunus persica* Batsch var. *nucipersica* Scheneid), β -ionona e β -damascenona são os maiores contribuintes de aroma (Winterhalter & Rouseff, 2002).

Compostos de aromas derivados de carotenóides foram reconhecidos como importantes contribuintes do aroma de vinhos tintos e brancos e em sucos de uvas. Em sucos de uvas Chardonnay, 70% da concentração total de metabólitos voláteis compreendem compostos norisoprenóides de 13 carbonos, observados principalmente nas frações ácida e hidrolisada por glicosidases. A hidrólise ácida do suco de uvas Chardonnay exhibe descritores como chá, lima e mel que o vinho preparado do suco também apresenta (Gerdes et al., 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002).

Na alga *Porphyra tenera* (*Asakusa-nori*), uma das mais populares algas comestíveis do Japão, foram encontradas uma série de metabólitos de carotenóides de 9, 10, 11 e 13 carbonos. Dentre os compostos com 10 carbonos encontrou-se α - e β -ciclocitral e safranal e dentre os compostos com 13 carbonos, β -ionona (Winterhalter & Rouseff, 2002).

1.4.1 IONONAS E COMPOSTOS HOMÓLOGOS

As cetonas de 13 carbonos α - e β -iononas são terpenóides cíclicos provenientes da degradação de carotenóides, presentes em pequenas quantidades em muitos óleos essenciais (Bossler & Belin, 1994; Bauer et al., 2001), de aroma muito similar a violetas (Weeks, 1986; Bauer et al., 2001). Um terceiro isômero, γ -ionona, ainda não foi observado na natureza. Geralmente possuem a configuração *trans*, que pode ser convertida no isômero *cis* por exposição à luz ultravioleta (Bauer et al., 2001).

β -Ionona é um composto encontrado em óleos vegetais, exibe um intenso aroma doce floral e notas frutais como em óleo de violeta (*Viola odorata*), boronia (*Boronia megastigma*) e petúnia (*Petunia hybrida*) (Petrzilka & Ehret, 1994; Kotseridis et al., 1999; Gomes-Carneiro et al., 2006), largamente utilizado nas indústrias de perfumes e cosméticos. A baixa concentração nos tecidos vegetais aumenta o custo de extração e promove o desenvolvimento de processos biotecnológicos para sua produção (Maldonado-Robledo et al., 2003; Zorn et al., 2003d; Waché et al., 2006).

As *ironas* são compostos homólogos das iononas que possuem um grupo metil éster adicional adjacente aos outros dois grupos metil no anel ciclohexano. O número de possíveis isômeros de ironas é maior que o de iononas, devido às várias possibilidades dos grupos metil ésteres adicionais no anel. Algumas ironas ocorrem em óleos essenciais de espécies de raízes de *Orris* (Bauer et al., 2001).

Hidróxi-iononas são derivados de iononas, constituintes dos perfumes de flores e atuam como agentes atrativos de insetos, melhorando a polinização (Urlacher et al., 2006).

Outros homólogos das iononas são as *metiliononas*, das quais o grupo oxoalcenil possui um grupo metil extra. Também existem nas formas α -, β - e γ -, cada uma pode ocorrer nas formas *cis* e *trans* e os isômeros podem ser opticamente ativos. Sua ocorrência natural é discutida (Bauer et al., 2001).

Iononas, ironas, metiliononas e seus correspondentes compostos *pseudo* (precursores alílicos) são líquidos amarelados pouco viscosos. Comercialmente, ironas e metiliononas são misturas de isômeros nomeados de acordo com o principal componente. A composição varia conforme o método usado para preparar e ciclizar os pseudocompostos e consideráveis flutuações entre os diferentes tipos de produção (Bauer et al., 2001).

A figura 3 apresenta as iononas e alguns exemplos de seus homólogos.

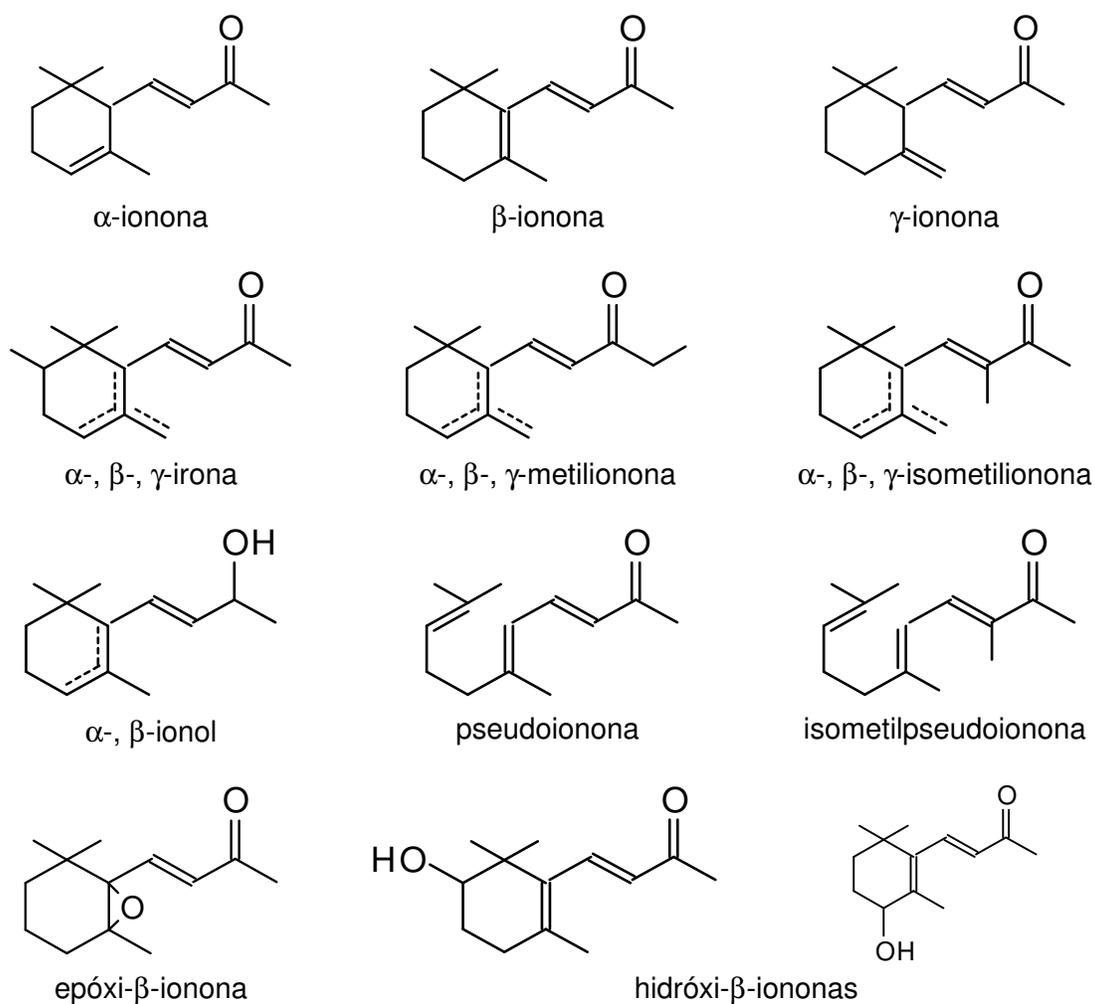


Figura 3. Iononas e homólogos (Weeks, 1986; Petrzilka & Ehret, 1994; Bauer et al., 2001).

1.4.2 DAMASCONAS

Damasconas são isômeros das iononas e dependendo da posição da dupla ligação no anel, existe a possibilidade de formação de vários outros isômeros. De importância comercial, são as α -, β - e δ -damascona (Bauer et al., 2001). Apesar de possuírem similaridades estruturais, os diferentes isômeros apresentam

propriedades sensoriais muito diferentes, proporcionando efeitos diversos quando usados em composições aromáticas e fragrâncias (Bauer et al., 2001; Beszant et al., 2002; Serra & Fuganti, 2006), complementando favoravelmente o aroma de outros compostos bastante utilizados da mesma família (Beszant et al., 2002).

A α -damascona é um líquido incolor a levemente amarelado com notas difusas de floral e frutal de ocorrência natural em chá e tabaco e em diferentes óleos essenciais (Bauer et al., 2001; Serra & Fuganti, 2006). (S)-(-)- α -Damascona é o enantiômero mais potente, cujo descritor é floral, com reminiscência de pétalas de rosas e com características vinílicas. (R)-(+)- α -Damascona possui notas de amadeirado, cortiça e verde. Da mesma maneira, (S)-(+)- γ -damascona apresenta melhores propriedades sensoriais que o isômero (R)-(-)- γ -damascona (Serra & Fuganti, 2006).

A β -damascona é um líquido incolor a levemente amarelado com fortes notas florais e um complexo frutal com reminiscência de ameixa, rosas e groselha, presente em óleos e extratos de rosas (Bauer et al., 2001), tabaco e outros extratos vegetais (Petrzilka & Ehret, 1994; Aleu et al., 2001).

A α -damascona e a β -damascona são utilizados na composição de perfumes, especialmente perfumes de rosas e em preparações aromáticas para dar a sensação de natural (Bauer et al., 2001).

A δ -damascona apresenta notas difusas de groselha, é um líquido incolor a levemente amarelado, não foi reportado ter sido encontrado na natureza e é utilizado em perfumes para criar notas masculinas (Bauer et al., 2001).

Isodamascona é um composto obtido sinteticamente, incolor a levemente amarelado com notas frutal e floral, usado em perfumaria e cosméticos para dar a sensação de natural e frescor (Bauer et al., 2001).

β -Damascenona é um constituinte de óleo de rosa Bulgária, possui notas florais, encontrado em muitas frutas e produtos vegetais, utilizado comercialmente nas indústrias de aromas e fragrâncias (Winterhalter, 1991; Shure & Acree, 1994; Bauer et al., 2001; Puglisi et al., 2001) para conferir a sensação de natural na composição de perfumes (Bauer et al., 2001).

Alguns compostos da família das damasconas estão mostrados na figura 4 e a figura 5 apresenta o caminho proposto para formação de β -damascenona.

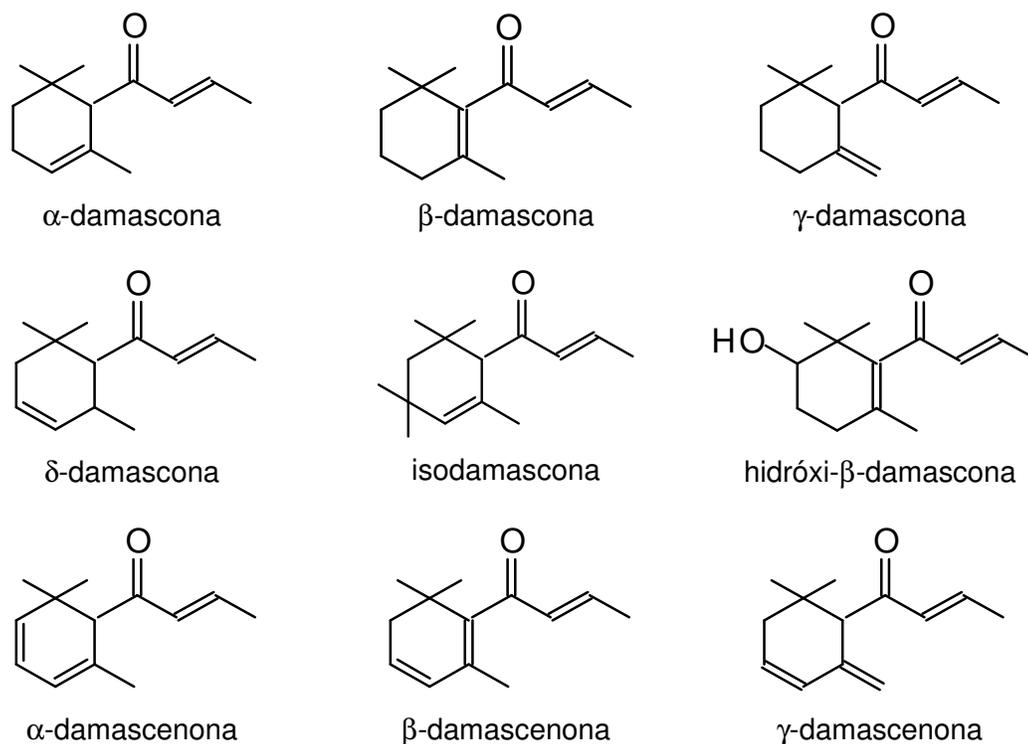


Figura 4. Damasconas e damascenonas (Weeks, 1986; Petrzilka & Ehret, 1994; Bauer et al., 2001; Serra & Fuganti, 2006).

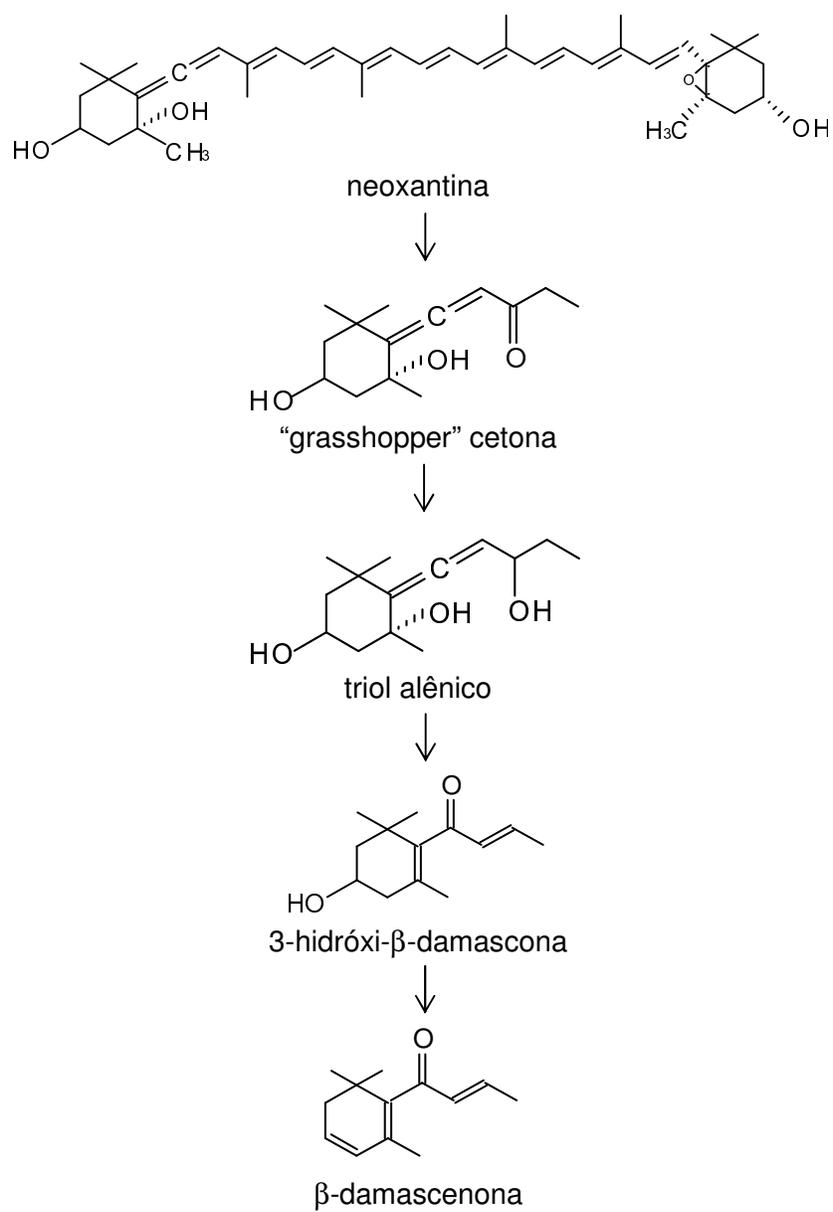


Figura 5. Caminho proposto para formação de β -damascenona a partir da degradação de neoxantina (Puglisi et al., 2001, Baumes et al., 2002; Skouroumounis et al., 2002).

1.4.3 OUTROS COMPOSTOS NOROISOPRENÓIDES

Vitispiranos podem ser gerados pela degradação ácida de vários precursores e por adição e remoção de moléculas de água do esqueleto das megastigmanas. Contribuem com o aroma de eucalipto, bálsamo e cânfora em vinhos (Winterhalter, 1992; Young et al., 2000; Schneider et al., 2001; Versini et al., 2002; Ferreira & de Pinho, 2004).

Teaspiranos podem ser formados em pH natural e temperatura ambiente pela ciclização de derivados de tetraidrofuranos correspondentes. Ocorrem em chá preto, marmelo, maracujá, tabaco e vinho e contribuem com notas de amadeirado, cedro, frutas secas e floral (Sanderson & Graham, 1973; Strauss et al., 1986; Winterhalter & Schreier, 1988; Winterhalter, 1992; Young et al., 2000; Schneider et al., 2001; Kaiser, 2002).

TDN – 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno – é um dos mais importantes contribuintes no aroma de vinhos Riesling, formado durante o envelhecimento do vinho por meio da degradação de precursores glicosilados; em concentrações superiores a 20 ppb, é responsável por descritores de hidrocarboneto, querosene ou petróleo (Winterhalter, 1991, 1992; Schneider et al., 2001; Marais, 2002; Versini et al., 2002; Ferreira & de Pinho, 2004).

A figura 6 apresenta as estruturas de vários compostos provenientes da degradação de carotenóides, entre eles vitispirano, teaspirano e TDN.

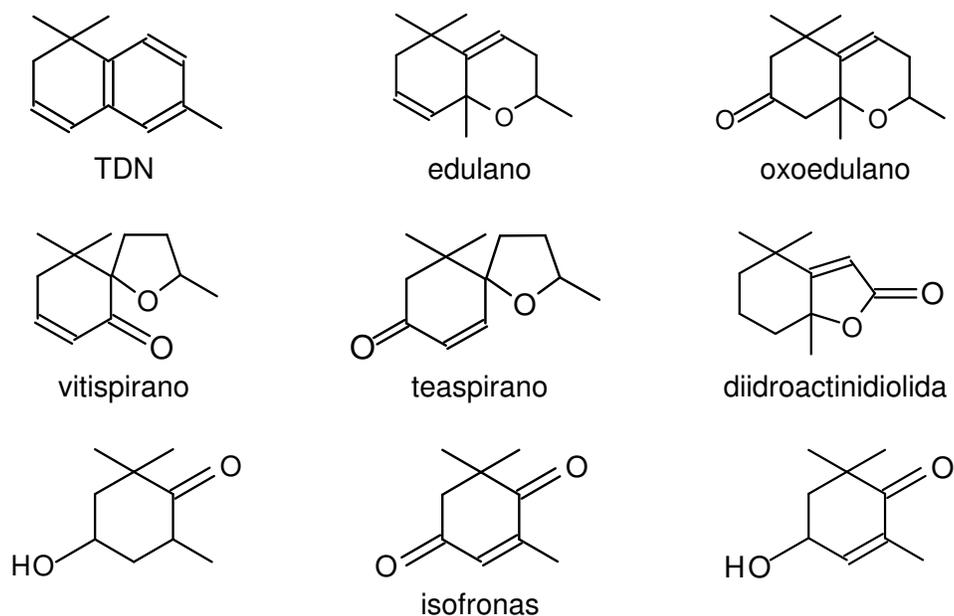


Figura 6. Compostos de aromas provenientes da degradação de carotenóides (Winterhalter & Schreier, 1988; Winterhalter, 1991, 1992; Kramer et al., 2002).

Crocina, *picrocrocina* e *safranal* são os principais compostos responsáveis pelo aroma de açafrão, obtidos da clivagem oxidativa de zeaxantina e glicosilações. Picrocrocina é o composto responsável pelo gosto amargo e é precursor de safranal, o aroma típico de açafrão, formado durante o processo de secagem, temperatura elevada e/ou ação de glicosidases (Straubinger et al., 1998; Winterhalter & Straubinger, 2000; Cadwallader, 2002; Bouvier et al., 2003). A figura 7 mostra o possível mecanismo para a formação de safranal a partir de zeaxantina.

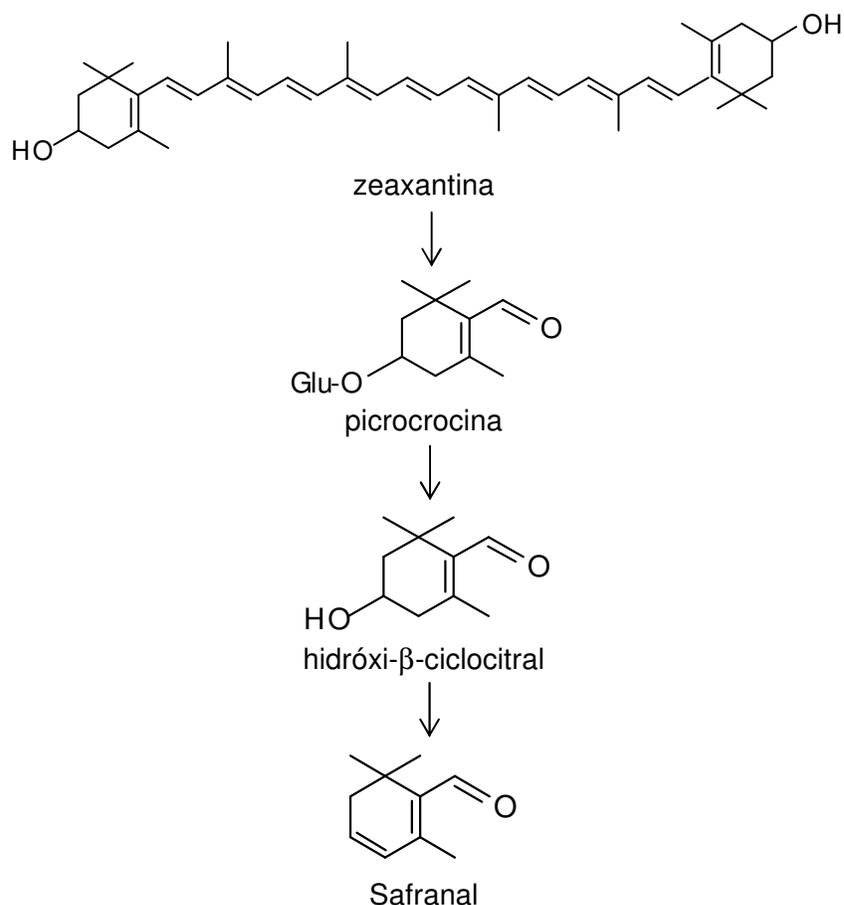


Figura 7. Mecanismo proposto para formação de safranal a partir de zeaxantina (Winterhalter & Straubinger, 2000; Cadwallader, 2002; Bouvier et al., 2003; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007).

1.5 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NOROISOPRENÓIDES

Carotenóides representam uma das maiores classes de pigmentos naturais, com funções na fotossíntese, foto-proteção, nutrição, e como importantes precursores de compostos de aromas. A geração de aromas pode ser obtida por vias enzimática e não enzimática. A clivagem não enzimática inclui foto-oxigenação, (auto)-oxidação e degradação térmica (Kotseridis et al., 1999; Winterhalter & Rouseff, 2002; Nornier et al., 2004; Ibdah et al., 2006). A

biodegradação dos carotenóides pode ser catalisada por sistema de oxigenases, peroxidases e lipoxigenases (Grosh et al., 1976; Schwartz et al., 2001; Winterhalter & Rouseff, 2002; Giuliano et al., 2003; Lewinsohn et al., 2005; Ibdah et al., 2006; Waché et al., 2002a, 2003, 2006; Pinheiro & Marsaioli, 2007).

Nos vegetais, a rota metabólica proposta possui três passos para se gerar um composto de aroma derivado de um carotenóide (Baumes et al., 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007):

- (i) degradação enzimática dos carotenóides por oxidases, obtendo-se produtos primários – compostos carbonilas norisoprenóides de 13 carbonos oxidados;
- (ii) transformações enzimáticas por oxidases e redutases dos produtos primários originando intermediários polares – precursores de aromas;
- (iii) catálise ácida dos precursores não voláteis para a forma ativa.

Outros métodos biotecnológicos para a produção de aromas a partir de carotenóides incluem o uso de microrganismos (Larroche et al., 1995a; Sánchez-Contreras et al., 2000; Aleu et al., 2001; Grivel & Larroche, 2001; Winterhalter & Rouseff, 2002; Maldonado-Robledo et al., 2003; Zorn et al., 2003d; Urlacher et al., 2006) e tecidos vegetais ou culturas celulares (Whitaker et al., 1986; Welsh, 1994; Winterhalter & Rouseff, 2002).

Muitos microrganismos têm sido relatados como capazes para síntese *de novo* e biotransformação de mono-, sesqui-, tri- ou tetraterpenóides para a produção de compostos de aromas (Zorn et al., 2003d). *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Bacillus* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium fujikourii*, *Ganoderma applanatum*, *Geotrichum* sp., *Hypomyces odoratus*, *Ischnoderma benzoinum*,

Kluyveromyces lactis, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lepista irina*, *Marasmius scorodoni*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Pleurotus eryngii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas incognita*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas vancouverensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* sp., *Torulaspora delbrueckii*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*, *Trichosporum cutaneum*, *Trichosporon asahii*, *Xanthomonas campestris* são alguns deles (Larroche et al., 1995a; Sánchez-Contreras et al., 2000; Aleu et al., 2001; Demyttenaere et al., 2001; King & Dickinson et al., 2003; Maldonado-Robledo et al., 2003; Zorn et al., 2003c, 2003d, 2004; Rodriguez-Bustamante et al., 2005; Urlacher et al., 2006; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007).

O presente uso da biotecnologia consiste na produção de compostos de aromas e substâncias químicas específicas por fermentação, na aplicação e melhoramento da tecnologia de enzimas a alimentos processados e na aplicação de novas tecnologias genéticas para o aumento de produção de sementes, condimentos e óleos essenciais, para o fornecimento de produtos econômicos, seguros, de baixa toxicidade, estáveis e uniformes. A aplicação da biotecnologia na produção de bioaromas depende somente da capacidade intelectual dos cientistas e do uso de tecnologias emergentes. O aumento no rendimento de produtos agrícolas com intensificação nos aromas e a produção total de aromas específicos a custos reduzidos e menos prejudiciais ao meio ambiente são perspectivas para o futuro (Katz, 1986; Manley, 1994; Welsh, 1994; Schrader et al., 2004; Serra et al., 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OXIDAÇÃO

Glória et al. (1993) estudaram diferentes tipos de oxidação de β -caroteno por suplementação de 10 mL/min de oxigênio e a formação de compostos voláteis por auto-oxidação em sistemas modelo, e os resultados foram comparados com a oxidação fotossensibilizada e química em solução. A degradação do β -caroteno foi mais rápida durante a auto-oxidação a 80°C, seguida da oxidação química, fotossensibilizada e auto-oxidação a 20°C. Os produtos obtidos foram similares, diferindo apenas nas concentrações relativas. Compostos originados da clivagem das ligações 7-8, 8-9 e 9-10 do β -caroteno foram obtidos por auto-oxidação a 20°C e por oxidação química. Auto-oxidação a 80°C e foto-oxidação originaram produtos mais específicos: β -ionona e diidroactinidiolida, respectivamente.

Ferreira et al. (2008) avaliaram a degradação de carotenóides e a formação de voláteis em vinhos do Porto envelhecidos por 2 anos. Seis litros de vinho tinto foram saturados com 6,5 mg L⁻¹ de oxigênio e divididos em três porções. A primeira correspondeu ao controle, a segunda foi suplementada com luteína e a terceira com β -caroteno, mantidos a 60°C por 87 h. Os resultados mostraram que luteína foi mais sensível à degradação que β -caroteno. Os níveis de β -ionona e β -ciclocitral aumentaram nas três porções. O mesmo foi observado com β -damascenona na porção enriquecida com luteína e no controle.

2.2 DEGRADAÇÃO TÉRMICA

A formação de compostos voláteis obtidos pela degradação de β -caroteno durante aquecimento a 97°C, de 1 a 4 h, em água destilada foi investigada por Kanasawud & Crouzet (1990). Observaram a formação de decanal, 4-etilbenzaldeído, cetoisofrona, 2,6-dimetildecahidronaftaleno e 2-hidróxi-2,6,6-trimetil-ciclohexanona, além de diidroactinidiolida, o primeiro composto produzido durante o aquecimento de β -caroteno e que atua como precursor de outros compostos voláteis como a β -ionona. As concentrações dos compostos produzidos aumentavam nas primeiras horas de reação e estabilizava-se entre 2 e 4 h. A produção máxima de 5,6-epóxi- β -ionona foi observada após 2 h de reação.

Crouzet et al. (2002) analisaram a formação de compostos voláteis e não voláteis durante o aquecimento de suspensões aquosas de β -caroteno e licopeno em diferentes temperaturas e concentrações de oxigênio. O aquecimento de β -caroteno a 97°C de 30 min a 6 h indicou a presença de diidroactinidiolida, cuja concentração aumentava com o tempo de reação e com o conteúdo de oxigênio do meio e a concentração de 5,6-epóxi- β -ionona aumentava nas 2 primeiras horas de reação e começava a declinar. O aquecimento de licopeno a 97°C de 1 a 3 h resultou em 2-metil-2-hepten-6-ona, pseudoionona, geranial e 6-metil-3,5-heptadien-2-ona como os compostos mais abundantes. Também foram encontrados decanal, 4-oxo- β -ionona, β -metilionona, cetoisofrona, trimetil-decahidronaftaleno, 2-hidróxi-2,6,6-trimetilciclohexanona, actinidol, β -ciclocitral e β -ionona.

2.3 HIDRÓLISE ÁCIDA

Sommemburg et al. (2003) estudaram a formação de compostos de degradação do β -caroteno e de apocarotenóides por ácido hipocloroso, nas concentrações de 1:10 e 1:100, em solução metanólica e solução aquosa com 1% e 20% de soja. A degradação de β -caroteno após 10 min de reação em solução metanólica 1:100 não apresentou picos de compostos de cadeia longa nas análises por CLAE. Em solução aquosa não houve degradação total dos carotenóides e, após 10 min de reação na matriz contendo 20% de soja, somente 70% do β -caroteno havia sido degradado. Análises por CG-EM identificaram a presença de 5,6-epóxi- β -ionona, ioneno, β -ciclocitral, β -ionona, diidroactinidiolida e 4-oxo- β -ionona.

López et al. (2004) realizaram hidrólise ácida de extratos clarificados e das cascas de uvas Tempranillo e Grenache para avaliação dos compostos voláteis. Análises por cromatografia gasosa acoplada a olfatométrica (CG-O) indicaram a presença de compostos voláteis derivados de ácidos graxos insaturados, fenóis, vanilínicos, terpenos, norisoprenóides, sulfurados e outros. Dentre os compostos norisoprenóides, foram detectados β -damascenona, 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (TDN) e um outro composto de espectro de massas similar ao vitispirano. Os compostos α - e β -iononas não foram encontrados por CG-O.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Winterhalter & Schreier (1988) isolaram os constituintes de marmelo (*Cydonia oblonga* Mill.) por extração com solvente e por hidrólise enzimática da fração glicosídica utilizando β -glicosidase, para determinar a composição de voláteis. A hidrólise enzimática identificou 3-hidróxi- β -ionol como composto majoritário, além da presença de 3-hidróxi- β -ionona, 3-hidróxi-7,8-diidro- β -ionol, vomifoliol, 3-oxo- β -ionol e 7,8-deidrovomifoliol. O extrato orgânico revelou a presença de compostos noroisoprenóides como 4-hidróxi- β -ionol, 3-hidróxi- β -ionol, 4-hidróxi- β -ionona, 4-oxo- β -ionol, 3-hidróxi- β -ionona, 5,6-diidroxi- β -ionona e deidrovomifoliol.

Winterhalter (1991) obteve uma fração glicosídica de vinho Riesling por adsorção em fase reversa C_{18} seguida de hidrólise enzimática por pectinase e trimetilação para identificação de compostos voláteis como TDN e noroisoprenóides de 13 carbonos relacionados.

Takeoka et al. (1992) avaliaram a hidrólise enzimática de extrato de nectarina (*Prunus persica nectarina*) por β -glicosidase, encontrando uma quantidade moderada de dióis monoterpênicos, duas formas isoméricas de teaspirano, 4-hidróxi-7,8-diidro- β -ionol, formas conjugadas de 3-hidróxi-7,8-diidro- β -ionol, 3-hidróxi- β -ionona e vomifoliol, 3-oxo- α -ionol, 3-oxo-retro- α -ionol, 7,8-diidro- α -ionol, 3-oxo-7,8-diidro- α -ionol.

Neugebauer et al. (1995) estudaram a hidrólise enzimática de um extrato glicosídico de folhas de urtiga (*Urtica dioica* L.) por pectinase comercial, obtendo

oito compostos noroisoprenóides agliconas de 13 carbonos. Os principais componentes encontrados foram 3-oxo- α -ionol e 3-hidróxi-5,6-epóxi- β -ionol.

Schneider et al. (2001) realizaram hidrólise enzimática de suco de uva (*Vitis vinefera* L. cv. Melon B.) por glicosidase para determinação qualitativa e quantitativa de compostos voláteis monoterpênicos e noroisoprenóides. Os compostos noroisoprenóides de 13 carbonos corresponderam a cerca de 70% do total de voláteis liberados, incluindo 3-oxo- α -ionol, o mais abundante, 3-hidróxi- β -damascona e 4,5-diidro-*vomifoliol*. Uma hidrólise ácida foi realizada no suco das uvas para simular o envelhecimento de vinho. Foram detectados compostos monoterpênicos e noroisoprenóides, dentre eles, β -damascenona, TDN, vitispiranos e Riesling acetal.

Günata et al. (2002) isolaram glicoconjugados do suco das bagas e da fração metanólica do extrato das folhas de uvas Muscat e Shiraz. Realizaram hidrólise enzimática com um extrato fúngico com atividade de glicosidase para avaliação dos compostos voláteis e identificaram cerca de 90 compostos, sendo 34 noroisoprenóides. Trinta destes compostos foram encontrados nas folhas e 17 nas bagas, o que pode ser explicado pela maior quantidade de carotenóides nas folhas. 3-Hidróxi- β -damascona foi o composto majoritário encontrado nas bagas das uvas, não detectado nas folhas. 3-Oxo- α -ionol e derivados foram mais abundantes nas folhas de Muscat. Folhas de Shiraz apresentaram uma quantidade maior de derivados de 7,8-diidroiononas como megastigmana-3,9-diol e 3-oxo-7,8-diidro- α -ionol.

2.5 CO-OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA

Bosser & Belin (1994) analisaram a co-oxidação enzimática de β -caroteno, nas concentrações de 10 e 90 mg L⁻¹, por xantina oxidase em soluções aquosas contendo acetaldeído ou butanal, a 37 °C e 750 rpm. Observaram a produção de β -ionona e derivados como epóxi- β -ionona, diidroactinidiolida, β -ciclocitral e pseudoiononas, devido à formação de radicais livres durante as primeiras horas de reação. β -Ionona e diidroactinidiolida foram detectados em todos os sistemas de oxidação e a quantidade formada dependia do tempo de reação e do aldeído utilizado. Epóxi- β -ionona foi produzido mais lentamente, proveniente da oxidação da β -ionona. Quando concentrações de 150 e 200 mg L⁻¹ de β -caroteno foram utilizados, não foi observado aumento significativo da quantidade de β -ionona liberada.

Ropert et al. (1995) estudaram a co-oxidação de carotenóides e ácidos graxos por lipoxigenases de soja. A produção de α - e β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona e diidroactinidiolida dependiam da concentração de β -caroteno e de lipase utilizada.

Wu et al. (1999) utilizaram lipoxigenase de soja e duas lipoxigenases de ervilhas para avaliar a co-oxidação de β -caroteno em presença de ácido linoléico. A velocidade de reação aumentava gradualmente com o aumento da concentração de enzima e não era afetada pelo aumento da concentração de β -caroteno. Foram identificados β -ciclocitral e β -ionona e outros compostos não voláteis.

Co-oxidação de β -caroteno e neoxantina por xantina oxidase foram avaliadas por Waché et al. (2002a). Nos sistemas contendo β -caroteno, foram avaliados os efeitos dos radicais livres formados com os diferentes substratos para xantina oxidase e o efeito da isomeria *cis/trans* do β -caroteno. Os principais produtos formados a partir de β -caroteno foram β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona e diidroactinidiolida. A isomeria *cis/trans* favoreceu a formação de produtos específicos. Para *all-trans*- e 9-*cis*- β -caroteno foram clivadas principalmente as ligações 7-8 e 9-10, respectivamente. No sistema contendo neoxantina, 90% do carotenóide foi degradado na primeira hora de reação, havendo a produção de 3-hidróxi- β -ionona, 3-hidróxi- β -ionol, 3-oxo- β -ionol, β -ionona, β -ionol e precursores de damascenona.

Waché et al. (2002b) analisaram a co-oxidação de β -caroteno por xantina oxidase na presença de acetaldeído e a formação de compostos de aromas da família das iononas em sistemas aquosos e bifásicos. Em sistemas aquosos, β -caroteno em diferentes concentrações (10, 45 e 90 mg L⁻¹) foi degradado nas primeiras 2 h de reação e a concentração de β -ionona aumentava em 3 ou 4 h e começava a declinar. Em sistemas bifásicos, o β -caroteno foi degradado somente na presença de hexano ou benzeno, sendo observado o acúmulo de β -ionona e de 5,6-epóxi- β -ionona; diclorometano e acetona inibiram a atividade enzimática.

Em um estudo posterior também utilizando xantina oxidase, Waché et al. (2003) investigaram a influência da isomeria *cis/trans* na degradação de β -caroteno e a produção de compostos de aromas. Foram utilizadas uma mistura de

isômeros (54% *all-trans*, 25% 9-*cis*) e *all-trans*- β -caroteno (96% *all-trans*, 0,8% 9-*cis*). Em ambos os casos, a degradação ocorreu nas primeiras 3 h sem qualquer diferença significativa nas velocidades de degradação dos isômeros. Houve produção de β -ionona, epóxi- β -ionona, diidroactinidiolida e β -ciclocitral. No sistema contendo *all-trans*- β -caroteno, β -ionona e o epóxido acumularam nas primeiras 4 h de reação, e no sistema contendo a mistura de isômeros o acúmulo se deu nas primeiras 2 h. Diidroactinidiolida acumulou-se muito rapidamente e em maiores concentrações quando a razão de 9-*cis*-isômero era maior, não ocorrendo o mesmo com a β -ionona.

Waché et al. (2006) prepararam soluções de β -caroteno disperso em substâncias surfactantes para formação de micelas e micelas reversas para avaliar a co-oxidação por xantina oxidase e lipoxigenase em sistemas aquoso e bifásico, respectivamente. Lipoxigenase foi ativa no sistema micelar reverso, degradando a solução de β -caroteno rapidamente, com formação de β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona e diidroactinidiolida. Nos sistemas aquosos não foi possível observar a formação de compostos de aromas provenientes da degradação do β -caroteno micelar disperso nos vários tipos de surfactantes testados.

2.6 BIOTRANSFORMAÇÃO

Mikami et al. (1981) selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* (JTS 191) capaz de converter iononas em outros compostos de aromas. Os produtos da transformação individual de β -ionona foram isolados e identificados por comparação com compostos derivados sinteticamente. Foram encontrados (R)-4-hidróxi- β -ionona e (S)-2-hidróxi- β -ionona como produtos majoritários. Compostos como 2-oxo-, 4-oxo-, 3,4-diidro-, 2,3-diidro-4-oxo-, 3,4-diidro-2-oxo-, (S)-2-acetóxi-, (R)-4-acetóxi-, e 5,6-epóxi- β -ionona e 4-(2,3,6-trimetilfenil)-but-3-en-2-ona, além de produtos análogos provenientes da transformação de β -metilionona também foram identificados.

Yamazaki et al. (1988) avaliaram a conversão de α -ionona, α -metilionona e α -isometilionona por *Aspergillus niger* JTS 191. Os principais produtos de degradação de α -ionona foram *cis*- e *trans*-3-hidróxi- α -ionona e 3-oxo- α -ionona, isolados e identificados por espectrometria e síntese orgânica. 2,3-Diidro- α -ionona, 3,4-diidro- β -ionona e 1-(6,6-dimetil-2-metileno-3-ciclohexenil)-buten-3-ona e compostos semelhantes oriundos da bioconversão de α -metilionona e α -isometilionona também foram identificados.

Larroche et al. (1995a) estudaram a capacidade de uma linhagem de *Aspergillus niger* (IFO 8541) em biotransformar β -ionona em seus derivados oxo- e hidróxi-, quando cultivado como micélio livre, formando “pelets”. Observaram que as condições de cultivo para a biotransformação dependiam do tamanho do “pelet” durante o crescimento microbiano e a forma e o tamanho do “pelet” dependiam da

cepa e do tamanho do inóculo. β -Ionona foi adicionada com 60 h de crescimento do fungo e após 170 h foi quase completamente consumida. Os produtos 2- e 4-hidróxi- β -ionona e 4-oxo- β -ionona começaram a ser formados 40 h depois da primeira adição de β -ionona. A fim de manter a morfologia dos “pelets”, o meio foi inoculado com os esporos imobilizados em alginato de cálcio. Neste caso, a primeira adição de β -ionona foi realizada com 46 h de cultivo, obtendo-se os mesmos produtos e nas mesmas proporções após 230 h de fermentação.

Em outro estudo, Larroche et al. (1995b) verificaram o efeito da concentração inicial de β -ionona utilizada para biotransformação por cepas de *Aspergillus niger*. A baixas concentrações de substrato ($2,12 \text{ mmol L}^{-1}$), o consumo de β -ionona e a formação dos produtos seguiram um perfil uniforme, com velocidades constantes. A adição de β -ionona em altas concentrações ($6,58 \text{ mmol L}^{-1}$) resultou num decréscimo na velocidade de crescimento microbiano e na síntese dos produtos. Os compostos formados foram 2- e 4-hidróxi- β -ionona (formado em maior concentração), 2- e 4-oxo- β -ionona, ácido 4-hexil-2,5-diidro-2,5-dioxo-3-furanoacético e 4-hidróxi-5,6-epóxi- β -ionona.

A biotransformação de β -ionona por *Aspergillus niger* IFO 8541 foi avaliada por Grivel et al. (1999) em um sistema dinâmico considerando-se a transferência entre as fases orgânica, aquosa e gasosa. A primeira adição de β -ionona foi realizada após 28 h de crescimento do fungo e o principal produto da biotransformação foi 4-hidróxi- β -ionona. Houve a formação de 2-hidróxi- β -ionona,

ácido 4-hexil-2,5-diidro-2,5-dioxo-3-furanoacético, 4-oxo- β -ionona, 4-hidróxi-5,6-epóxi- β -ionona e 2-oxo- β -ionona.

Sánchez-Contreras et al. (2000) isolaram colônias de microrganismos do resíduo do processamento de desidratação de flores de calêndula. Dezenove colônias foram selecionadas por sua capacidade de degradação da luteína presente em meio quimicamente definido contendo farinha de flores de calêndula como única fonte de carbono. Duas colônias apresentaram potencial de produção de compostos de aromas e uma delas, composta de *Geotrichum* sp. e *Bacillus* sp., foi selecionada como produtora de aroma de tabaco. Observaram que para a produção de aroma de tabaco contendo 7,8-diidro- β -ionol, β -ionona, 7,8-diidro- β -ionona e 3-hidróxi- β -ionona era necessária a associação entre os dois microrganismos.

Maldonado-Robledo et al. (2003) estudaram uma cultura de microrganismos formada por *Bacillus* sp. e *Geotrichum* sp. capaz de produzir aroma de tabaco a partir de luteína, com a formação do intermediário β -ionona. Verificaram que os microrganismos são capazes de crescer independentemente no meio contendo luteína, mas somente *Geotrichum* sp. foi capaz de produzir β -ionona, que é incorporado por *Bacillus* sp., convertendo-o nos compostos 7,8-diidro- β -ionona e 7,8-diidro- β -ionol e excretando-os no meio. A diferença poderia ser explicada como resultado de uma interação coordenativa entre os microrganismos, prevenindo a presença inibitória de β -ionona para o fungo e favorecendo a biotransformação de luteína em compostos de aromas.

Meio livre de micélio de *Lepista irina* foi utilizado por Zorn et al. (2003c) para degradar β,β -caroteno. β -Ionona foi o principal metabólito formado, seguido de β -ciclocitral, diidroactinidiolida e 2-hidróxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. Observaram um rápido perfil de reação, onde mais de 90% do β,β -caroteno adicionado foi degradado nos primeiros 30 minutos e a concentração máxima de β -ionona foi atingida após 1 h. A caracterização bioquímica do extrato purificado apresentou massa molecular de 50,5 kDa, ponto isoelétrico de 3,75 e foi identificado como peroxidase pelo seqüenciamento de 30 aminoácidos N-terminais.

Zorn et al. (2003d) realizaram uma investigação com mais de 50 linhagens para selecionar aquelas capazes de clivar β -caroteno solubilizado no ágar. Dez cepas formaram um halo de degradação na região do micélio e foram selecionadas para verificar a capacidade de produção de compostos de aromas em meio de cultura submerso e em meio livre de micélio. Diidroactinidiolida foi detectado em pequenas concentrações como único produto da bioconversão de β,β -caroteno em culturas submersas de *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Kuehneromyces mutabilis* e *Trametes suaveolens*. Em meios de cultura livres de micélio de *Ischnoderma benzoinum*, *Marasmius scorodonius* e *Trametes versicolor*, foram detectados β -ionona, β -ciclocitral, diidroactinidiolida e 2-hidróxi-2,6,6-trimetilciclohexanona.

Rodríguez-Bustamante et al. (2005) estudaram a bioconversão de luteína por uma combinação de microrganismos composta por *Thrichosporon asahii* e *Paenibacillus amylolyticus*. Os efeitos dos fatores nutricionais para a produção de

compostos de aromas de tabaco foram avaliados por metodologia de planejamento experimental. Glicose, triptona e extrato de levedura exerceram um forte efeito negativo; luteína apresentou um forte efeito positivo, e cloreto de sódio e elementos traços não apresentaram influências no processo de produção de aroma de tabaco. O rendimento alcançado após a otimização do meio foi 10 vezes maior comparado com o meio base. Os produtos obtidos foram 7,8-diidro- β -ionol, 7,8-diidro- β -ionona e β -ionona.

Rodríguez-Bustamante et al. (2006) analisaram a síntese e a habilidade do material poroso MCM-41 em adsorver a β -ionona produzida a partir da bioconversão de luteína pela levedura *Trichosporon asahii*. Observaram que a β -ionona inibia o crescimento celular, comprometendo a formação de aroma. A inibição de crescimento foi superada com a utilização de silicato de MCM-41 no sistema fermentativo, permitindo a remoção dos produtos do meio de cultivo por manipulação da fase gasosa (headspace). O material poroso MCM-41 apresentou uma adsorção de β -ionona 4,5 vezes maior que a sílica gel comercial, possibilitando o aumento na produção do composto quando comparado com culturas sem a presença do material adsorvente, sugerindo que o aprisionamento da β -ionona diminuía a toxicidade do composto favorecendo sua produção.

Urlacher et al. (2006) estudaram um tipo de monoxigenase do citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (P450 BM-3), de baixa atividade de hidroxilação de β -ionona. A enzima possui uma fenilalanina na posição 87, localizada diretamente sobre um grupo heme que controla régio- e enantio- seletividades. A substituição

da fenilalanina 87 por uma alanina, valina ou glicina, aumentaram a capacidade de hidroxilação da β -ionona, porém, na substituição com a glicina, o incremento de atividade foi em menor extensão. Valina, alanina e fenilalanina são aminoácidos não polares e hidrofóbicos, enquanto a glicina é um aminoácido pouco polar e possui um efeito diferente na interação com o substrato. Todos os mutantes converteram β -ionona a 4-hidróxi- β -ionona e α -ionona foi hidroxilada em várias posições produzindo 3-hidróxi- α -ionona, 7-hidróxi- α -ionona e outros derivados hidroxilados em menores concentrações. P450 BM-3 e mutantes também foram capazes de oxidar ácidos graxos saturados e alcanos nas posições subterminais e oxidar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e terpenos em diferentes posições, gerando diferentes produtos hidroxilados.

2.7 TECIDOS VEGETAIS

Shure et al. (1994) estudaram culturas de células de uvas (*Vitis labruscana*) dos tecidos imaturos das frutas e do pecíolo, para verificar a formação de precursores de β -damascenona. Verificaram que luz e aumento na concentração de sacarose tiveram um efeito positivo nos níveis do precursor. Alguns glicosídeos apresentaram efeito positivo nas culturas do pecíolo, mas não na cultura de frutas. A adição de β -caroteno e amitrol, um inibidor de ciclização, não tiveram efeito nos níveis do precursor de β -damascenona, provavelmente relacionada com eficiência dos tecidos em capturar esses compostos do meio.

Schwartz et al. (2001) determinaram a função bioquímica de uma proteína presente nos tecidos vegetais de *Arabidopsis thaliana* capaz de clivar carotenóides e expressaram-na em *Escherichia coli* para estudos *in vitro*. A proteína recombinante clivou diversos carotenóides nas posições 9-10 e 9'-10' e também simetricamente, originando produtos de 13 carbonos, como 3-hidróxi- β -ionona e epóxi- β -ionona, e um dialdeído de 14 carbonos. Os substratos utilizados foram β -caroteno, luteína, zeaxantina, *all-trans*- e 9-*cis*-violaxantina e 9-*cis*-neoxantina.

Extratos vegetais da casca de marmelo (*Cydonia oblonga*) e de pele de carambola (*Averrhoa carambola*) foram obtidos por Fleishmann et al. (2002) e testados quanto sua capacidade de degradar carotenóides. As massas moleculares das proteínas foram determinados, obtendo-se de 20 a 30 kDa para marmelo e 80 a 90 kDa para carambola. As condições ótimas de atividade de degradação de β -caroteno para o extrato de carambola foi 45°C e pH 8,5 e para marmelo, temperatura superior a 50°C, não sofrendo influência do pH. Observaram que somente a pele e a casca das frutas possuíam quantidades suficientes de proteínas capazes de degradação de carotenóides.

Fleishmann et al. (2003) analisaram uma fração enzimática obtida da pele de carambola (*Averrhoa carambola*) com atividade de clivagem de carotenóides. A purificação parcial da proteína foi realizada, obtendo-se 4 bandas de massa molecular entre 12 e 90 kDa e atividade ótima de degradação de β -caroteno a 45°C e pH 8,5. Análises por cromatografia gasosa mostraram que o principal

produto obtido da degradação de β -caroteno pelo extrato vegetal de carambola foi a β -ionona.

Sakamaki et al. (2004) estudaram suspensões de culturas da leguminosa *Caragana chamlagu* capaz de converter (\pm)- α -ionona e β -ionona. Após 20 dias de incubação no escuro a 25°C e 120 rpm foi obtida uma mistura racêmica de (\pm)-3-oxo- α -ionona como produto majoritário e rendimento de 50%, hidróxi- α -ionona e epóxi- α -ionona como produtos da biotransformação de (\pm)- α -ionona. Nas mesmas condições, β -ionona foi convertida unicamente a 5,6-epóxi- β -ionona, com rendimento de 87%.

As funções bioquímicas de proteínas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) capazes de clivar carotenóides foram determinadas por Simkin et al. (2004) por expressão bacteriana e estudos *in vitro*. Os ensaios foram realizados com β -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina e neoxantina. O produto de clivagem central, um dialdeído de 14 carbonos foi o principal composto obtido, além de produtos norisoprenóides de 13 carbonos como 5,6-epóxi-3-hidróxi- β -ionona, 3-hidróxi- β -ionona e 3-hidróxi- α -ionona.

Baldermann et al. (2005) estudaram um extrato enzimático obtido de casca de nectarina (*Prunus persica*) capaz de clivar carotenóides para formação de compostos de aromas norisoprenóides, importante durante o amadurecimento do fruto. A atividade de clivagem de β -caroteno foi encontrada na fração ácida, seguiu um modelo de reação de primeira ordem e a degradação enzimática dependeu somente da concentração de substrato.

2.8 OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS DE AROMAS NOROISOPRENÓIDES

Chá – Camellia sinensis

Kawakami & Kobayashi (2002) e Ravichandran (2002) analisaram os efeitos do processo de manufatura na formação de compostos de aromas derivados de carotenóides em diversos tipos de chá. Verificaram que a decomposição de β -caroteno, luteína e zeaxantina ocorre principalmente via enzimática por oxidação durante a secagem, fermentação e pirólise durante a torra; por foto e auto-oxidação. Foram detectados β -ciclocitral, safranal, α -damascona, β -damascenona, α -ionona, geranilacetona, β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona, teaspirano, 4-oxo- β -ionona, diidroactinidiolida, entre outros.

Damasco – Prunus armeniaca

O perfil dos compostos de aromas de cultivares de damasco foi caracterizado por Chen et al. (2006), Guillot et al. (2006) e Solís-Solís et al. (2007) utilizando vários tipos de extração. Entre os compostos diretamente relacionados com o aroma de damasco foram encontrados β -ciclocitral, β -ionona, α -terpineol, γ -decalactona, acetato de etila, acetato de hexila, limoneno, linalool.

Melão – Curcumis melo

Ibdah et al. (2006) estudaram diversos cultivares de melões e verificaram a presença de β -ionona, β -ciclocitral e diidroacitnidiolida nas variedades que

acumulam mais β -caroteno, como as de polpa laranja. Nas variedades de polpas verde ou branca, β -ionona foi encontrada em menores concentrações.

Carambola – Averrhoa carambola

Mahattanatawee et al. (2005) analisaram o perfil dos compostos de aromas de carambola, goiaba e manga por diversas técnicas, resultando em 53, 48 e 46 compostos de aromas ativos, respectivamente. Compostos sulfurados e ésteres foram as classes de voláteis mais ativas em goiaba e manga. Em carambola, compostos noroisoprenóides, incluindo β -ionona, β -damascenona, β -damascona, β -ionol, edulano e magastigma-trieno, foram os mais ativos, contribuindo com notas doce e mel.

Rambutan – Nephelim lappaceum

Rambutan é uma fruta nativa do sudeste da Ásia, da mesma família (Sapindaceae) da lichia, freqüentemente descrita como menos aromática que a lichia e muito consumida fresca, em conserva ou processada, apreciada pelo aroma refrescante e aparência exótica. Ong et al. (1998) isolaram e caracterizaram os compostos ativos de aroma da fruta, encontrando mais de 20 compostos de maior impacto, entre eles, β -damascenona.

Vinho

Kotseridis et al. (1999) analisaram quantitativamente a concentração de β -ionona em vinhos tintos de diferentes cultivares e regiões. Foi encontrada em todas as uvas e vinhos analisados e as maiores concentrações foram detectadas em vinhos Pinot Noir da região de Burgundy.

Ferreira & de Pinho (2004) relataram a presença de β -damascenona, β -ionona, 2,2,6-trimetilciclohexanona (THC), 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (TDN) e vitispirano em vinhos do Porto jovens e envelhecidos. Como as concentrações foram relativamente diferentes nos dois tipos de vinhos, os níveis de O_2 dissolvido e SO_2 livre, pH e tempo/temperatura foram analisados. Observaram que todos os compostos foram afetados pelos parâmetros selecionados e que as concentrações de β -damascenona e β -ionona diminuía com o envelhecimento. Os níveis de TDN, THC e vitispirano foram maiores nos vinhos envelhecidos e aumentavam com o período de envelhecimento.

Açafrão – Crocus sativus

Açafrão é muito utilizado em alimentos como corante e aromatizante. Apresenta gosto amargo e descritores de aroma como doce, floral, gordura, picante, condimentado e herbáceo. Estima-se cerca de 150 compostos voláteis presentes em açafrão; destes, aproximadamente 60 foram identificados. O principal composto responsável pelo aroma de açafrão é o safranal, seguido de isofronas, crocinas e picocrocinas e derivados hidroxilados provenientes da

degradação de carotenóides (Tarantilis et al., 1995; Straubinger et al., 1998; Winterhalter & Straubinger, 2000; Cadwallader, 2002).

Páprica – Capsicum annuum

Krammer et al. (2002) avaliaram a formação de voláteis em páprica, utilizada como condimento e corante em alimentos. Vários compostos de aromas noroisoprenóides de 9, 10, 11 e 13 carbonos provenientes da degradação de β -caroteno, criptoxantina, violaxantina e zeaxantina têm sido identificados, tais como α -ionona, diidro- β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionona, 5,6-epóxi- β -ionol, 4-hidróxi- β -ionona, 4-oxo- β -ionona, β -ciclocitral, 3-oxo-7,8-diidro- α -ionona, 2,2,6-trimetilciclohexanona, entre outros.

Óleo essencial de laranja

Högnadóttir & Rouseff (2003) identificaram 55 compostos de aromas ativos em óleo essencial de laranja. Os aromas mais intensos foram dados por octanal, lactona de vinho, linalool, β -ionona, decanal, β -sinesal e citronelal, que contribuem para as notas cítrico, floral, doce e herbáceo. Verificaram que β -ionona é um dos compostos responsáveis pelas notas de saída e está presente em quantidades apreciáveis no óleo de laranja.

Madeira de carvalho – Quercus petraea

Nornier et al. (2004) estudaram o efeito da luz, temperatura e oxidação na degradação de carotenóides do extrato vegetal obtido de carvalho. Sob a influência da luz, observaram que o β -caroteno sofreu rápida degradação, reduzindo-se à metade da concentração inicial após 30 min de exposição. À temperatura ambiente e na ausência da luz, a velocidade de degradação é lenta, aumentando à medida que há aumento de temperatura. Compostos norisoprenóides e sesquiterpenos provenientes da degradação de β -caroteno foram identificados como megastigmatrienonas e β -ionona. Terpenos e norisoprenóides originados da degradação de luteína foram identificados como megastigmatrienonas, 2- e 6-hidróxi- β -ionona. A oxidação com cobre e por radicais foi realizada com β -caroteno e foram identificados β -ciclocitral, β -ionona, 3-oxo- β -ionona, 6-hidróxi- β -ionona, 3-oxo- β -ionol e sesquiterpenos.

Boronia – Boronia megastigma

Flores de boronia são cultivadas comercialmente na Tasmânia por possuir um extrato altamente floral, de interesse para as indústrias de fragrâncias. Dos voláteis presentes no extrato, pelo menos 24 são norisoprenóides, incluindo β -ionona, o composto majoritário, seguido de 3-hidróxi- β -ionona, 4-oxo- β -ionona, vários β -ionóis e 7,8-diidro- β -ionona (MacTavish et al., 2002; Cooper et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Selecionar microrganismos da microflora brasileira capazes de degradar β -caroteno presente em meio de cultivo para produção de compostos de aromas e separar, identificar e quantificar os compostos voláteis obtidos por fermentação submersa.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos capazes de degradar β -caroteno presente em meio sólido.

3.2.2. Seleção de linhagens com capacidade de produção de compostos de aromas a partir da degradação de β -caroteno, por um painel não treinado de provadores.

3.2.3. Separação, identificação e quantificação dos compostos de aromas formados por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS BIOTRANSFORMADORES DE CAROTENÓIDES

Os microrganismos previamente isolados foram selecionados pelo método da placa segundo Zorn et al. (2003c, 2003d) quanto à sua capacidade para biotransformar carotenóides. A solução nutriente padrão era constituída de 3% de glicose, 0,3% de extrato levedura, 0,45% de asparagina, 0,15% de KH_2PO_4 , 0,05% de MgSO_4 , adicionados de 2% de ágar, autoclavado a 121 °C e 1 atm de pressão por 20 min. Após resfriamento do meio, uma solução contendo 10 mg de β -caroteno disperso em 1 g de Tween 80, dissolvido em 20 mL de diclorometano, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm , foi adicionada em 100 mL de solução nutriente padrão.

O meio foi vertido em placas de Petri estéreis, as linhagens foram inoculadas e incubadas em estufa a 30 °C até desenvolvimento satisfatório das colônias. A produção de halo de degradação ao redor da colônia significou que o microrganismo foi capaz de degradar o β -caroteno presente no meio.

Foi utilizado *all-trans*- β -caroteno, pó, tipo I, sintético, com 95% de pureza, obtido da Sigma.

4.2 SELEÇÃO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE AROMAS A PARTIR DE β -CAROTENO

As linhagens produtoras de aromas foram selecionadas utilizando-se fermentação submersa em solução nutriente padrão, segundo Zorn et al. (2003c,

2003d), conforme descrito anteriormente, excetuando-se o ágar. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm de pressão por 20 min. Após o resfriamento do mesmo, uma solução de β -caroteno (0,1% p/v) em etanol 50%, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m, foi adicionada a 100 mL de meio. A solução de β -caroteno foi preparada segundo Sánchez-Contreras et al. (2000), Maldonado-Robledo et al. (2003) e Rodríguez-Bustamante et al. (2005), modificando-se a solução etanólica de 70% para 50%.

Os microrganismos foram inoculados assepticamente, em câmara de fluxo laminar, em 20 mL de meio e fermentados em agitador rotatório a 25°C, 150 rpm por 72 h para a produção de compostos de aromas. As cepas foram selecionadas de acordo com os descritores sensoriais e intensidades de aromas percebidos por um painel não treinado de 5 provadores (Uenojo, 2003). Aos provadores foi solicitada a análise olfativa das amostras com a descrição dos aromas percebidos e suas respectivas intensidades, segundo uma escala de intensidade apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Escala de intensidade de aroma.

Escala	Intensidade de Aroma
++++	Aroma muito intenso
+++	Aroma intenso
++	Aroma moderado
+	Aroma fraco
-	Nenhum aroma percebido

4.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMAS DERIVADOS DE CAROTENÓIDES

A produção de compostos de aromas por degradação de carotenóides foi realizada por fermentação submersa em 20 mL de solução nutriente padrão (Zorn et al., 2003c, 2003d), autoclavada a 121 °C, 1 atm de pressão por 20 min. As linhagens previamente selecionadas como produtoras de aromas foram submetidas à fermentação submersa em meios de cultura sem e com pré-inóculo para a produção de compostos de aromas.

Para os meios de cultura tratados *sem* pré-inóculo, as linhagens selecionadas foram inoculadas e a seguir realizada a adição de uma solução de β -caroteno (0,1% p/v) previamente preparada conforme descrito anteriormente, e então submetida à fermentação em agitador rotatório a 25 °C, 150 rpm por um período de até 120 h.

Para as culturas tratadas *com* pré-inóculo, as linhagens foram inoculadas em meio nutriente padrão e incubadas em agitador rotatório a 25 °C, 150 rpm por 24 h. Após esse período, uma solução de β -caroteno previamente preparada conforme descrito anteriormente, foi adicionada ao meio de cultivo e submetido à fermentação em agitador rotatório a 25 °C, 150 rpm por até 120 h.

Os controles das amostras foram feitos substituindo-se o inóculo ou o pré-inóculo por água destilada esterilizada e acondicionados em agitador rotatório a 25 °C, 150 rpm por até 120 h, junto às amostras.

4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DE AROMAS DAS AMOSTRAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Após cada período de 24 horas, os frascos foram retirados do agitador rotatório e as amostras extraídas com solvente orgânico, éter:hexano na proporção 1:1. As porções orgânicas foram acondicionadas em frascos de 1,5 mL e armazenadas em freezer até o momento das análises cromatográficas, quando foram concentradas com fluxo de nitrogênio gasoso (Sánchez-Contreras et al., 2000; Maldonado-Robledo et al. 2003; Uenojo, 2003; Rodríguez-Bustamante et al., 2005).

4.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS DE AROMAS FORMADOS

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent modelo 7890 com detector de ionização em chama (FID) e coluna capilar com (5% fenil)-metilpolisiloxano HP 5 (30 m X 0,32 mm X 0,25 μ m).

As condições utilizadas foram: temperatura inicial do forno 40°C por 1 min, aumentando-se 5°C por min até atingir 110°C, permanecendo por 5 min, aumentando-se 10°C por min até 250°C, permanecendo por 10 min. A temperatura do injetor foi fixada em 220°C e a do detector em 250°C. Foi empregado hélio como gás de arraste na vazão de 1,0 mL por min no sistema de injeção *splitless*. O volume de amostra utilizado para injeção foi de 1 μ L e 2-nonanol foi utilizado como padrão interno.

Os compostos voláteis também foram analisados em um cromatógrafo gasoso Varian modelo Saturn 2100D equipado com um detector de massas tipo armadilha de íons, voltagem de ionização de 70 eV, nas mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente, para a identificação dos compostos voláteis formados.

O índice de Kovats dos compostos e co-injeção de padrão puro foram utilizados como dados complementares para a confirmação de identidade dos mesmos (Uenojo, 2003).

Os compostos foram quantificados utilizando-se padrões autênticos.

α -Ionona 90% e β -ionona 96%, sintéticos, foram obtidos da Acros Organics.

Damascenona natural, 1% em solução etanólica 95%, foi obtida da Aldrich.

β -Damascona 90% e pseudoionona 90% (mistura de isômeros), sintéticos, foram obtidos da Fluka.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS BIOTRANSFORMADORES DE CAROTENÓIDES

Microrganismos previamente isolados, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioaromas, foram testados quanto sua capacidade de degradação de β -caroteno e produção de aromas.

Foram testadas 343 linhagens, das quais 116 apresentaram algum tipo de degradação na placa de Petri: presença de halo ou formação de aroma diferente do controle.

Os microrganismos que apresentaram halo significativo ou um aroma agradável na placa foram selecionados, totalizando 84 linhagens, que foram inoculadas em meio líquido para se verificar a produção de compostos de aromas.

Exemplos de degradação em placa de Petri, com formação de halo, estão mostradas na figura 8.

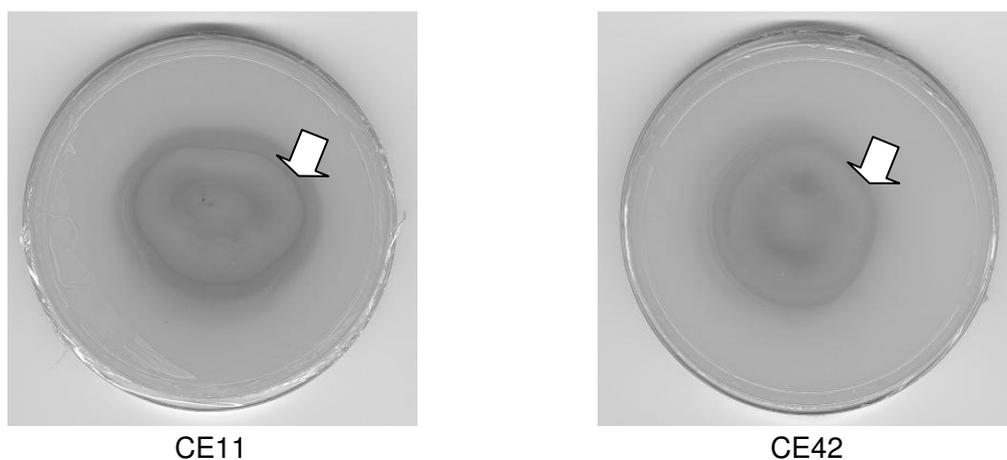


Figura 8. Exemplos de halo de degradação (setas) para duas linhagens testadas.

5.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS A PARTIR DE β -CAROTENO

As 84 linhagens pré-selecionadas no item 5.1 foram submetidas à fermentação submersa em meio nutriente padrão para se verificar a produção de compostos de aromas a partir do β -caroteno. Os microrganismos foram inoculados e submetidos à fermentação em agitador rotatório a 25 °C, 150 rpm por 72 h.

A tabela 2 apresenta os descritores e intensidades de aroma das 84 linhagens após 72 h de fermentação.

Tabela 2. Descritores e intensidades de aromas das linhagens selecionadas.

Linhagem	Descritor	Intensidade
CE70	fermentado, ácido, ruim	++++
CE73	fermentado, ácido, azedo	++
CE74	frutal	+
CE144	frutal	+
CE258	frutal, floral	+
CE259	frutal	+
CE254	frutal	+
CE276	frutal, ácido, sabão, coco, ranço	++
CE11	fruta podre	+++
CE125	fermentado	+++
CE151	fermentado, frutal	++
CE22	fermentado, podre	+++
CE34	fermentado, ácido, frutal	+
CE42	fermentado, chocolate	+
CE51	frutal, fermentado, fruta podre	++
CE71	frutal, fermentado, fruta podre	++
CE91	fermentado, ácido, podre	+++
CE93	fermentado, frutal	+
CE100	ruim, podre, fermentado	++

Tabela 2. Continuação.

CA503	amônia, ácido, frutal	++
CA507	amônia, ácido, frutal	++
CB2	amônia	+++
CB59	podre, azedo, ácido	+++
CB85	amônia	+++
CB88	amônia	+++
CB146	amônia	+++
CB156	amônia	+++
CB162	amônia	+++
CB175	ácido, fruta ácida	++
CB176	amônia	+++
CB183	amônia	+++
CB207	amônia	++
CB209	ácido	++
CB220	frutal	+
CB223	amônia	+++
CB224	fermentado	++
CB253	frutal	+
CB260	frutal	+
CB262	amônia	+++
CB289	amônia	+++
CB290	fermentado	+++
CB306	ruim, podre, fermentado	++++
CS1	frutal, fruta ácida, azedo, ácido, iogurte	++++
CS2	azedo, ácido	++
CS3	fermentado, frutal, floral, fruta ácida	+++
CS4	azedo, ácido, frutal, fruta ácida	++
CS5	fermentado, ruim, podre	+++
CS6	frutal, doce, ácido, floral	+++
CS11	fermentado, frutal, ácido, fruta podre, acetato de etila	++++
CS12	frutal, doce, ácido, fruta podre	++++
CS13	frutal, azedo, floral	+++
CS14	frutal, ácido, doce, fruta ácida, fruta podre	+++
CS15	ácido, vinagre, fruta podre	+++
CS16	fermentado, extrato de levedura	++

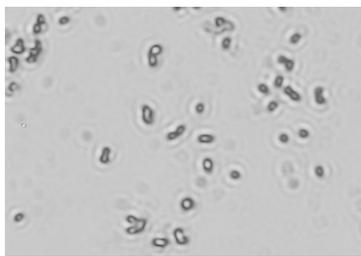
Tabela 2. Continuação.

CS17	frutal, carambola, ácido, doce	+++
CS18	frutal, fermentado, doce, ácido	++
CS19	frutal, ácido, acetato de etila, acetona, floral	++++
CS20	frutal, acerola, ácido, fruta azeda, fruta podre, floral	++++
CF1	fermentado, frutal, ácido, doce, acetato de etila	+++
CF2	fermentado, frutal, ácido	++
CF3	frutal, fermentado, doce	++
CF4	fermentado, ruim, podre	+++
CF5	frutal, ácido, doce, acetato de etila	++++
CF6	frutal, azedo, ácido, podre	+++
CF7	fermentado, frutal	++
CF8	frutal, ácido, acetato de etila, azedo	++
CF9	frutal, floral, ácido, fermentado	+++
CF10	fermentado, frutal, fruta ácida, fruta podre, azedo	++++
CF11	fermentado, frutal, ácido, fruta podre, ruim, podre	+++
CF12	fermentado, ruim, podre, ácido	+++
CF13	fermentado, frutal, queimado, caramelo	+++
CF14	podre, azedo	++
CF15	ruim, fermentado	++
CF16	fermentado	++
CF17	fermentado, fruta podre, frutal	++
CF18	frutal, fruta ácida, azedo	+++
CF19	frutal, fermentado, ácido, fruta azeda, gordura	++++
CF20	frutal, ácido, fruta azeda, fermentado, carambola, café	++++
CF21	fermentado, ácido, fruta azeda	++
CF22	fermentado, podre	+++
CF23	frutal, ácido, fermentado	++
CF24	frutal, ácido, fermentado	++
CF25	frutal, ácido, fermentado, doce	++
CF26	fermentado, podre, ruim, azedo	++++

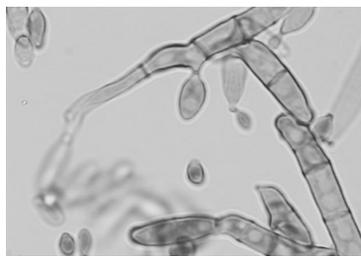
Foram selecionadas 15 linhagens segundo um painel não treinado de provadores, através da descrição dos aromas e das intensidades de aromas percebidos, de acordo com os dados da tabela 2.

Os microrganismos selecionados para produção de aromas foram **CS1, CS3, CS6, CS11, CS12, CS13, CS14, CS17, CS19, CS20, CF5, CF9, CF10, CF19, CF20**, provenientes do isolamento de flores, folhas e outras partes vegetais de calêndula (*Calendula officinallis* L.) seca (CS) e fresca (CF). Dentre estes, foram encontradas 6 linhagens de fungos, 1 de levedura e 8 de bactérias. Esses microrganismos apresentaram descritores de interesse como “floral”, “frutal” ou de alguma fruta específica como “carambola”, “acerola”, “laranja”, por exemplo, e com intensidades +++ a +++++, correspondente a “aroma intenso” a “aroma muito intenso”, de acordo com a tabela 1. A figura 9 apresenta a fotomicrografia dessas linhagens.

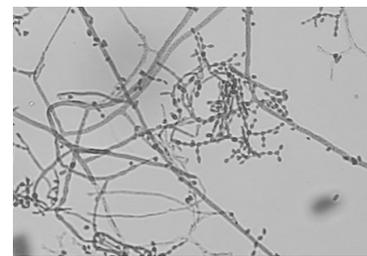
Para as linhagens de fungos, foram reconhecidos os gêneros por meio de taxonomia, realizado no Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos. Bactérias e leveduras serão posteriormente identificadas para depósito em coleção de cultura.



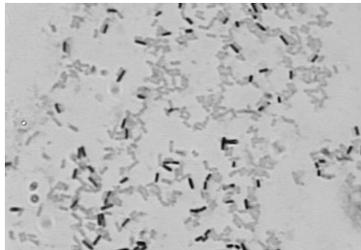
CS1 – Aumento 1000 X



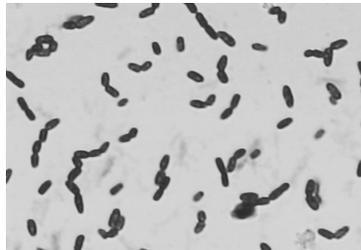
CS3 – *Cladosporium* sp.
Aumento 1000 X



CS6 – *Neurospora* sp.
Aumento 200 X



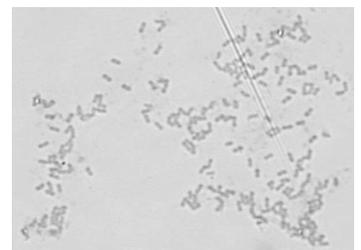
CS11 – Aumento 1000 X



CS12 – Aumento 1000 X



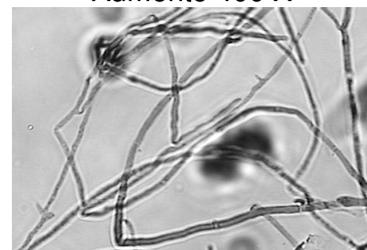
CS13 – *Penicillium* sp.
Aumento 400 X



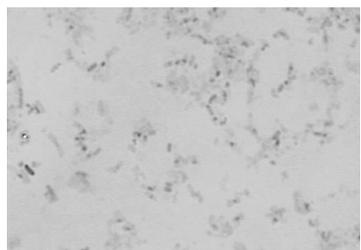
CS14 – Aumento 1000 X



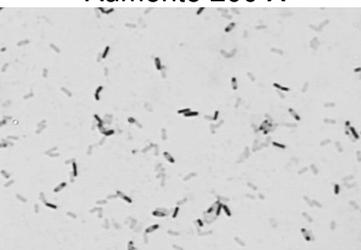
CS17 – *Rhizopus* sp.
Aumento 200 X



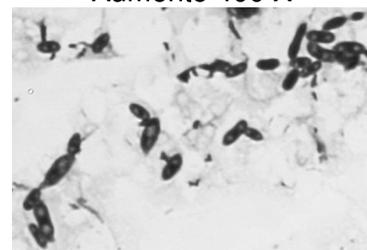
CS19 – *Fusarium* sp.
Aumento 400 X



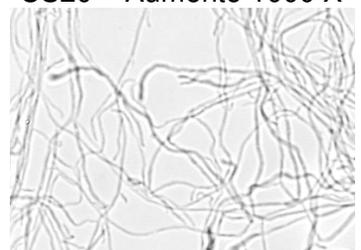
CS20 – Aumento 1000 X



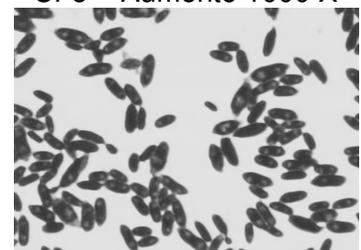
CF5 – Aumento 1000 X



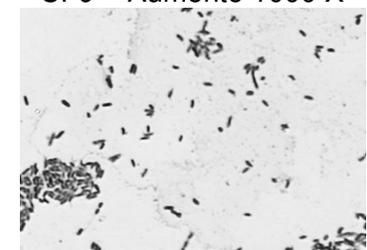
CF9 – Aumento 1000 X



CF10 – Aumento 1000 X



CF19 – *Aureobasidium pullulans* – Aumento 1000 X



CF20 – Aumento 1000 X

Figura 9. Fotomicrografia das linhagens selecionadas.

5.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMAS

As linhagens selecionadas como produtoras de aromas foram inoculadas em meio contendo β -caroteno. As amostras foram retiradas a cada 24 h, por um período de até 120 h, extraídas com éter:hexano 1:1 e concentradas com N_2 gasoso. Os extratos orgânicos foram analisados em um cromatógrafo gasoso Agilent modelo 7890 como descrito no item 4.5.

Os índices de Kovats calculados para os compostos estão apresentados na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Índice de Kovats calculados.

Composto	IK
Damascenona	1392
β -damascona	1424
α -ionona	1438
β -ionona	1496
Pseudoionona 1	1537
Pseudoionona 2	1594

A quantificação de β -damascona, β -ionona e pseudoionona 1 e 2 foram realizadas utilizando-se padrões autênticos.

As tabelas 4 a 33 apresentam os descritores e as intensidades de aromas e os valores obtidos para os compostos formados para cada uma das linhagens submetidas à fermentação sem e com pré-inóculo.

As figuras 10 a 39 mostram as concentrações dos compostos obtidos para cada uma das linhagens.

Tabela 4. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS1.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Frutal, ácido, banana	++	Fermentado, fruta azeda, podre	++
48	Frutal, doce, acetato de etila, ácido	+++	Frutal, fruta bem ácida, ácido	+++
72	Frutal, doce, solvente, acetato de etila	+++	Frutal, doce	++
96	Frutal, ácido, acetato de etila	+++	Frutal, azedo, fruta ácida	++
120	Frutal, ácido, acetato etila	+++	Fruta ácida, azedo, podre	++

Tabela 5. Compostos formados pela linhagem CS1.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	4,229	32,720	7,734	2,309
48	3,471	24,032	6,149	1,548
72	6,684	34,040	12,413	2,952
96	2,114	16,006	0,254	0,154
120	3,019	27,015	5,328	1,494
24 P	2,369	17,455	4,365	1,530
48 P	1,800	14,385	3,047	1,163
72 P	1,962	13,658	0,254	1,208
96 P	1,691	14,067	4,479	0,154
120 P	1,819	15,799	3,600	1,325

P: pré-inóculo.

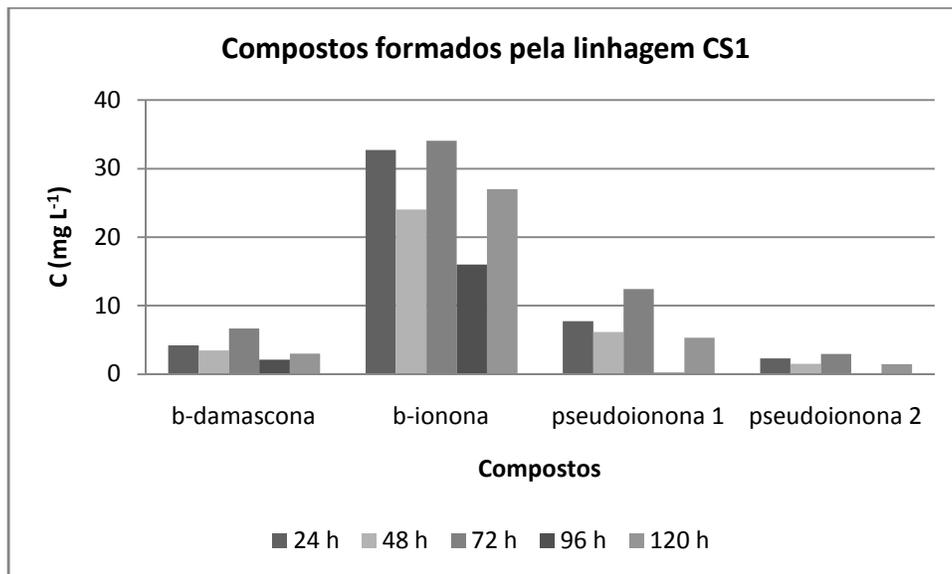


Figura 10. Compostos formados pela linhagem CS1, sem pré-inóculo.

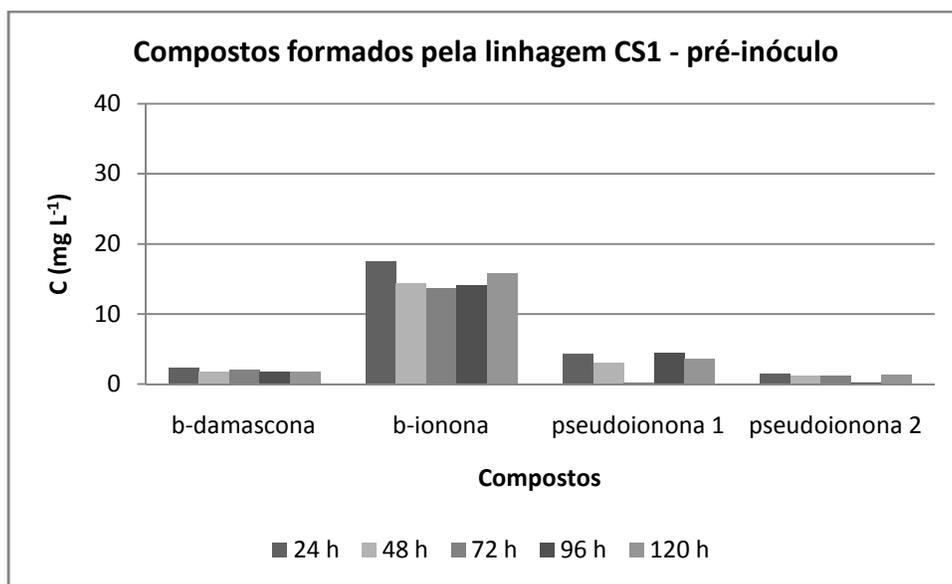


Figura 11. Compostos formados pela linhagem CS1, com pré-inóculo.

Tabela 6. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS3.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado, frutal	++	Fermentado	+
48	Fermentado, doce, frutal	++	Fermentado	+
72	Frutal, caramelo, mamão	++	Fermentado, pão	++
96	Frutal, fermentado	+	Floral	++
120	Frutal, ácido, acetato de etila, fruta ácida	+++	Pano úmido	+++

Tabela 7. Compostos formados pela linhagem CS3.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	1,238	16,324	1,393	0,154
48	1,523	12,381	2,641	0,154
72	1,308	11,585	2,507	0,782
96	0,831	5,767	1,271	0,469
120	0,719	3,110	1,069	0,358
24 P	0,959	8,206	1,693	0,664
48 P	0,854	5,084	1,296	0,411
72 P	0,610	5,512	1,155	0,360
96 P	0,431	1,397	0,376	0,340
120 P	0,513	1,556	0,502	0,321

P: pré-inóculo.

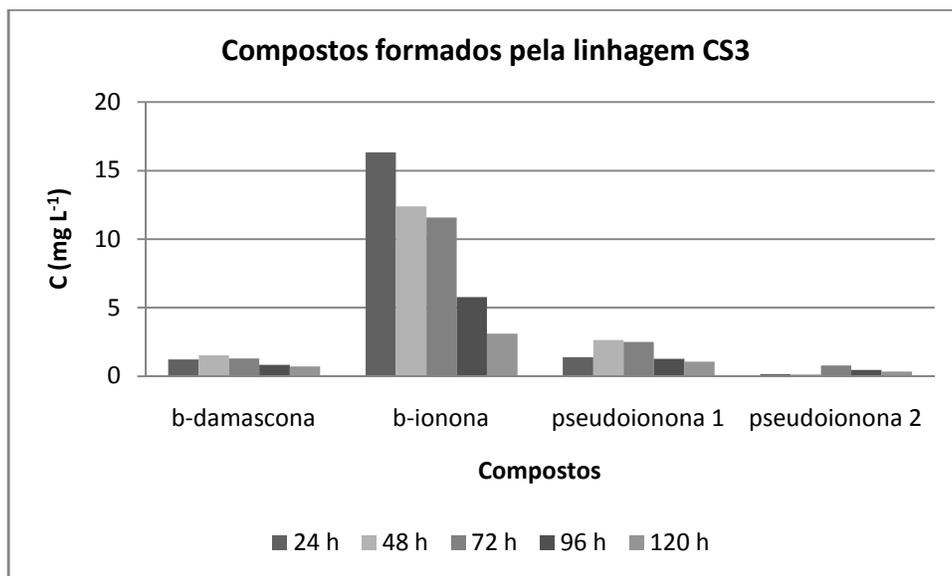


Figura 12. Compostos formados pela linhagem CS3, sem pré-inóculo.

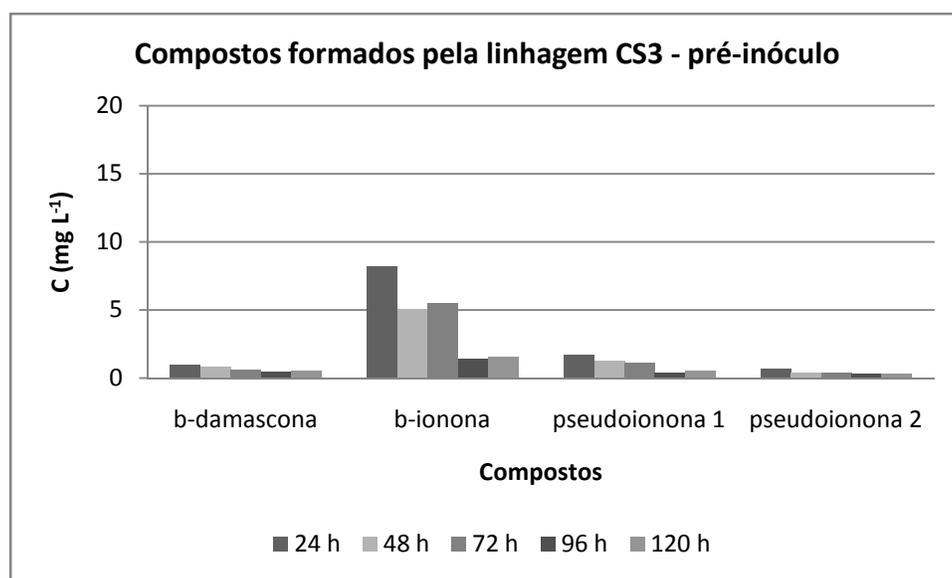


Figura 13. Compostos formados pela linhagem CS3, com pré-inóculo.

Tabela 8. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS6.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Carambola	++++	Frutal, doce, ácido	+++
48	Carambola	++++	Frutal, ácido, doce, morango	+++
72	Frutal, café torrado	+++	Champanhe, doce	+++
96	Doce, caramelo	+++	Champanhe, frutal, doce	+++
120	Doce, queimado, caramelo	+++	Frutal	++

Tabela 9. Compostos formados pela linhagem CS6.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	1,104	4,013	1,993	0,791
48	0,760	3,101	0,631	0,542
72	1,391	16,015	2,417	0,838
96	0,836	10,651	1,338	0,424
120	0,144	8,743	1,942	0,154
24 P	0,837	3,520	1,365	0,444
48 P	0,678	2,736	0,808	0,570
72 P	0,819	3,255	1,572	0,602
96 P	0,632	2,441	1,206	0,539
120 P	0,144	7,045	0,254	0,154

P: pré-inóculo.

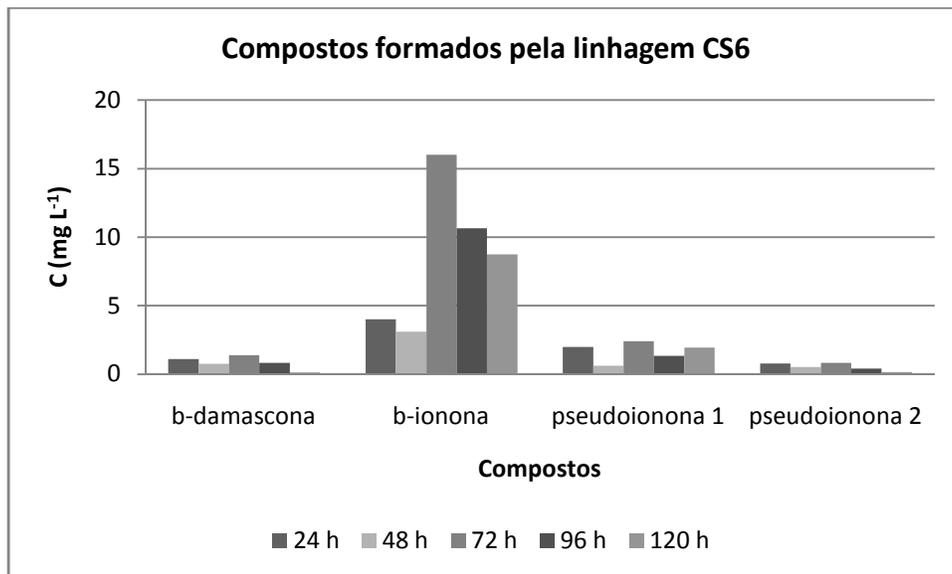


Figura 14. Compostos formados pela linhagem CS6, sem pré-inóculo.

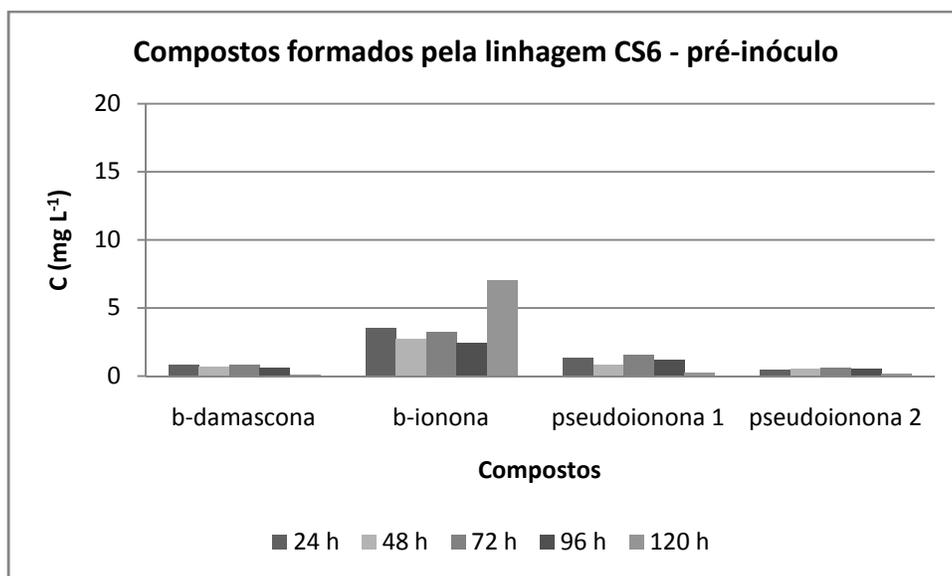


Figura 15. Compostos formados pela linhagem CS6, com pré-inóculo.

Tabela 10. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS11.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado, frutal	++	Fermentado, doce	++
48	Frutal, doce	++	Frutal, doce, ácido	++
72	Fruta podre, fermento	++	Fermentado	+
96	Frutal, ácido, fruta podre, fermentado	++	Frutal, doce, ácido, acetato de etila	++
120	Fermentado, doce	++	Frutal, doce, ácido, azedo	++

Tabela 11. Compostos formados pela linhagem CS11.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	2,210	18,239	3,547	1,238
48	2,504	18,202	4,759	1,413
72	2,117	20,908	3,904	1,515
96	1,892	16,801	3,150	1,235
120	1,959	25,347	4,638	1,798
24 P	2,575	13,663	5,292	1,550
48 P	1,902	18,098	3,244	0,790
72 P	1,902	13,088	2,987	1,109
96 P	1,731	14,922	2,484	0,963
120 P	3,881	27,061	6,745	1,676

P: pré-inóculo.

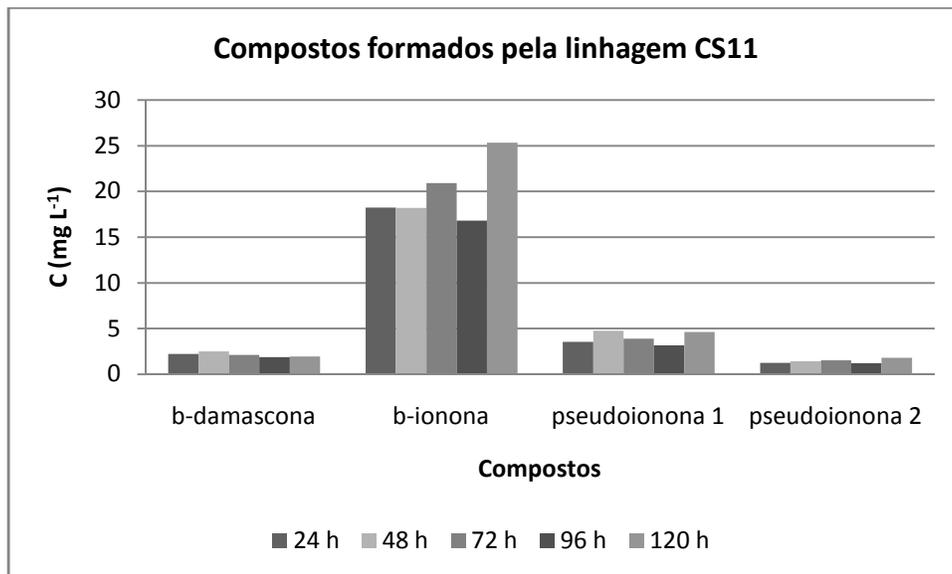


Figura 16. Compostos formados pela linhagem CS11, sem pré-inóculo.

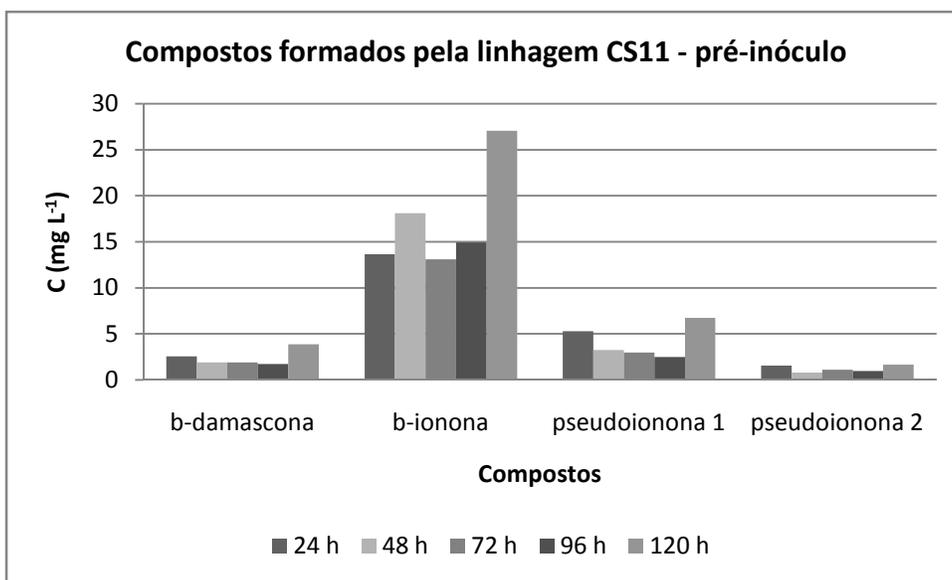


Figura 17. Compostos formados pela linhagem CS11, com pré-inóculo.

Tabela 12. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS12.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Banana	+++	Ácido, vinagre, solvente	+++
48	Frutal	++	Ácido, azedo, fruta passada, começando apodrecer	+++
72	Frutal, ácido, queijo	+++	Azedo, fruta podre	++
96	Frutal, acetato de etila, ácido	++	Ácido, azedo	++
120	Frutal, doce, ácido	++	Azedo, ácido, fruta podre	++

Tabela 13. Compostos formados pela linhagem CS12.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	2,847	18,596	4,432	1,544
48	1,012	12,690	4,101	1,362
72	115,667	4,210	3,249	1,679
96	107,200	7,262	4,070	1,361
120	158,042	7,200	3,197	1,187
24 P	97,715	19,776	5,291	1,693
48 P	169,166	9,858	3,549	1,314
72 P	163,202	10,337	3,391	1,311
96 P	176,727	12,047	3,750	1,327
120 P	207,849	19,273	5,427	1,586

P: pré-inóculo.

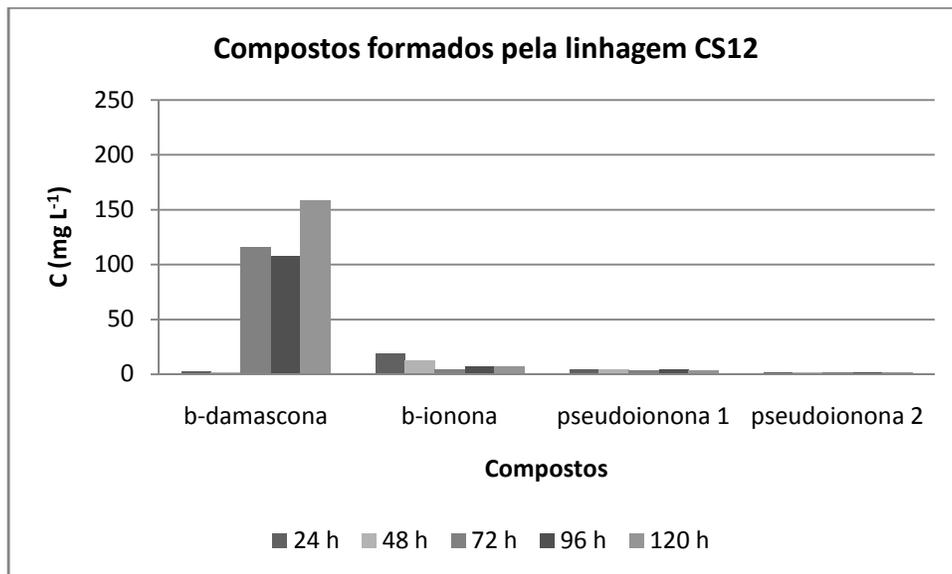


Figura 18. Compostos formados pela linhagem CS12, sem pré-inóculo.

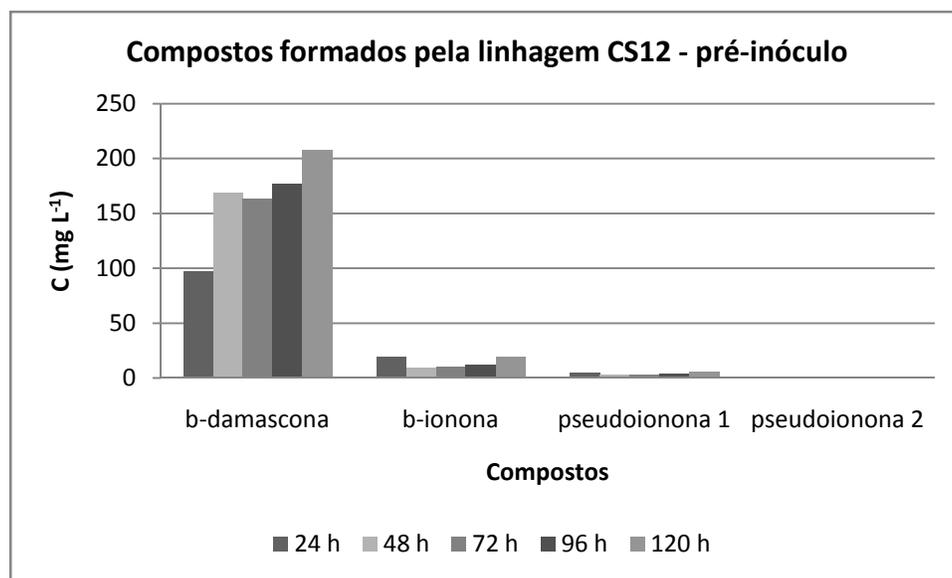


Figura 19. Compostos formados pela linhagem CS12, com pré-inóculo.

Tabela 14. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS13.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado	++	Fermentado, laranja	++
48	Fermentado	++	Poeira	+++
72	Frutal, mamão	++	Goiaba	+++
96	Frutal, doce, laranja, maçã	+++	Frutal	++
120	Café, queimado, doce	+++	Frutal, doce, ácido	++

Tabela 15. Compostos formados pela linhagem CS13.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	3,446	34,961	5,194	2,163
48	2,398	25,148	3,338	1,301
72	1,799	12,561	6,942	0,979
96	1,713	15,376	6,899	0,154
120	1,266	5,873	1,977	0,976
24 P	2,007	22,574	1,660	1,827
48 P	1,270	10,341	2,196	1,112
72 P	0,908	5,269	1,509	1,193
96 P	0,144	6,376	1,582	0,901
120 P	1,556	8,825	2,589	0,794

P: pré-inóculo.

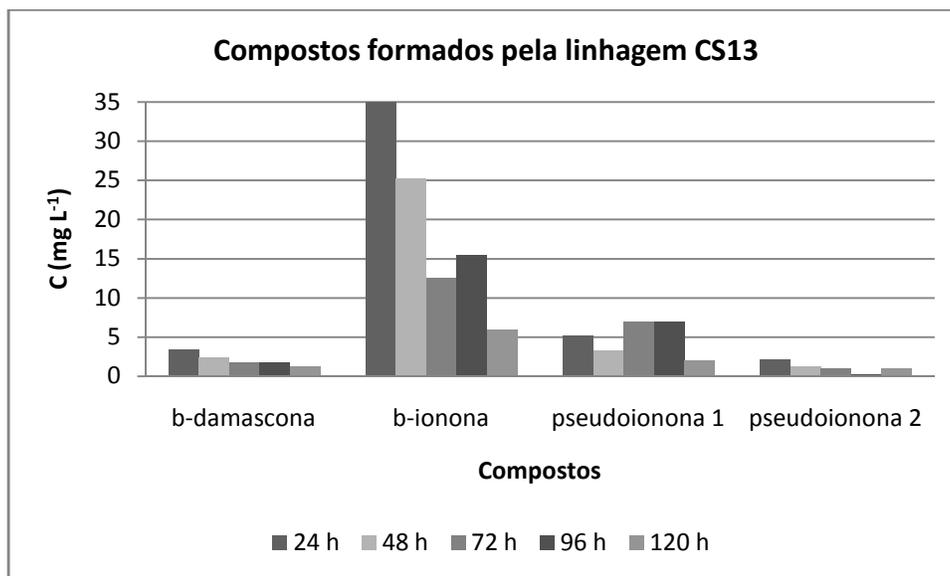


Figura 20. Compostos formados pela linhagem CS13, sem pré-inóculo.

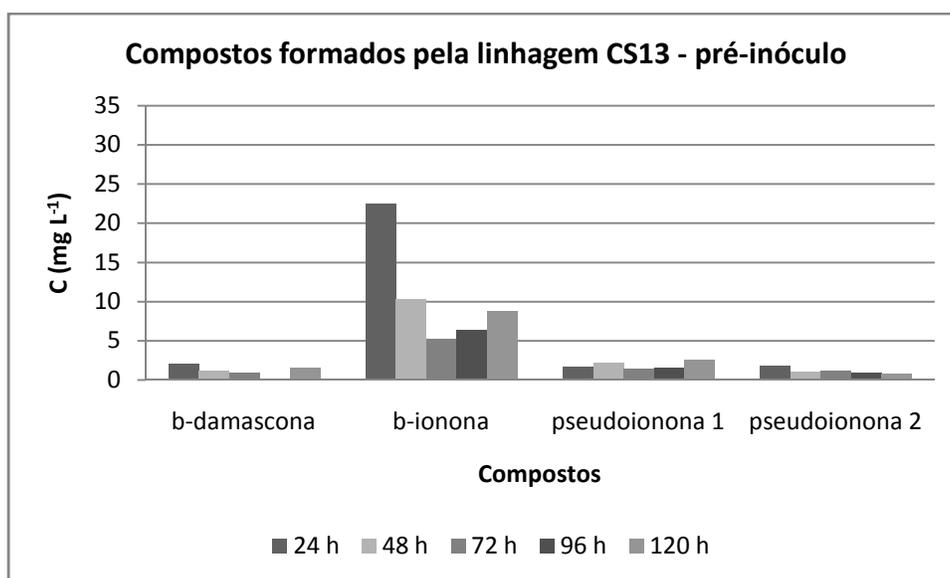


Figura 21. Compostos formados pela linhagem CS13, com pré-inóculo.

Tabela 16. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS14.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fruta podre, ácido	++	Frutal, doce, ácido, laranja	+++
48	Frutal	++	Frutal, fermentado, ácido, doce	+++
72	Solvente, mamão passado	+++	Frutal, doce, maçã, ácido	+++
96	Frutal, doce, ácido, laranja	+++	Fermentado, frutal, doce, ácido	+++
120	Laranja, chocolate	+++	Fermentado, pão, laranja	+++

Tabela 17. Compostos formados pela linhagem CS14.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	3,182	1,543	5,601	1,700
48	1,486	14,941	0,254	0,154
72	1,118	8,592	0,254	0,154
96	0,144	13,853	0,254	0,154
120	1,226	9,153	1,483	0,736
24 P	2,483	17,874	3,255	1,163
48 P	2,842	23,100	11,598	0,154
72 P	1,174	9,955	0,254	0,154
96 P	1,182	11,892	0,254	0,154
120 P	1,350	8,897	1,812	0,723

P: pré-inóculo.

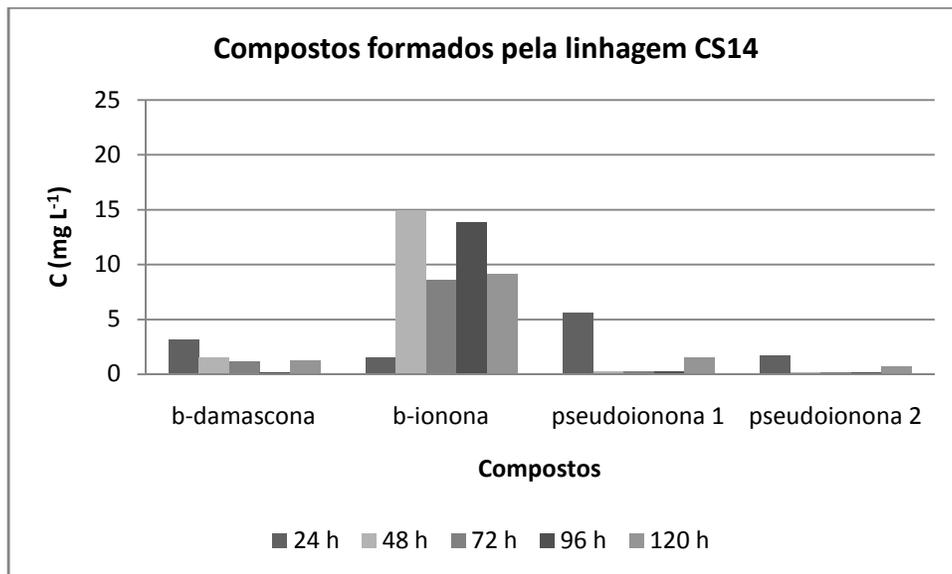


Figura 22. Compostos formados pela linhagem CS14, sem pré-inóculo.

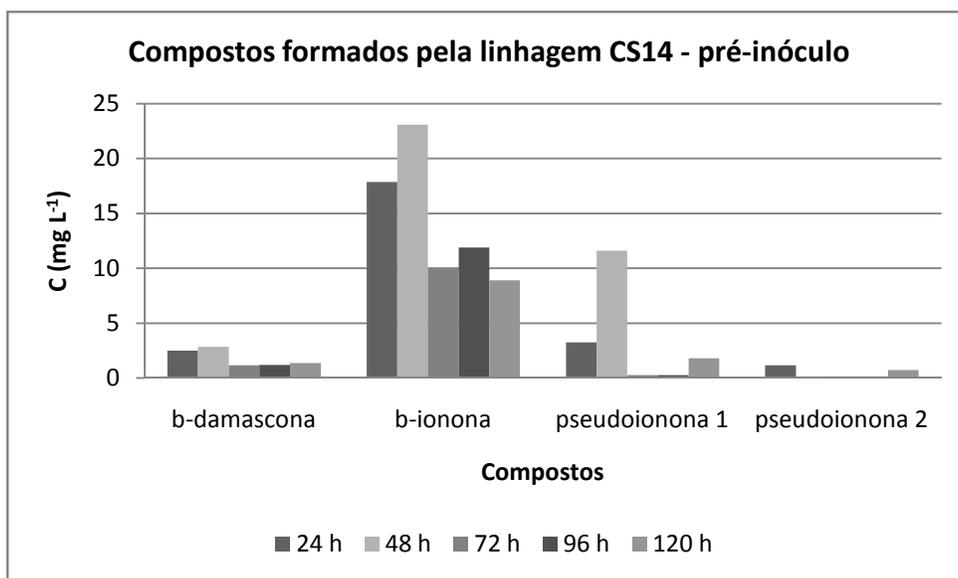


Figura 23. Compostos formados pela linhagem CS14, com pré-inóculo.

Tabela 18. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS17.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Frutal, banana	+++	Frutal, ácido, acetato de etila	++
48	Frutal, doce, ácido, acetato de etila	+++	Frutal, doce, ácido	++
72	Frutal, ácido, acetato de etila, solvente	+++	Frutal, doce, ácido, acetato de etila	++
96	Frutal, carambola, pinha, doce	+++	Frutal, doce, ácido, azedo	++
120	Frutal, doce, ácido, acetato etila	++	Frutal, ácido, acetato de etila	++

Tabela 19. Compostos formados pela linhagem CS17.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	3,182	19,217	5,689	0,154
48	1,883	13,254	6,711	0,154
72	1,673	12,131	2,628	0,952
96	1,431	6,463	2,978	1,008
120	1,380	5,593	1,675	0,662
24 P	2,210	18,090	4,198	1,387
48 P	1,252	8,738	0,254	0,921
72 P	1,414	11,180	0,254	1,023
96 P	1,681	5,341	2,451	0,973
120 P	1,539	10,753	0,254	0,154

P: pré-inóculo.

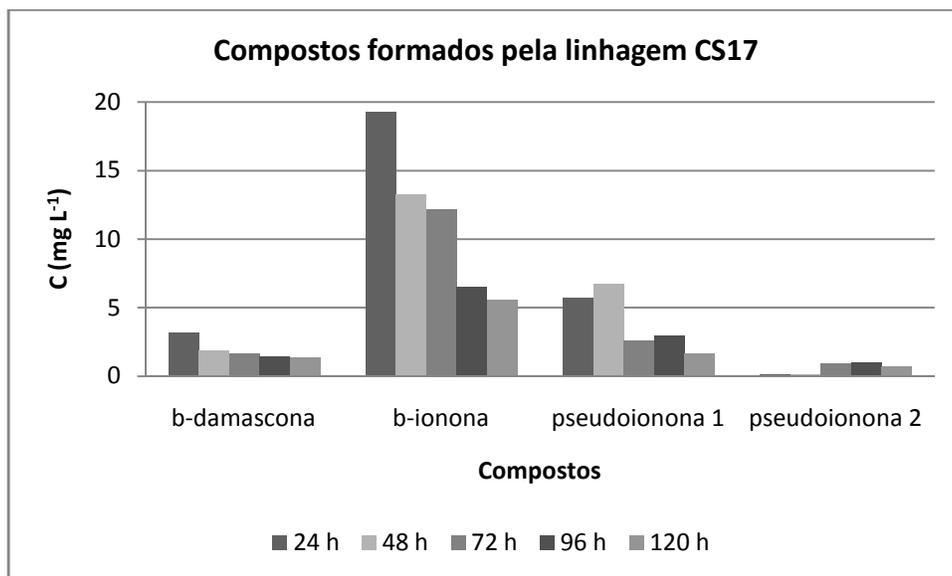


Figura 24. Compostos formados pela linhagem CS17, sem pré-inóculo.

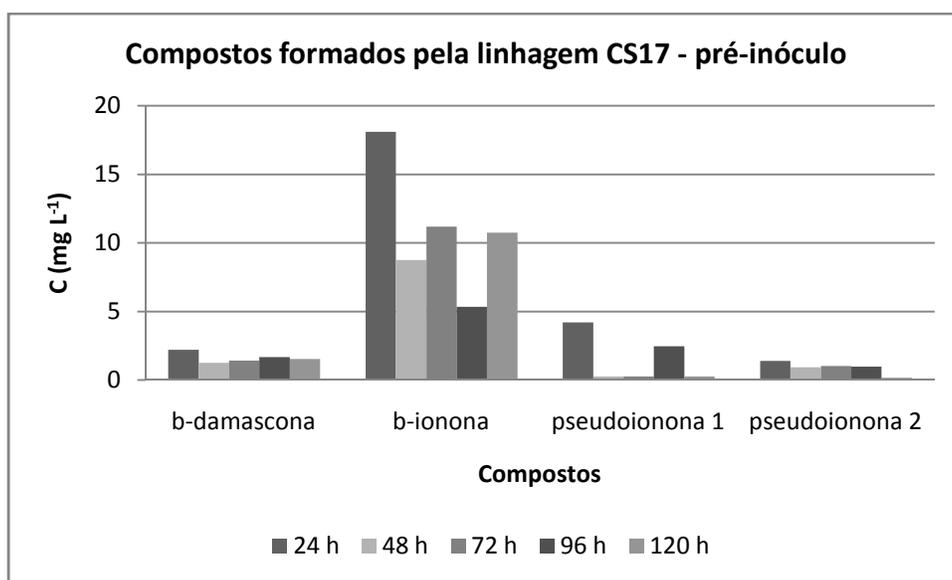


Figura 25. Compostos formados pela linhagem CS17, com pré-inóculo.

Tabela 20. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS19.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Cimento	++	Frutal, doce, ácido, acetato de etila	++
48	Frutal, ácido, doce, abacaxi, floral	+++	Frutal, doce, ácido, chá	+++
72	Frutal, doce, ácido, maçã verde, acetato de etila	+++	Frutal, fruta ácida, azedo, acetato de etila	+++
96	Frutal, doce, ácido	++	Frutal, doce, acetato de etila	+++
120	Frutal, abacaxi, ácido, acetato de etila	+++	Frutal, doce, fundo alcoólico	+++

Tabela 21. Compostos formados pela linhagem CS19.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)				
	damascenona	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	-	0,747	2,939	1,427	0,682
48	-	0,786	4,445	1,884	0,730
72	-	0,727	4,279	1,772	0,759
96	-	0,686	3,771	1,762	0,497
120	-	0,144	7,434	0,254	0,154
24 P	traços	1,984	8,082	2,906	0,773
48 P	traços	1,091	5,676	1,554	0,515
72 P	traços	1,176	5,473	2,072	0,800
96 P	traços	1,289	4,798	2,097	0,698
120 P	traços	1,167	4,730	1,671	0,722

(-): não detectado

P: pré-inóculo.

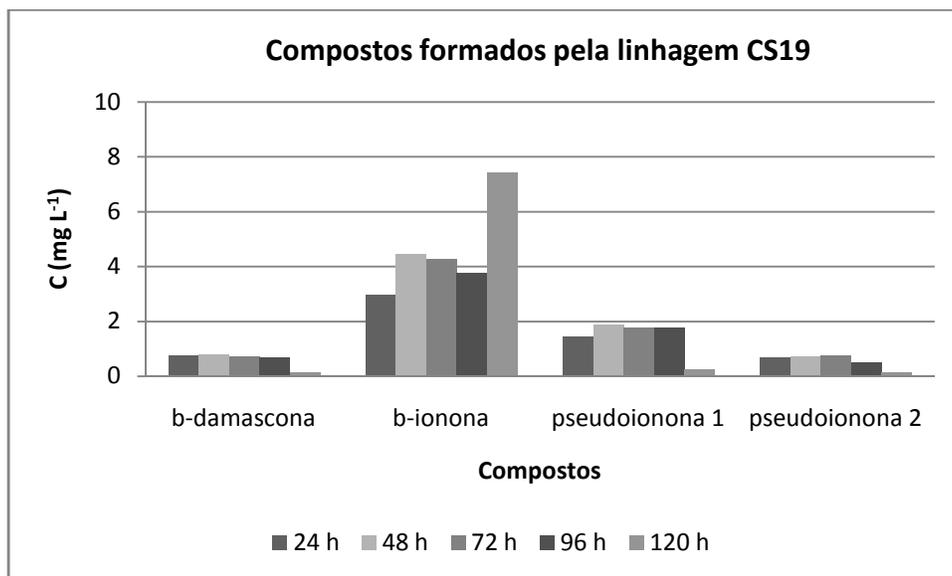


Figura 26. Compostos formados pela linhagem CS19, sem pré-inóculo.

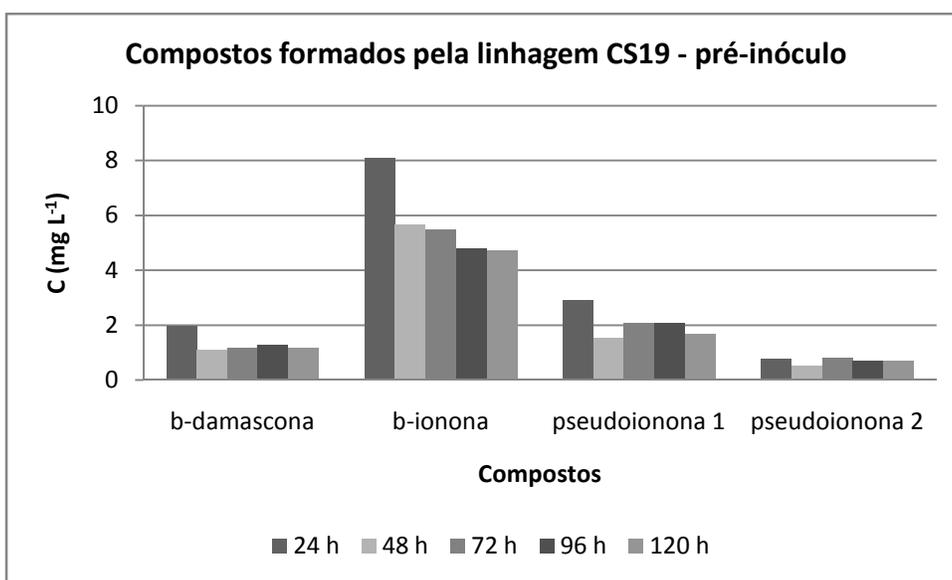


Figura 27. Compostos formados pela linhagem CS19, com pré-inóculo.

Tabela 22. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CS20.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado, frutal, doce, ácido	+++	Fermentado, fruta podre	++
48	Fermentado, frutal, doce	+++	Fruta azeda, podre	+++
72	Fermentado, frutal, doce	+++	Doce ao fundo, pano úmido	+++
96	Fermentado, frutal, doce	+	Fermentado, laranja	++
120	Fermentado, frutal	+	Fermentado	+

Tabela 23. Compostos formados pela linhagem CS20.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	2,663	25,786	5,221	1,807
48	2,198	14,015	3,332	0,937
72	1,494	14,361	0,254	0,154
96	2,624	16,684	4,705	1,416
120	1,581	10,585	2,938	1,038
24 P	2,567	19,399	4,594	1,364
48 P	2,052	19,001	3,530	1,332
72 P	0,848	14,047	1,520	0,842
96 P	1,860	12,065	2,152	0,651
120 P	2,523	16,944	3,562	1,578

P: pré-inóculo.

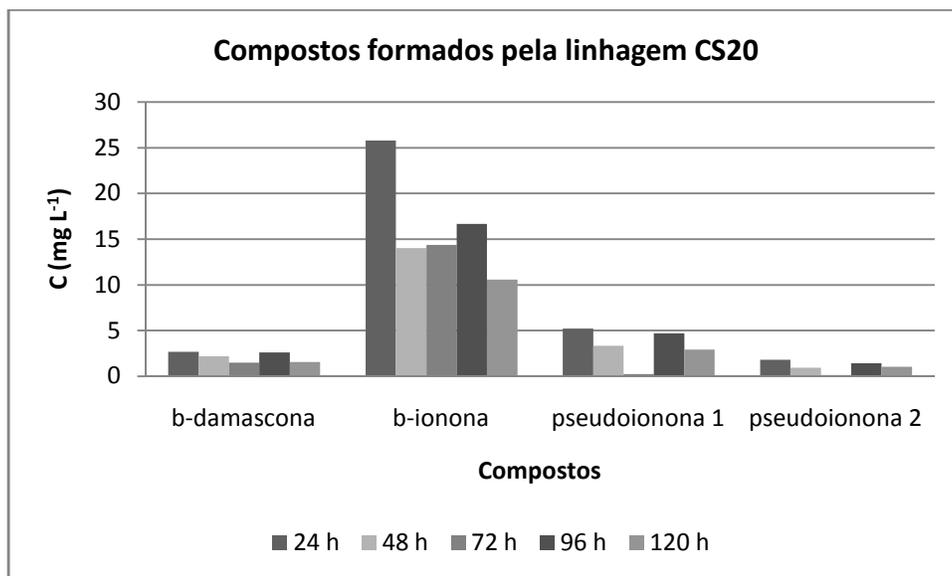


Figura 28. Compostos formados pela linhagem CS20, sem pré-inóculo.

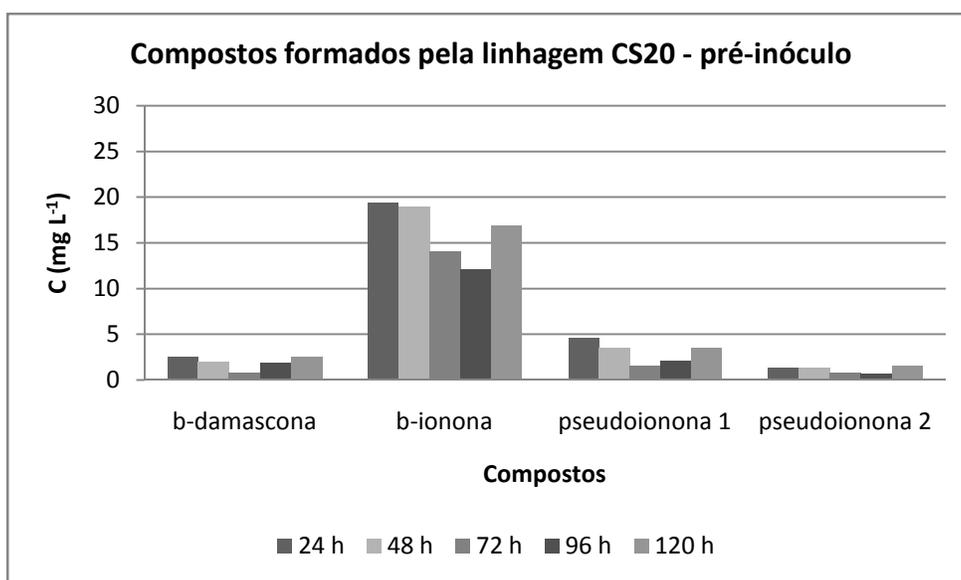


Figura 29. Compostos formados pela linhagem CS20, com pré-inóculo.

Tabela 24. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF5.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado	+	Fermentado, pano úmido	+++
48	Frutal, doce, ácido	++	Frutal, doce, chá	+++
72	Frutal, doce, ácido, solvente	++	Frutal, doce, ácido	++
96	Frutal, laranja	++	Verde	+++
120	Guaiacol, degradante, medicamento,	+++	Ruim, podre, ácido, pano úmido	++++

Tabela 25. Compostos formados pela linhagem CF5.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	1,248	8,496	2,186	0,815
48	1,202	8,466	2,458	0,946
72	0,144	5,643	1,507	0,659
96	0,955	4,600	1,704	0,483
120	1,295	10,518	2,501	0,922
24 P	1,063	4,456	2,250	0,881
48 P	0,767	3,497	1,548	0,715
72 P	1,269	6,001	2,370	0,724
96 P	1,357	5,818	2,704	0,154
120 P	1,076	4,125	1,830	1,228

P: pré-inóculo.

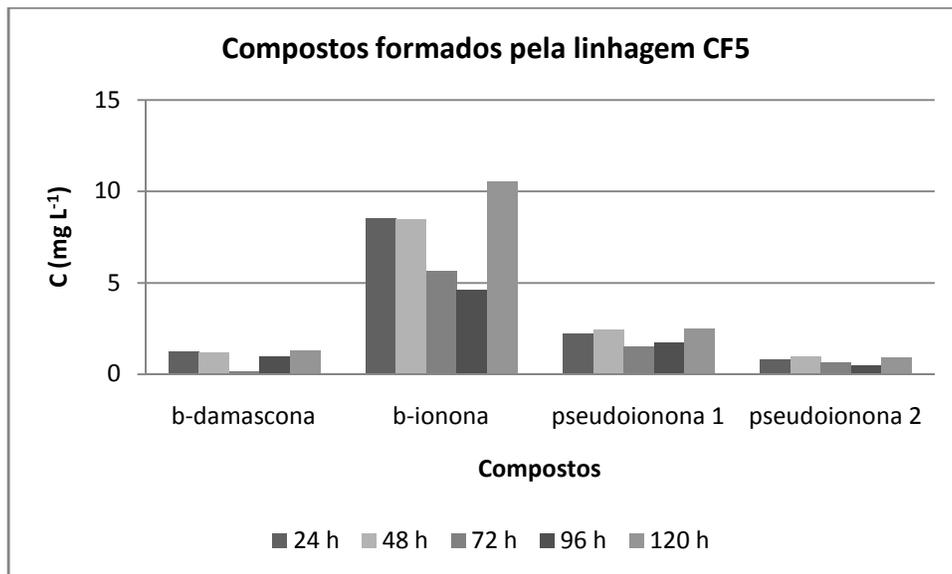


Figura 30. Compostos formados pela linhagem CF5, sem pré-inóculo.

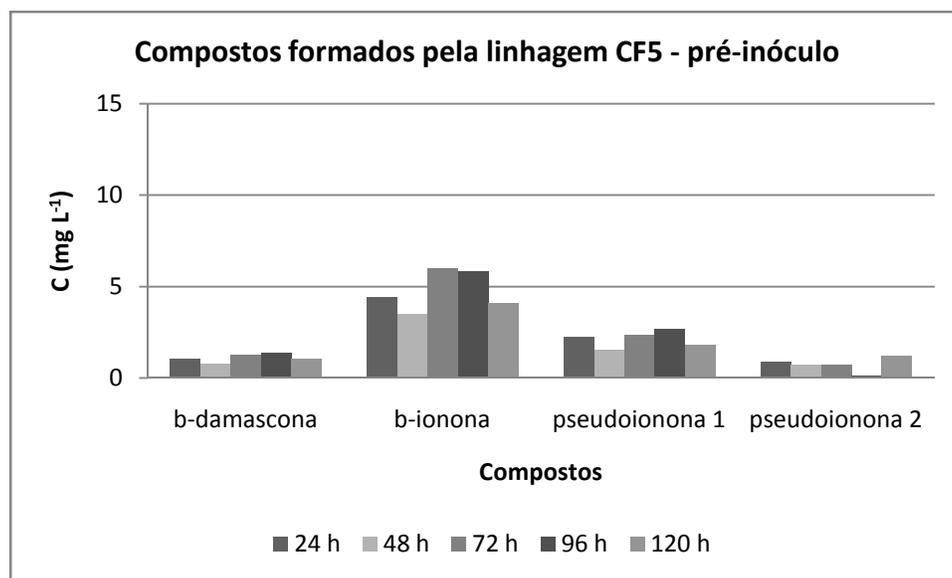


Figura 31. Compostos formados pela linhagem CF5, com pré-inóculo.

Tabela 26. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF9.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado, frutal, laranja	++	Fermentado, frutal, doce, pano úmido	+++
48	Fermentado, frutal, doce, ácido	++	Fermentado, frutal, doce	+++
72	Fermento, laranja	++	Fermentado, frutal	+++
96	Fermentado, frutal	+	Fermentado	+
120	Fermentado, frutal	+	Fermentado	+

Tabela 27. Compostos formados pela linhagem CF9.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)				
	damascenona	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	traços	2,645	20,928	4,809	1,855
48	traços	2,386	27,753	4,730	1,819
72	traços	2,741	25,348	4,095	1,212
96	traços	2,201	20,061	3,931	1,809
120	traços	2,385	22,262	4,655	2,238
24 P	traços	3,924	42,403	6,457	2,451
48 P	traços	3,235	28,145	7,852	2,439
72 P	traços	2,928	23,160	5,110	2,043
96 P	traços	2,607	25,755	6,455	2,348
120 P	traços	2,588	26,974	2,764	1,290

P: pré-inóculo.

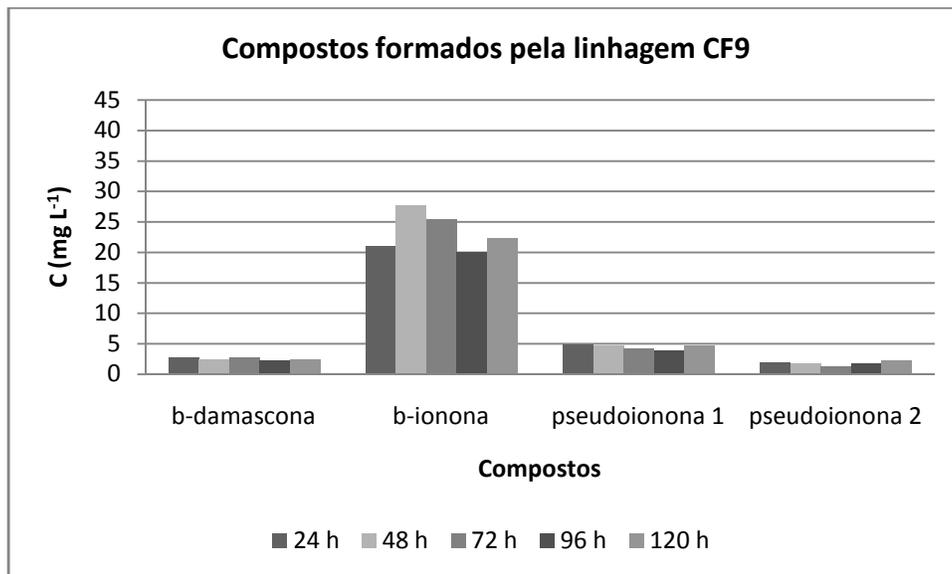


Figura 32. Compostos formados pela linhagem CF9, sem pré-inóculo.

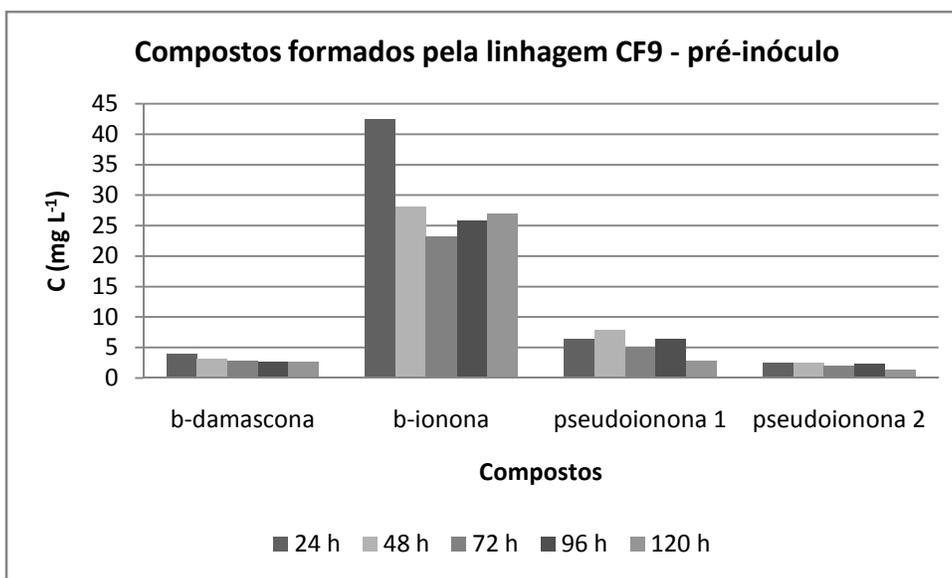


Figura 33. Compostos formados pela linhagem CF9, com pré-inóculo.

Tabela 28. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF10.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Laranja, frutal	++	Fruta podre, ruim, azedo	+++
48	Fermentado, frutal	+	Frutal, pano molhado	+++
72	Fermentado, doce	+	Fermentado, laranja	++
96	Fermentado, frutal	+	Fermentado, ruim, podre	+++
120	Fermentado, frutal, doce	++	Frutal, ácido, alcoólico	+++

Tabela 29. Compostos formados pela linhagem CF10.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	0,987	8,162	1,593	0,500
48	1,114	8,034	2,114	0,834
72	1,348	9,482	2,568	0,824
96	1,030	8,516	1,988	0,811
120	1,390	11,827	0,254	0,154
24 P	1,845	14,651	3,351	1,014
48 P	0,144	10,206	1,689	0,869
72 P	2,280	12,942	3,348	0,865
96 P	1,624	10,075	2,285	0,726
120 P	0,993	9,107	0,254	0,736

P: pré-inóculo.

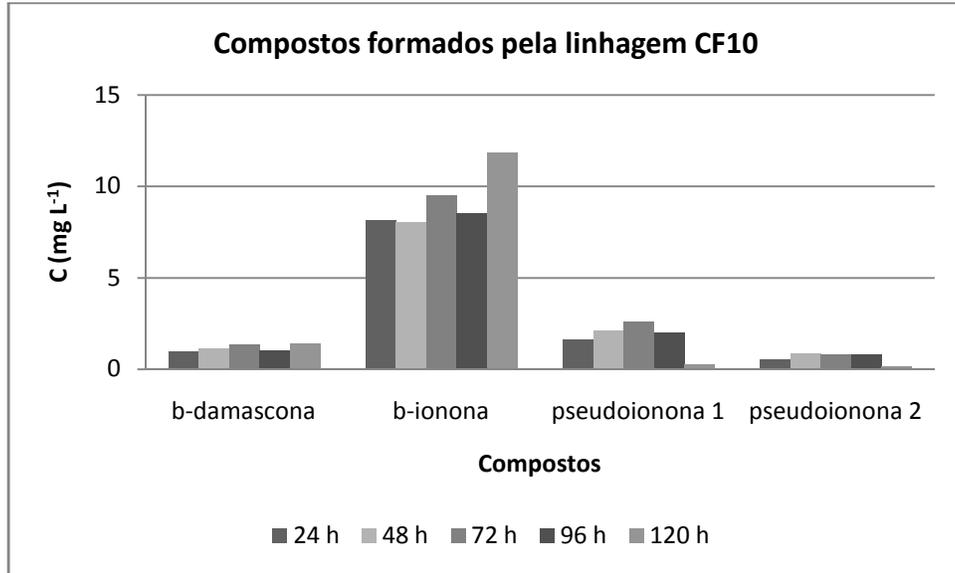


Figura 34. Compostos formados pela linhagem CF10, sem pré-inóculo.

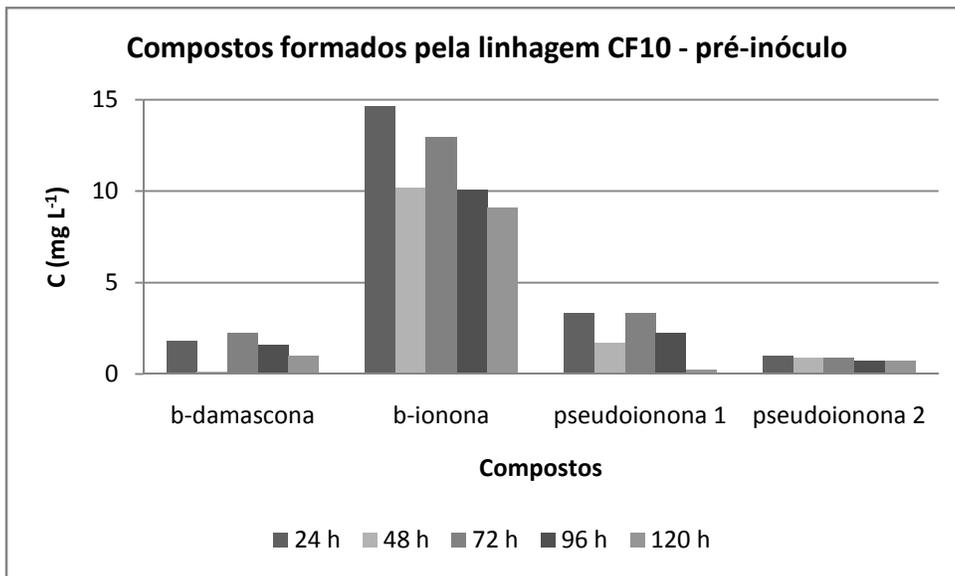


Figura 35. Compostos formados pela linhagem CF10, com pré-inóculo.

Tabela 30. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF19.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Frutal, sabão, ácido	++++	Sabão, coco, ranço	+++
48	Coco, sabão, acetato de etila, frutal	++++	Sabão, coco	+++
72	Frutal, doce, acetato de etila	+++	Frutal, doce, ácido, morango	+++
96	Frutal, doce, acetato de etila	+++	Doce, frutal	++++
120	Frutal, doce, ácido, acetato de etila, fruta ácida	++	Frutal, alcoólico, doce	+++

Tabela 31. Compostos formados pela linhagem CF19.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	1,986	11,171	2,736	0,937
48	1,553	10,206	2,728	1,237
72	1,770	10,143	2,833	0,954
96	1,158	12,720	2,040	0,656
120	2,017	14,322	3,740	1,491
24 P	1,721	7,357	3,027	1,250
48 P	3,785	16,135	6,217	1,485
72 P	1,442	8,587	2,202	0,732
96 P	2,068	7,235	2,395	0,738
120 P	1,640	6,975	2,831	1,171

P: pré-inóculo.

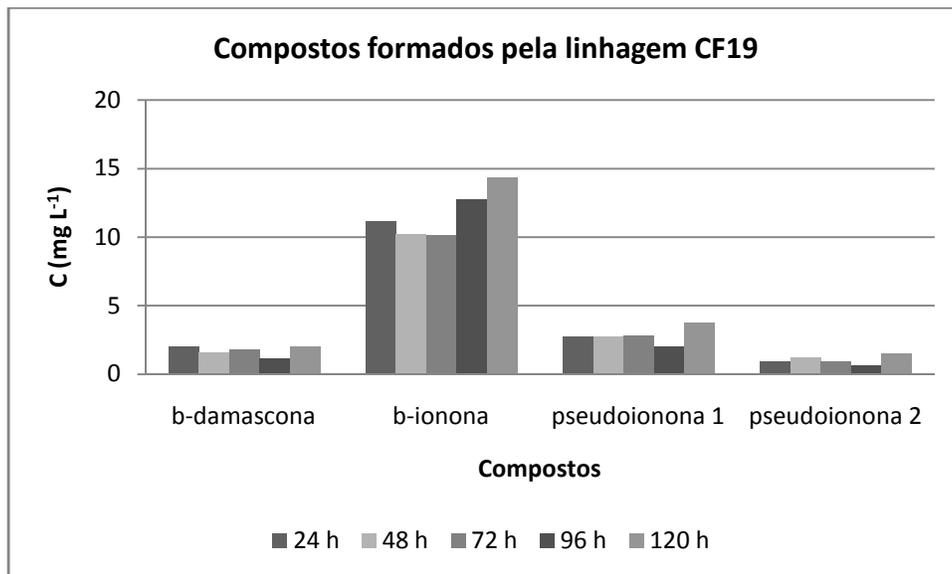


Figura 36. Compostos formados pela linhagem CF19, sem pré-inóculo.

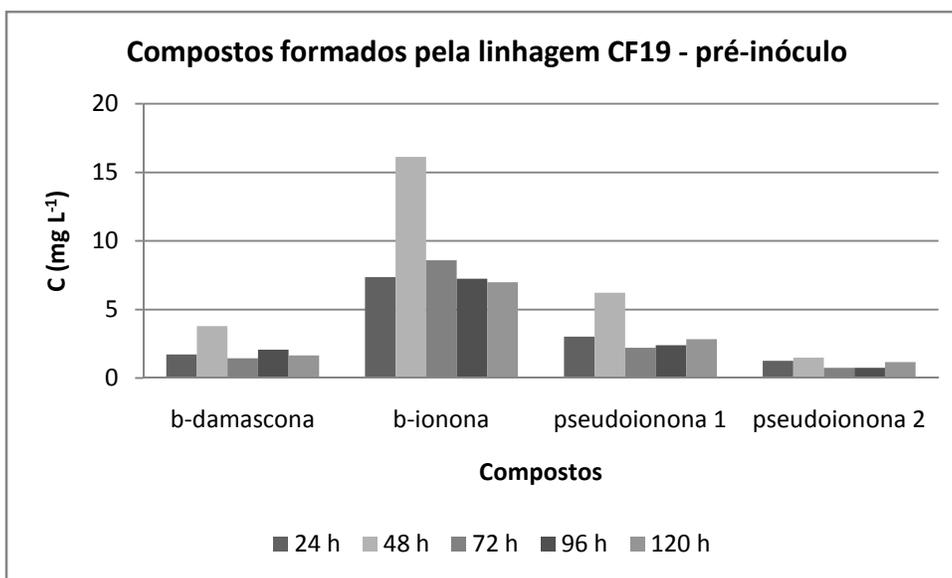


Figura 37. Compostos formados pela linhagem CF19, com pré-inóculo.

Tabela 32. Descritores e intensidades de aromas formados pela linhagem CF20.

Tempo de fermentação (h)	Sem pré-inóculo		Pré-inóculo	
	Descritor	Intensidade	Descritor	Intensidade
24	Fermentado, frutal	++	Fermentado, pano molhado	+++
48	Fermentado, frutal	+	Fermentado, fruta ácida	++
72	Fermentado, doce	+	Fermentado, frutal	+
96	Fermentado, frutal, doce, ácido	++	Fermentado, frutal	+
120	Fermentado, frutal, doce, ácido	+++	Fermentado	++

Tabela 33. Compostos formados pela linhagem CF20.

Tempo de fermentação (h)	Concentração (mg L ⁻¹)			
	β -damascona	β -ionona	pseudoionona 1	pseudoionona 2
24	2,062	18,376	3,803	1,411
48	1,769	13,471	2,592	0,856
72	2,035	19,927	3,191	1,186
96	2,154	23,849	5,367	1,569
120	2,882	27,667	7,239	1,418
24 P	3,136	29,619	6,032	1,930
48 P	2,450	23,223	4,018	1,361
72 P	2,312	13,240	3,077	0,892
96 P	2,032	15,126	3,275	1,239
120 P	1,675	19,852	3,155	0,154

P: pré-inóculo.

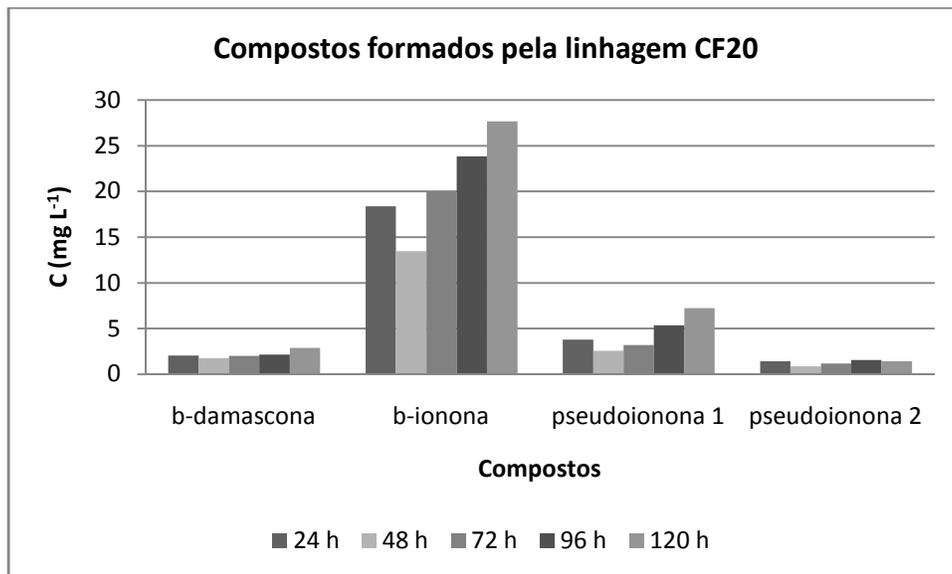


Figura 38. Compostos formados pela linhagem CF20, sem pré-inóculo.

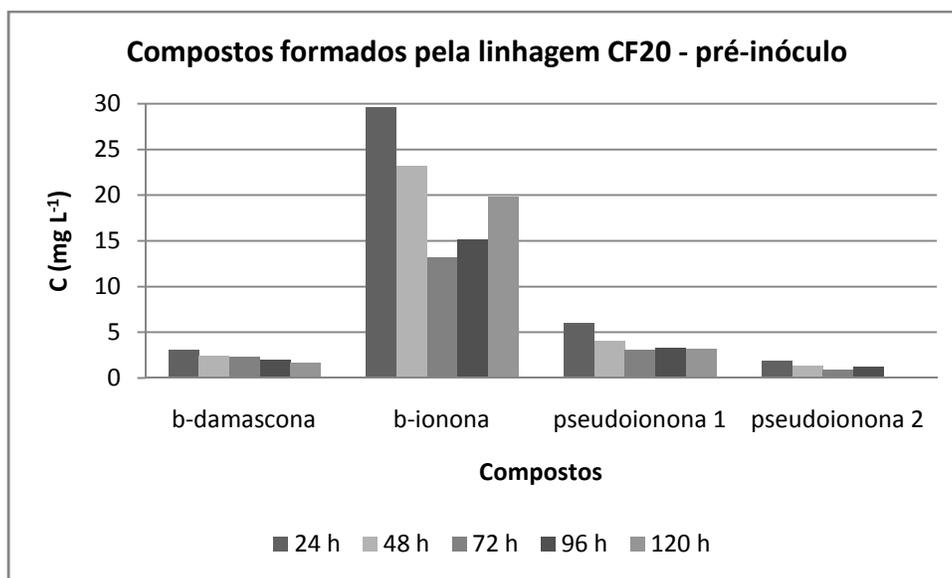


Figura 39. Compostos formados pela linhagem CF20, com pré-inóculo.

As linhagens CS1, CS3 (*Cladosporium* sp.), CS6 (*Neurospora* sp.), CS11, CS13 (*Penicillium* sp.), CS17 (*Rhizopus* sp.), CF5 e CF19 (*Aureobasidium pullulans*) produziram uma concentração maior de metabólitos quando cultivadas sem pré-inóculo. A adição de β -caroteno nas culturas com pré-inóculo, após certo desenvolvimento microbiano, pode ter sido danosa aos microrganismos, prejudicando o desenvolvimento das linhagens, inibindo crescimento e diminuindo a produção dos compostos.

Os microrganismos CS12, CS14, CS19 (*Fusarium* sp.), CF9 e CF10 apresentaram uma concentração de compostos maior nas culturas com pré-inóculo. Possivelmente por apresentar uma massa celular maior que nas culturas sem pré-inóculo, facilitando a degradação de β -caroteno e a produção de metabólitos.

As linhagens CS20 e CF20 não apresentaram diferença entre as culturas sem e com pré-inóculo.

Foi observada uma tendência em formar os compostos de aromas de interesse nas primeiras 48 h de fermentação, havendo um declínio na concentração após esse período devido ao consumo do substrato ou a presença dos metabólitos pode ter sido prejudicial para o desenvolvimento dos microrganismos dificultando a síntese de novos compostos.

As variações nas concentrações dos compostos de aromas durante o período fermentativo pode ter sido ocasionada por perdas durante a manipulação das amostras como nas etapas de extração e concentração e também pode ter

sido ocasionada pela presença dos metabólitos que poderiam ter prejudicado o desenvolvimento microbiano inibindo a produção dos mesmos. Rodríguez-Bustamante et al. (2006) observaram que a β -ionona inibia o crescimento celular de *Trichosporon asahii*, comprometendo a formação de aroma. A inibição de crescimento foi superada utilizando-se materiais adsorventes no sistema que permitiram a remoção dos produtos do meio de cultivo, favorecendo a produção de β -ionona.

β -ionona é o principal produto de degradação de β -caroteno (Lutz & Winterhalter, 1992b; Kotseridis et al., 1999; Crouzet et al., 2002; Krammer et al., 2002; Waché et al., 2002a; Fleischmann et al., 2003; Zorn et al., 2003c, 2003d; Nornier et al., 2004; Ibdah et al., 2006; Tieman et al., 2006) e o principal composto formado nos experimentos realizados, presente em maiores concentrações, nos meios sem e com pré-inóculo, por todas as linhagens exceto para a CS12.

Para as cepas cultivadas sem pré-inóculo, as linhagens CS1 e CS13 (*Penicillium* sp.) apresentaram as maiores concentrações do composto em 120 h de fermentação, 34,040 e 34,961 mg L⁻¹, respectivamente. Os microrganismos CS11, CS20, CF9 e CF20 apresentaram concentração de β -ionona ao redor de 25 mg L⁻¹ com período de fermentação variando de 24 a 120 h.

Para os microrganismos cultivados com pré-inóculo, a linhagem CF9 apresentou 42,403 mg L⁻¹ de β -ionona em 24 h de fermentação. As cepas CS11, CS12, CS13 (*Penicillium* sp.), CS14, CS20 e CF20 apresentaram, em média, 25 mg L⁻¹ de β -ionona com período de fermentação variando de 24 a 120 h.

As concentrações de β -ionona produzidas pelas linhagens durante o processo fermentativo foram semelhantes aos relatados em literatura por alguns autores.

Sánchez-Contreras et al. (2000) observaram uma produção máxima de 8 mg L⁻¹ de compostos de aromas (cerca de 1 mg L⁻¹ de β -ionona) em 48 h de fermentação por uma cultura mista composta de *Bacillus* sp. e *Geotrichum* sp., permanecendo constante até 120 h de fermentação.

Maldonado-Robledo et al. (2003) obtiveram uma concentração máxima de β -ionona produzida por *Geotrichum* sp. de 4,5 mg L⁻¹ em 48 h de incubação, que permaneceu constante até o final do período fermentativo (96 h). Uma cultura mista formada por *Bacillus* sp. e *Geotrichum* sp. produziu 2 mg L⁻¹ do composto em 24 h de fermentação, com declínio de concentração até o final do período fermentativo.

Rodríguez-Bustamante et al. (2006) analisaram a produção de β -ionona por *Tricosporon asahii* utilizando-se materiais adsorventes. Foram obtidos 327 μ M (63 mg L⁻¹) e 73 μ M (14 mg L⁻¹) do composto quando utilizado silicato de MCM-41 e sílica gel comercial, respectivamente, em 48 h de fermentação.

Pseudoionona (6,10-dimetil-3,5,9-undecatrien-2-ona) foi formada por todas as linhagens e em baixas concentrações.

Segundo Simkin et al. (2004), β -ionona e pseudoionona pertencem ao grupo de voláteis terpenóides originados da clivagem de carotenóides, geralmente

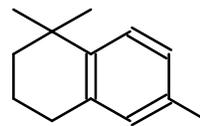
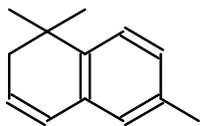
presentes em baixas concentrações mas com fortes efeitos na apreciação global humana como, por exemplo, no aroma de tomate, cenoura, marmelo e carambola.

Damascenona foi formada apenas em quantidades traço pelas linhagens CS19 (*Fusarium* sp.) e CF9. Este composto é produzido comercialmente para as indústrias de aromas e fragrâncias e pode ser formado na natureza pela clivagem de carotenóides, principalmente neoxantina (Sefton et al., 1989; Skouroumounis et al., 1995; Kotseridis et al., 1998; Puglisi et al., 2001; Baumes et al., 2002; Maldonado-Robledo et al., 2003; Ferreira et al., 2008). Presente em vinhos, atinge a concentração máxima em até um ano de envelhecimento (Crouzet et al., 2002; Versini et al., 2002; Skouroumounis & Sefton, 2002; Winterhalter & Rouseff, 2002).

β -Damascona também foi produzido em baixas concentrações por todas as linhagens, exceto pela CS12. Esse composto pode ser obtido por degradação de carotenóides, por mecanismo semelhante ao da β -damascenona (Crouteau & Karp, 1994).

Pseudoionona, damascenona e β -damascona não foram detectados nos controles das amostras. Concentrações inferiores a 1 mg L^{-1} foram detectadas para a β -ionona que foram devidamente subtraídas das respectivas concentrações obtidas para cada tempo de cada um dos microrganismos estudados.

De acordo com os espectros de massas obtidos, foi formado TTN – 1,1,6-trimetil-1,2,3,4-tetraidronaftaleno, um composto muito semelhante ao TDN – 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (figura 40).



TDN – 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno TTN – 1,1,6-trimetil-1,2,3,4-tetraidronaftaleno

Figura 40. TDN e TTN (Schneider et al., 2001; Sommemburg et al., 2003; Ferreira & de Pinho, 2004).

TTN e TDN ocorrem em vinhos, não estão presentes nas uvas, mas são formados durante o envelhecimento na garrafa. TDN está relacionado com a degradação oxidativa de vinhos e pode ser formado a partir da degradação direta de β -caroteno (Strauss et al., 1986; Winterhalter, 1991; Schneider et al., 2001; Marais, 2002; Ferreira & de Pinho, 2004; Ferreira et al., 2008).

A quantificação de TTN não foi possível devido à ausência de padrão.

Outros compostos formados detectados por espectrometria de massas foram hidrocarbonetos ramificados – apocarotenóides, cuja identificação não foi possível pela ausência dos espectros nas bibliotecas e pela ausência de padrões autênticos; porém, pelo perfil do espectro foi possível relacioná-los a esses tipos de compostos. Esses terpenóides irregulares foram obtidos, provavelmente, pela clivagem na parte central do β -caroteno (figura 41) (Enzell, 1985; Lutz & Winterhalter, 1992a, 1992b; Giuliano et al., 2003; Sommemburg et al., 2003; Aldridge et al., 2006).

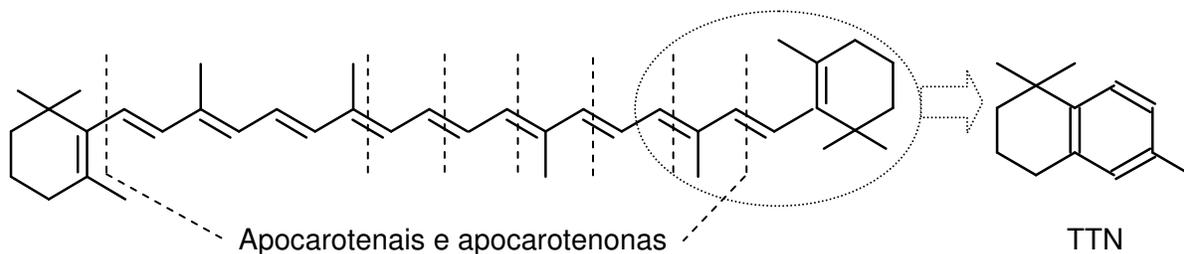


Figura 41. Rotas possíveis para a formação de apocarotenóides e TTN a partir de β -caroteno (Enzell, 1985; Lutz & Winterhalter, 1992a, 1992b; Sommemburg et al., 2003).

Apocarotenóides compreendem compostos de aromas norisoprenóides, muito bem distribuídos na natureza, cuja variedade resulta da diversidade de carotenóides precursores e da diversidade de sítios de clivagem e subseqüentes modificações (Schwartz et al., 2001; Ibdah et al., 2006).

Outros compostos norisoprenóides como epóxi- β -ionona, hidróxi- β -ionona, diidroactinidiolida, safranal, β -ciclocitral, ionóis, podem ter sido formados em baixíssimas concentrações, não sendo possível detectá-los, ou, se detectados, não foi possível identificá-los por ausência de padrões ou por seus espectros de massas não estarem presentes nas bibliotecas.

A produção de outros compostos de aromas pode ser influenciada pela concentração inicial de β -caroteno, glicose e extrato de levedura e pela presença de outros substratos como luteína, zeaxantina e neoxantina no meio de cultura. Todos esses fatores poderão ser estudados futuramente.

6 CONCLUSÕES

As linhagens CS1, CS3 (*Cladosporium* sp.), CS6 (*Neurospora* sp.), CS11, CS13 (*Penicillium* sp.), CS17 (*Rhizopus* sp.), CF5 e CF19 (*Aureobasidium pullulans*) produziram uma concentração maior de metabólitos quando cultivadas sem pré-inóculo. A adição de β -caroteno nas culturas com pré-inóculo pode ter sido prejudicial para os microrganismos.

Os microrganismos CS12, CS14, CS19 (*Fusarium* sp.), CF9 e CF10 apresentaram uma concentração de compostos maior nas culturas com pré-inóculo. Possivelmente por apresentar mais massa celular que nas culturas sem pré-inóculo, facilitando a degradação do substrato e conseqüente produção de metabólitos.

Dos compostos analisados, β -ionona e β -damascona são os de maior interesse comercial, pois suas baixas concentrações em tecidos vegetais aumentam os custos de extração. Esses compostos foram produzidos em maiores concentrações principalmente em 24-48 h para as linhagens cultivadas sem pré-inóculo e em 24 h para as linhagens cultivadas com pré-inóculo, por grande parte dos microrganismos estudados.

A β -ionona foi o principal produto de degradação de β -caroteno gerado pelas linhagens durante o período de fermentação, e encontrado em maiores concentrações. Para as cepas cultivadas sem pré-inóculo, as linhagens CS1 e CS13 (*Penicillium* sp.) apresentaram as maiores concentrações do composto em 120 h de fermentação, 34,040 e 34,961 mg L⁻¹, respectivamente. Os

microrganismos CS11, CS20, CF9 e CF20 apresentaram concentração de β -ionona ao redor de 25 mg L^{-1} com período de fermentação variando de 24 a 120 h.

Para os microrganismos cultivados com pré-inóculo, a linhagem CF9 apresentou $42,403 \text{ mg L}^{-1}$ de β -ionona em 24 h de fermentação. As cepas CS11, CS12, CS13 (*Penicillium* sp.), CS14, CS20 e CF20 apresentaram, em média, 25 mg L^{-1} de β -ionona com período de fermentação variando de 24 a 120 h.

Os compostos β -damascona e pseudoiononas foram formados em baixas concentrações por todas as linhagens durante o período estudado.

O microrganismo CS12 foi o principal produtor de β -damascona quando cultivado em ambos os meios de cultura. As concentrações obtidas foram de $158,042$ e $207,849 \text{ mg L}^{-1}$ em meio de cultura cultivado sem e com pré-inóculo, respectivamente, em 120 h de fermentação.

A linhagem CS1 foi o principal produtor de pseudoiononas em meio de cultura sem pré-inóculo. Foram observadas as concentrações de $12,413$ e $2,952 \text{ mg L}^{-1}$ de pseudoiononas 1 e 2, respectivamente, em 72 h de fermentação. Em culturas cultivadas com pré-inóculo, a linhagem CS14 apresentou $11,598 \text{ mg L}^{-1}$ de pseudoionona 1 em 48 h de fermentação e a linhagem CF9 apresentou $2,451 \text{ mg L}^{-1}$ de pseudoionona 2 em 24 h de fermentação.

Em termos de rendimento, a linhagem CF9 apresentou a maior concentração de β -ionona ($42,403 \text{ mg L}^{-1}$) em 24 h de fermentação quando cultivada em meio de cultura com pré-inóculo. A linhagem CS12 se mostrou o

melhor produtor de β -damascona quando cultivado em meio de cultura com pré-inóculo (207,849 mg L⁻¹) em 120 h de fermentação.

Com relação ao tempo de fermentação, as linhagens CS3 (*Cladosporium* sp.), CS12, CS13 (*Penicillium* sp.), CS14, CS17 (*Rhizopus* sp.) e CS20 produziram as maiores concentrações de β -ionona em 24-48 h de fermentação em meios de cultura sem e com pré-inóculo, porém em menores concentrações que a linhagem CF9. As linhagens CS3 (*Cladosporium* sp.), CS13 (*Penicillium* sp.), CS14, CS17 (*Rhizopus* sp.), CS19 (*Fusarium* sp.), CS20 e CF9 produziram as maiores concentrações de β -damascona em 24-48 h de fermentação em ambos os meios de cultura, porém em menores concentrações que a linhagem CS12.

Damascenona foi obtido somente em quantidades traços e somente por duas linhagens, CS19 (*Fusarium* sp.) e CF9, provavelmente por esse composto ser produto de degradação principalmente de neoxantina.

TTN e apocarotenóides (aldeídos ou cetonas), produtos de degradação de β -caroteno, foram formados, mas não foi possível quantificá-los pela ausência de padrões.

Outros compostos noroisoprenóides podem ter sido formados, mas não foi possível detectá-los com as técnicas utilizadas. Ou poderiam ter sido formados se o período de fermentação estudado fosse estendido.

Para o prosseguimento deste trabalho, podemos sugerir o aumento do tempo de fermentação para verificar a produção de outros compostos voláteis derivados de β -caroteno e a utilização de outras técnicas de extração,

identificação e confirmação de identidade na análise dos compostos de aromas formados.

As linhagens CF9 e CS12 apresentaram as maiores concentrações de β -ionona e β -damascona, respectivamente, e poderiam ser mais exploradas quanto à possibilidade de aumentar o rendimento e reduzir o tempo de fermentação para a produção destes compostos.

Como sugestão para trabalhos futuros, o uso de outros substratos como isômeros de β -caroteno para verificar o efeito da isomeria *cis/trans*; α -caroteno, zeaxantina, neoxantina e luteína para se verificar a formação de outros compostos de aromas derivados de carotenóides.

O uso de outras técnicas de identificação e confirmação de identidade, como ressonância nuclear magnética ou infravermelho, e técnicas combinadas a essas, poderiam elucidar a estrutura e a composição dos compostos pertencentes aos extratos obtidos.

Aromas e fragrâncias despertam o interesse das pessoas há muitos séculos. Tradicionalmente, compostos de aromas e óleos essenciais são extraídos de substratos naturais, tornando o trabalho custoso e laborioso. Novas estratégias para produção de bioaromas serão importantes nos estudos da biotecnologia, microbiologia e em rotas bioquímicas, e a preferência dos consumidores por produtos e compostos naturais darão suporte a essa produção.

Novos substratos, enzimas e genes de diferentes organismos (animais, plantas e microrganismos), serão descobertos. Metodologias inovadoras nos

campos da engenharia metabólica, o aumento do número de dados disponíveis de seqüências genômicas e o melhoramento de metodologias genômicas e proteômicas permitirão o acesso a novas enzimas, incluindo as que desempenham papel chave na biossíntese de aromas.

A obtenção de produtos agrícolas com aromas mais intensos e a produção de aromas específicos utilizando-se estratégias de biocatálise não dependerão somente das disponibilidades técnicas e científicas, mas também de uma percepção pública menos prejudicial e mais equilibrada do uso da engenharia genética para o melhoramento da qualidade dos alimentos e dos processos de produção menos prejudiciais ao meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. San Diego: Academic Press, Inc., 1989, 302 p.
2. Agarwal, S.; Rao A. V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids**, v. 33, 981-984, 1998
3. Aleu, J.; Collado, I. G. Biotransformations by *Botrytis* species. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 13, 77-93, 2001
4. Andersen, R. A.; Hamilton-Kemp, T. R.; Fleming, P. D.; Hildebrand, D. F. Volatile compounds from vegetative tobacco and wheat obtained by steam distillation and headspace trapping. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 99-111
5. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 2**, de 5 de janeiro de 2007
6. Anzaldi, M.; Sottofattori, E.; Dusatti, F.; Ferro, M.; Pani, M.; Balbi, A. Synthesis of ionones and carvone analogues: olfactory properties and preliminary toxicity assays. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 35, 797-803, 2000
7. Araujo, A. A.; Pastore, G. M.; Berger, R. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation. **App. Biochem. Biotechnol.**, v. 98, 747-749, 2002
8. Astorg, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends Food Sci. Technol.**, v 8, 406-413, 1997

9. Auldridge, M. E.; McCarty, D. R.; Klee, H. J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, 315-321, 2006
10. Baldermann, S.; Naim, M.; Fleischmann, P. Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines (*Prunus persica*). **Food Res. Int.**, v. 38, 833-836, n. 8-9, 2005
11. Barkovich, R.; Liao, J. Metabolic engineering of isoprenoids. **Metab. Eng.**, v. 3, 27-39, 2001
12. Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. **Common fragrance and flavor material**. 4^a ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 293 p.
13. Baumes, R.; Wirth, J.; Bureau, S.; Gunata, Y.; Razungles, A. Biogeneration of C₁₃-norisoprenoides compounds: experiments supportive for an apocarotenoid pathway in grapevines. **Anal. Chim. Acta**, v. 458, 3-14, 2002
14. Beszant, S.; Giannini, E.; Zanoni, G.; Vidari, G. Enantioselective synthesis of both enantiomers of γ -ionone, γ -damascone, karahana lactone and karahana ether. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, 1245-1255, 2002
15. Bluemke, W.; Schrader, J. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. **Biomol. Eng.**, v. 17, n. 4-5, 137-142, 2001
16. Bosser, A.; Belin, J. M. Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthin oxidase/ β -carotene system involving free radical formation. **Biotechnol. Prog.**, v. 10, 129-133, 1994

17. Bouvier, F.; Suire, C.; Mutterer, J.; Camara, B. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. **The Plant Cell**, v. 15, 47-62, 2003
18. Brael, P. A.; Acree, T. E.; Butts, R. M.; Zhou, P. G. Isolation of nonvolatile precursors of β -damascenone from grapes using charm analysis. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 75-84
19. Britton, G. Carotenoids. In: Hendry, G. A. F.; Houghton, J. D. **Natural food colorants**. Nova Iorque: Blackie, 1992, 141-182
20. Cadwallader, K. R. Flavor chemistry of saffron. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 220-239
21. Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. **Anal. Chim. Acta**, v. 555, 191-200, 2006
22. Careri, M.; Bianchi, F.; Corradini, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. **J. Chromatogr., A**, v. 970, 3-64, 2002
23. Chatterjee, T.; Bhattacharyya, D. K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, 541-546, 2001

24. Chen M.-X.; Chen X.-S.; Wang X.-G.; Ci Z.-J.; Liu X.-L.; He T.-M.; Zhang L.-J. Comparison of headspace solid-phase microextraction with simultaneous steam distillation extraction for the analysis of the volatile constituents in Chinese apricot. **Agric. Sci. China**, v. 5, n. 11, 879-884, 2006
25. Confectionery News.Com. **DSM: biggest slice of carotenoid market**. Disponível em <<http://www.confectionerynews.com/news/ng.asp?id=60476-dsm-biggest-slice>>, acessado em julho de 2008
26. Cooper, A. M.; Davies, N. W.; Menary, R. C. C-27 apocarotenoids in the flowers of *Boronia megastigma* (Nees). **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, 2384-2389, 2003
27. Crouteau, R.; Karp, F. Oridin of natural odorants. In: Müller, P. M.; Lamparsky, D. **Perfumes – Art, science and technology**. Londres: Chapman & Hall, 1994, 101-126
28. Crouzet, J.; Kanasawud, P.; Sakho, M. Thermal generation of carotenoid-derived compounds. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 115-129
29. Daigle, P.; Gélinas, P.; Leblanc, D.; Morin, A. Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb. **Food Microbiol.**, v. 16, 517-522, 1999
30. Damasceno, S.; Cereda, M. P.; Pastore, G. M.; Oliveira, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochem.**, v. 39, n. 4, 411-414, 2003

31. De Zeeuw, R. A. Drug screening in biological fluids. The need for a systematic approach. **J. Chromatogr., B**, v. 689, 71-79, 1997
32. De Zeeuw, R. A. Substance identification: the weak link in analytical toxicology. **J. Chromatogr., B**, v. 811, 3-12, 2004
33. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 40, 173-289, 2000
34. Dembitsky, V. M. Astonishing diversity of natural surfactants: 3. Carotenoid glycosides and isoprenoid glycolipids. **Lipids**, v. 40, n. 6, 535-557, 2005
35. Demyttenaere, J. C. R.; Van Belleghem, K.; De Kimpe, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, v. 57, n. 2, 199-208, 2001
36. Demyttenaere, J.; Kimpe, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, n. 4-6, 265-270, 2001
37. Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. The carotenoids as anti-oxidants — a review. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 41, 189-200, 1997
38. Englert, G. NMR of carotenoids – new experimental techniques. **Pure Appl. Chem.**, v. 57, n. 5, 801-821, 1985
39. Enzell, C. Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds. **Pure Appl. Chem.**, v. 57, 693-700, 1985
40. Enzell, C. R.; Francis, G. W. Mass spectrometric studies of carotenoids. 2. A survey of fragmentation reactions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, n. 4, 727-750, 1969

41. Eugster, C. H.; Märki-Fischer, E. The chemistry of rose pigments. **Angew. Chem. Int. Ed. Eng.**, v. 30, 654-672, 1991
42. Feron, G.; Bonnarne, P.; Durand, A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 7, 285-293, 1996
43. Ferreira, A. C. S.; de Pinho, P. G. Nor-isoprenoids profile during port wine ageing – influence of some technological parameters. **Anal. Chim. Acta**, v. 513, n. 1, 169-176, 2004
44. Ferreira, A. C. S.; Monteiro, J.; Oliveira, C.; de Pinho, P. G. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. **Food Chem.**, v. 110, 83-87, 2008
45. Fleischmann, P.; Lutz-Röder, A.; Winterhalter, P.; Watanabe, N. Carotenoid cleavage enzymes in animals and plants. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 76-88
46. Fleischmann, P.; Watanabe, N.; Winterhalter, P. Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). **Phytochemistry**, v. 63, n. 2, 131-137, 2003
47. Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, 228-265, 2004
48. Friedrich, J. E.; Acree, T. E. Analyzing carotenoid-derived aroma compounds using gas chromatography-olfactometry. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 67-74

49. Gatfield, I. L. Generation of flavor and aroma components by microbial fermentation and enzyme engineering technology. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogeneration of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 310-322
50. Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect on sunlight exposure on norisoprenoid formation in white Riesling grapes. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 262-272
51. Giuliano, G.; Al-Babili, S.; von Lintig, J. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. **Trends Plant Sci.**, v. 8, 145-149, 2003
52. Gloria, M. B.; Grulke, E. A.; Gray, J. I. Effect of type of oxidation on beta-carotene loss and volatile products formation in model systems. **Food Chem.**, v. 46, 401-406, 1993
53. Goff, S. A.; Klee, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? **Science**, v. 311, 815-819, 2006
54. Gomes-Carneiro, M. R.; Dias, D. M. M.; Paumgarteten, F. J. R. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β -ionone in the *Salmonella*/microsome assay. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, 522-527, 2006
55. Grivel, F.; Larroche, C. Phase transfer and biocatalyst behavior during biotransformation of β -ionone in a two-phase liquid system by immobilized *Aspergillus niger*. **Biochem. Eng. J.**, v. 7, n. 1, 27-34, 2001

56. Grivel, F.; Larroche, C.; Gros, J. B. Determination of the reaction yield during biotransformation of the volatile and chemically unstable compound β -ionone by *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, n. 4, 697-705, 1999
57. Grosh, W.; Laskawy, G.; Weber, F. Formation of volatile carbonyl compounds and cooxidation of β -carotene by lipoxygenase from wheat, potato, flax, and beans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, n. 3, 456-459, 1976
58. Guillot, S.; Peytavi, L.; Bureau, S.; Boulanger, R.; Lepoutr, J.-P.; Crouzet, J.; Schorr-Galindo, S. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. **Food Chem.**, v. 96, n. 1, 147-155, 2006
59. Güldner, A.; Winterhalter, P. Structures of two new ionone glycosides from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, 2142-2146, 1991
60. Günata, Z.; Wirth, J. L.; Guo, W.; Baumes, R. L. C₁₃-norisoprenoid aglycon composition of leaves and grape berries from Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 255-261
61. Hagiwara, H.; Eda, Y.; Morohashi, K.; Suzuki, T.; Ando, M.; Ito, N. Selectivity in palladium catalyzed arylation: synthetic application leading to aromatized ionone natural products. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, 4055-4058, 1998

62. Hartstra, J.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. How to approach substance identification in qualitative bioanalysis. **J. Chromatogr., B**, v. 739, 125-137, 2000
63. Högnadóttir, Á.; Rouseff, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr., A**, v. 998, n. 1-2, 201-211, 2003
64. Holden, J. M.; Eldridge, A. L.; Beecher, G. R.; Buzzard, M.; Bhagwat, S.; Davis, C. S.; Douglass, L. W.; Gebhardt, S.; Haytowitz, D.; Schakel, S. Carotenoid content U. S. foods: an update of the database. **J. Food Composition Anal.**, v. 12, 169-196, 1999
65. Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M. I.; Bioaccessibility of carotenes from carrots: effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Sci. Emerging Technol.**, v. 8, 407-412, 2007
66. Hylemon, P. B.; Harder, J. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 22, 475-488, 1999
67. Ibdah, M.; Azulay, Y.; Portnoy, V.; Wasserman, B.; Bar, E.; Meir, A.; Burger, Y.; Hirschberg, J.; Schaffer, A. A.; Katzir, N.; Tadmor, Y.; Lewinsohn, E. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, 1579-1589, 2006
68. Janssens, L.; DePooter, H. L.; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochem.**, v. 27, 195-215, 1992

69. Kaiser, R. Carotenoid-derived aroma compounds in flower scents. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 160-182
70. Kalyani, A.; Prapulla, S. G.; Karanth, N. G. Study on the production of 6-pentyl- α -pyrone using two methods of fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, 610-612, 2000
71. Kanasawud, P.; Crouzet, J. C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -carotene degradation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, 237-243, 1990
72. Katz, I. Biogenesis of aromas. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 380-386
73. Kawakami, M.; Kobayashi, A. Carotenoids-derived aroma compounds in tea. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 145-159
74. King, A.; Dickson, J. R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, n. 1, 53-62, 2003
75. Knudsen, J. T.; Tollsten, L.; Bergström, G. Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, 253-280, 1993

76. Kotseridis, Y.; Baumes, R. L.; Bertrand, A.; Skouroumounis, G. K. Quantitative determination of β -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. **J. Chromotogr., A**, v. 848, n. 1-2, 317-325, 1999
77. Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labeled [$^2\text{H}_2$]2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [$^2\text{H}_3$] α -ionone, and [$^2\text{H}_3$] β -ionone, for quantification in grapes, juices and wines. **J. Chromatogr., A**, v. 824, 71-78, 1998
78. Krammer, G. E.; Werkhoff, P.; Sommer, H.; Schmidt, C. O.; Gatfield, I.; Bertram, H.-J. Carotenoid degradation products in paprika powder. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 206-219
79. Krings, U.; Kelch, M.; Berger, R. G. Adsorbents for the recovery of aroma compounds in fermentation process. **J. Chem. Biotechnol.**, v. 58, 293-299, 1993
80. Larroche, C.; Creuly, C.; Gros, J.-B. Fed-batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, n. 2, 222-227, 1995a
81. Larroche, C.; Grivel, F.; Cruely, C.; Gros, J. B. Fed-batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger* immobilized in Ca-alginate beads. In: Étievant, P.; Schereier, P. **Bioflavour 95**. Dijon: INRA Editions, 1995b, 309-314
82. Leffingwell, J. C. **Carotenoids as flavor & fragrance precursors**. Disponível em <<http://www.leffingwell.com/caroten.htm>>, acessado em julho de 2008

83. Lewinsohn, E.; Sitrit, Y.; Bar, E.; Azulay, Y.; Ibdah, M.; Meir, A.; Yosef, E.; Zamir, D.; Tadmor, Y. Not just colors – carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 16, 407-415, 2005
84. López, R.; Aznar, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **J. Chromatogr., A**, v. 966, 167-177, 2002
85. López, R.; Ezpeleta, E.; Sánchez, I.; Cacho, J.; Ferreira, V. Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempanillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. **Food Chem.**, v. 88, 95-103, 2004
86. Lugay, J. C. Biogenesis of aromas. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 11-17
87. Lutz, A.; Winterhalter, P. Bio-oxidative cleavage of carotenoids: important route of physiological active plant constituents. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, n. 36, 5169-5172, 1992a
88. Lutz, A.; Winterhalter, P. Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, 1116-1120, 1992b
89. MacTavish, H. S.; Davies, N. W.; Menarys, R. C. Emission of volatiles from brown Boronia flowers: some comparative observations. **Ann. Bot.**, v. 86, 347-354, 2000

90. MacTavish, H.; Davies, N. W.; Menary, R. C. Bound volatiles in brown Boronia flowers (*Boronia megastigma*). In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 183-193
91. Mahattanatawee, K.; Goodner, K. L.; Baldwin, E. A. Volatile constituents and character impact compounds of selected Florida's tropical fruits. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 118, 414-418, 2005
92. Maldonado-Robledo, G.; Rodriguez-Bustamante, E.; Sanchez-Contreras, A.; Rodriguez-Sonoja, R.; Sanchez, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, n. 5-6, 484-488, 2003
93. Mamede, M. E. O.; Cardelo, H. M. A. B.; Pastore, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analysis of fermented grape musts. **Food Chem.**, v. 89, n. 1, 63-68, 2005
94. Mamede, M. E. O.; Pastore, G. M. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chem.**, v. 96, n. 4, 586-590, 2006
95. Manley, C. H. The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology. In: Gabelman, A. **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**. Cincinnati: Wiley Interscience Publication, 1994, 19-39
96. Marais, J. The significance of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in the production of high quality Riesling wines. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L.

- Carotenoid-Derived Aroma Compounds.** ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 273-284
97. Marasco, E.; Schmidt-Dannert, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Appl. Biotechnol. Food Sci. Policy.**, v. 1, 145-157, 2003
98. Maróstica Jr., M. R.; Pastore, G. M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chem.**, v. 101, n. 1, 345-350, 2007
99. Marques, D. B. **Produção e caracterização de aromas de frutas por *Pichia membranaefaciens*.** Campinas, 1998. 136 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas
100. Mikami, Y.; Fukunaga, Y.; Arita, M.; Kisaki, T. Microbial transformation of β -ionone and β -methylionone. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 3, 610-617, 1981
101. Mohamed, N.; Hashim, R.; Rahman, N. A.; Zain, S. M. An insight to the cleavage of β -carotene to vitamin A: a molecular mechanics study. **J. Mol. Struct.: Theochem.**, v. 538, 245-252, 2001
102. Muheim, A.; Häusler, A.; Schilling, B.; Lerch, K. The impact of recombinant DNA-technology on the flavour and fragrance industry. In: Swift, K. A. D. **Flavours and Fragrances.** Grã Bretanha: Royal Society of Chemistry, 1997, 11-20

103. Neugebauer, W.; Winterhalter, P.; Schreier, P. *Urtica dioica* leaves: an attractive source for glycosidically bound C₁₃ norisoprenoids. In: Étievant, P.; Schreier, P. **Bioflavour 95**. Dijon: INRA Editions, 1995, 227-233
104. Neuser, F.; Zorn, H.; Berger, R. G. Generation of odorous acylolins by yeast pyruvate decarboxylases and their occurrence in sherry and soy sauce. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, 6191-6195, 2000
105. Nornier, M.-F.; de Gaulejac, N. V.; Vivas, N.; Vitry, C. Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, 689-698, 2004
106. Oda, S.; Ohta, H. Alleviation of toxicity of poisonous organic compounds on hydrophilic carrier/hydrophobic organic solvent interface. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, n. 9, 1515-1517, 1992
107. Olivier, J.; Palou, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Cromatogr., A**, v. 881, 543-555, 2000
108. Olson, J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, n. 3, suplemento 1, 7S-11S, 1999
109. Ong, P. K. C.; Acree, T. E.; Lavin, E. H. Characterization of volatiles in Rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, 611-615, 1998
110. Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. Production of fruity aroma by *Neurospora* species isolated from beiju. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 1, 55-58, 1995

111. Pastore, G. M.; Park, Y. K.; Min, D. B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. **Mycological Res.**, v. 98, n. 11, 1300-1302, 1994
112. Pastore, G. M.; Sato, H. H.; Yang, T. S.; Park, Y. K.; Min, D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnol. Lett.**, v. 16, n. 4, 389-392, 1994
113. Pastore, G. M.; Tateo, F.; Bonomi, M.; Lubian, E.; Martello, S.; Beccaro, Y. Production of fruit-like flavouring substances from *Pichia membranaefaciens*. **Italian J. Food Sci.**, v. 11, n. 1, 75-79, 1999
114. Peter, S.; Datsevich, L.; Jess, A. Kinetics of catalytic hydrogenation of β -ionone and application of a pressurized one-liquid flow reactor for the production of fine chemicals. **Appl. Catal. A: Gen.**, v. 286, 96-110, 2005
115. Petrzilka, M.; Ehret, C. Natural products. In: Müller, P. M.; Lamparsky, D. **Perfumes – Art, science and technology**. Londres: Chapman & Hall, 1994, 499-531
116. Pillonel, L.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 35, 1-14, 2002
117. Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 44, n. 2, 78-86, 2007
118. Plummer, J. A.; Wann, J. M.; Spadek, Z. E. Intraspecific variation in oil components of *Boronia megastigma* nees. (Rutacea) flowers. **Ann. Bot.**, v. 83, 253-262, 1999

119. Procter & Gamble. Joseph, C. D.; Raymond, K. D.; Theodore Jr., K. S.; Joel, T. M. **Methods of preparation of oil-in-water dispersions of beta-carotene and other carotenoids stable against oxidation, prepared from water-dispersible beadlets having high concentrations of carotenoid.** US, EP1006809, 14/06/2000
120. Puglisi, C. J.; Elsey, G. M.; Prager, R. H.; Skouroumounis, G. K.; Sefton, M. A. Identification of a precursor to naturally occurring β -damascenone. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, 6937-6939, 2001
121. Quattrini, F.; Biressi, G.; Juza, M.; Mazzotti, M.; Fuganti, C.; Morbidelli, M. Enantiomer separation of α -ionone using gas chromatography with cyclodextrin derivatives as chiral stationary phases. **J. Chromatogr., A**, v. 865, 201-210, 1999
122. Rajan, M. **The Global Market for Carotenoids – Updated Edition.** Disponível em <<http://www.bccresearch.com/editors/RGA-110R.html>>, acessado em julho de 2008
123. Ravichandran, R. Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on tea quality and aroma. **Food Chem.**, v. 78, 23-28, 2002
124. Raynaud, C.; Poteau, R.; Maron, L.; Jolibois, F. Ab initio molecular dynamics simulation of the UV absorption spectrum of β -ionone. **Theo Chem**, v. 771, 43-50, 2006

125. Reineccius, G. **Source book of flavors**. 2^a ed., Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 1999, 928 p.
126. Rodrigues-Amaya, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, Washington, DC: OMNI Research ILSI Press, 1999, 64 p.
127. Rodríguez-Bustamante, E.; Maldonado-Robledo, G.; Ortiz, M. A.; Díaz-Ávalos, C.; Sanchez, S. Bioconversion of lutein using a microbial mixture – maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, n. 2, 174-182, 2005
128. Rodríguez-Bustamante, E.; Maldonado-Robledo, G.; Sánchez-Contreras, A.; Klimova, T.; Arreguín-Espinosa, R; Sánchez, S. Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to beta-ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, n. 4, 568-573, 2006
129. Rodríguez-Bustamante, E.; Sánchez, S. Microbial production of C₁₃-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 33, n. 3, 211-230, 2007
130. Ronen, G.; Cohen, M.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. **The Plant J.**, v. 17, n. 4, 341-351, 1999
131. Ropert, F.; Dumont, B.; Belin, J. M. Biotechnological method of ionone production in non conventional media. In: Étievant, P.; Schereier, P. **Bioflavour 95**. Dijon: INRA Editions, 1995, 275-278

132. Sakamaki, H.; Itoh, K.-I.; Chai, W.; Hayashida, Y.; Kitanaka, S.; Horiuchi, C. A. Biotransformation of (\pm)- α -ionone and β -ionone by cultured cells of *Caragana chamlagu*. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 27, 177-181, 2004
133. Sánchez-Contreras, A.; Jiménez, M.; Sanches, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, n. 4, 528-534, 2000
134. Sanderson, G. W.; Graham, H. N. On the formation of black tea aroma. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 21, n. 4, 576-585, 1973
135. Sanderson, G. W.; Co, H.; Gonzalez, J. G. Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenes in black tea aroma formation. **J. Food Sci.**, v. 36, 231-236, 1971
136. Sarry, J.-E.; Günata, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chem.**, v. 87, 509-521, 2004
137. Scharpf, L. G.; Seitz, E. W.; Morris, J. A.; Farbood, M. I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation process. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 323-346
138. Schneider, R.; Razungles, A.; Augier, C.; Baumes, R. Monoterpenic and norisoprenoid glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. **J. Chromatogr., A**, v. 936, 145-157, 2001
139. Schrader, J.; Berger, R. G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, H.-J.; Reed, G. **Biotechnology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 373-422, 606 p.

- 140.Schrader, J.; Etschmann, M. M. W.; Sell, D.; Hilmer, J. M.; Rabenhorst, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial process and future prospects. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, 463-472, 2004
- 141.Schwartz, S. H.; Qin, X.; Zeevaart, J. A. D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. **The J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 27, 25208-25211, 2001
- 142.Schwartz, S. H.; Qin, X.; Zeevaart, J. A. D. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. **J. Biol. Chem.**, v. 276, 1872-1874, 1997
- 143.Sefton, M. A.; Skouroumonis, G. K.; Massy-Westropp, R. A.; Williams, P. J. Norisoprenoids in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. **Aust. J. Chem.**, v. 42, 2071-2084, 1989
- 144.Seitz, E. W. Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavors and fragrances. In: Gabelman, A. **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**. Cincinnati: Wiley Interscience Publication, 1994, 95-134
- 145.Serra, S.; Fuganti, C. Synthesis of the enantiomeric forms of α - and β -damascone starting from commercial racemic α -ionone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, 1537-1580, 2006
- 146.Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol.**, v. 23, n. 4, 193-198, 2005

147. Serrano-Carreón, L. Improving biogenesis of aroma compounds by *in situ* product removal. In: Gutiérrez-López, G. F.; Barbosa-Cánovas, G. V. **Food Science and Food Technology**. Boca: CRC Press LLC, 2003, 219-232
148. Sharon-Asa, L.; Shalit, M.; Frydman, A.; Bar, E.; Holland, D.; Or, E.; Lavi, U.; Lewinsohn, E.; Eyal, Y. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valence. **The Plant J.**, v. 36, 664-674, 2003
149. Shure, K. B.; Acree, T. E. Production of β -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labruscana* cv Concord grapes. **Plant Cell Rep.**, v. 13, 477-480, 1994
150. Simkin, A. J.; Schwartz, S. H.; Auldridge, M.; Taylor, M. G.; Klee, H. J. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. **The Plant J.**, v. 40, n. 6, 882-892, 2004
151. Skouroumounis, G. K.; Massy-Westropp, R. A.; Sefton, M. A.; Williams, P. J. Synthesis of glucosides related to grape and wine aroma precursors. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, 974-980, 1995
152. Skouroumounis, G.; Sefton, M. A. The formation of β -damascenone in wine. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 241-254

153. Solís-Solís, H. M.; Calderón-Santoyo, M.; Schorr-Galindo, S.; Luna-Solano, G.; Ragazzo-Sánchez, J. A. Characterization of aroma potential of apricot varieties using different extraction techniques. **Food Chem.**, v. 105, n. 2, 829-837, 2007
154. Sommemburg, O.; Langhans, C.-D.; Arnhold, J.; Leichsering, M.; Salerno, C.; Crifò, C.; Hoffmann, G. F.; Debatin, K.-M.; Siems, W. G. β -carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid – a model for neutrophil-derived degradation. **Free Radical Biol. Med.**, v. 35, n. 11, 1480-1490, 2003
155. Stofberg, J. Legislative and consumer perception of biologically generated aroma chemicals. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogeneration of aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 2-10
156. Straubinger, M.; Bau, B.; Eckstein, S.; Fink, M.; Winterhalter, P. Identification of novel glycosidic aroma precursors in saffron (*Crocus sativus* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 76, 3238-3243, 1998
157. Strauss, C.; Dimitriadis, E.; Wilson, B.; Williams, P. J. Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C₁₃ norisoprenoids of *Vitis vinifera* grapes. **J. Food Chem.**, v. 34, 145-149, 1986
158. Su, Q.; Rowley, K. G.; Balazs, N. D. H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **J. Chromatogr., B**, v. 781, 393-418, 2002
159. Suzuki, M.; Matsumoto, S.; Fleischmann, H.-P.; Shimada, H.; Yamano, Y.; Ito, M.; Watanabe, N. Identification of β -damascenone progenitors and their

- biogenesis in rose flowers(*Rosa damascene* Mill.). In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 89-100
160. Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Buttery, R. G.; Winterhalter, P.; Günter, M.; Ramming, D. W.; Teranishi, R. Free and bound flavor constituents of white-fleshed nectarines. In: Teranishi, R.; Takeoka, G. R.; Günter, M. **Flavor precursors – Thermal and enzymatic conversions**. ACS Symposium Series 490, Washington, DC: American Chemical Society, 1992, 116-138
161. Tarantilis, P. A.; Tsoupras, G.; Polissiou, M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. **J. Chromatogr., A**, v. 699, 107-118, 1995
162. Tieman, D. M.; Zeigler, M.; Schmelz, E. A.; Taylor, M. G.; Bliss, P.; Kirst, M.; Klee, H. J. Identification of loci affecting flavor volatile emissions in tomato fruits. **J. Exp. Bot.**, v. 57, n. 4, 887-896, 2006
163. Uenojo, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. Campinas, 2003. 124 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas
164. Uenojo, M.; Maróstica Jr., M. R.; Pastore, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, 616-622, 2007

165. Urlacher, V. B.; Makhsumkhanov, A.; Schmid, R. D. Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 70, n. 1, 53-59, 2006
166. Valla, A.; Valla, B.; Cartier, D.; Le Guillou, R.; Labia, R.; Potier, P. New aromatic annulations reaction via C_{14} enaminone synthon: synthesis of 'terpenoid-like chalcones'. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, 6671-6674, 2005
167. Van Keulen, F.; Correia, C. N.; da Fonseca, M. M. R. Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 5, 295-299, 1998
168. Versini, G.; Carlin, S.; Serra, A. D.; Nicolini, G.; Rapp, A. Formation of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and other norisoprenoids in wine: considerations of the kinetics. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 285-299
169. Vitatene S/A; Wild GMBH & Co KG Rudolf. Thomas, E.; Christian, C.; Alfonso Jr., C. de La V.; Angel, M.; Manuel, E. M. **Method for the production of a water-dispersible formulation containing carotenoids**. ES, DE, EP1300394, 09/04/2003
170. Waché, Y.; Bosser-DeRatuld, A.; Belin, J.-M. Dispersion of β -carotene in process of production of β -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species. **Process Biochem.**, v. 41, n. 11, 2337-2341, 2006

171. Waché, Y.; Bosser-DeRatuld, A.; Belin, J.-M. Production of aroma compounds in enzymatic cooxidation of carotenoids. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002a, 102-113
172. Waché, Y.; Bosser-DeRatuld, A.; Lhuguenot, J.-C.; Belin, J.-M. Effect of *cis/trans* isomerism of β -carotene on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n. 7, 1984-1987, 2003
173. Waché, Y.; Bosser-DeRatuld, A.; Ly, H. M.; Belin, J.-M. Co-oxidation of β -carotene in biphasic media. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 19-20, 197-201, 2002b
174. Wahlberg, I. Carotenoid-derived aroma compound in tobacco. In Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 131-144
175. Weeks, W. W. Carotenoids: A source of flavor and aroma. In: Parliament, T. H.; Croteau, R. **Biogenesis of Aromas**. ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 157-166
176. Welsh, F. W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: Gabelman, A. **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**. Cincinnati: Wiley Interscience Publication, 1994, 1-17
177. Whitaker, R. J.; Hobbib, G. C.; Steward, L. A. Production of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Parliament, T. H.; Croteau, R.

- Biogenesis of aromas.** ACS Symposium Series 317, Washington, DC: American Chemical Society, 1986, 347-362
178. Winterhalter, P. 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the hydrolysis of 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4,5]dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C₁₃ norisoprenoids in Riesling wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, 1825-1829, 1991
179. Winterhalter, P. Oxygenate C₁₃-Norisoprenoids – important flavor precursors. In: Teranishi, R.; Takeoka, G. R.; Günter, M. **Flavor precursors – Thermal and enzymatic conversions.** ACS Symposium Series 490, Washington, DC: American Chemical Society, 1992, 98-115
180. Winterhalter, P.; Rouseff, R. Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds.** ACS Symposium Series 802, Washington, DC: American Chemical Society, 2002, 1-17
181. Winterhalter, P.; Schreier, P. Free and bound C₁₃ norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. **J. Agric. Food Chem.**, v, 36, 1251-1256, 1988
182. Winterhalter, P.; Straubinger, M. Saffron-renewed interest in an ancient spice. **Food Rev. Int.**, v. 16, n. 1, 39-59, 2000
183. Wu, Z.; Robinson, D. S.; Hughes, R. K.; Casey, R.; Hardy, D.; West, S. I. Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, 4899-4906, 1999

184. Yamazaki, Y.; Hayashi, Y.; Arite, M.; Hieda, T.; Mikami, Y. Microbial conversion of α -ionone, α -methylionone, and α -isomethylionone. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 10, 2354-2360, 1988
185. Young, J.-J.; Jung, L.-J.; Cheng, K.-M. Amberlyst-15-catalyzed intramolecular S_N2' oxaspirocyclization of secondary allylic alcohols. Application to the total synthesis of spirocyclic ethers thespirane and thespirone. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, 3415-3418, 2000
186. Ziegler, H. A dynamic business with taste – the flavour industry. In: Ziegler, H. **Flavorings: Production, composition, applications, regulations**. 2^a ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2007, 1-13
187. Zorn, H.; Breithaupt, D. E.; Takenberg, M.; Schwack, W.; Berger, R. G. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, 623-628, 2003a
188. Zorn, H.; Fischer-Zorn, M.; Berger, R. G. A labeling study to elucidate the biosynthesis of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 1, 367-372, 2003b
189. Zorn, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M.; Berger, R. G. A peroxidase from *Lepsita irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. **Biol. Chem.**, v. 384, n. 7, 1049-1056, 2003c

- 190.Zorn, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M.; Berger, R. G. Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, n. 4, 331-336, 2003d
- 191.Zorn, H.; Neuser, F.; Berger, R. G. Degradation of α -pinene oxide and [$^2\text{H}_7$]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. **J. Biotechnol.**, v. 107, n. 3, 255-263, 2004
- 192.Zorn, H.; Schöler, M.; Berger, R. G. Pyruvate decarboxylase catalysed formation of terpenoid α -hydroxy ketones. **Biocatal. Biotransform.**, v. 21, n. 6, 341-347, 2003e