

**Uso de Diferentes Fibras para Extração de Compostos Voláteis
Produzidos por Fermentação em Fase Sólida de Resíduos de Café (*coffea arabica*)**

**Use of Different Fibers for the Extraction of Volatile Compounds
Produced by Solid Phase Fermentation of Coffee Residues (*coffea arabica*)**

Thiago Fontes da Hora Silva^{1*}, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{2}, Marcelo Franco³**

¹Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, R. Barão de Jeremoabo, 147 - Ondina, 40170-115, Salvador-BA, Brasil.

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Departamento de Ciências e Tecnologias - DCT, 45208-091, Jequié-Bahia, Brasil.

³Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas - DCET
Rodovia Ilhéus-Itabuna, Salobrinho, 45654370, Ilhéus-BA, Brasil

*tico1_fz@hotmail.com

**baraquizio@gmail.com

Resumo

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para identificar a melhor fibra para extração de compostos voláteis gerados por fermentação em fase sólida de resíduos provenientes das indústrias de beneficiamento de café do Sudoeste da Bahia. O fungo filamentososo *Aspergillus niger*. Foi utilizado para fermentação em fase sólida, impregnando uma solução nutritiva à matéria seca. A extração foi feita pela técnica de microextração em fase sólida, no modo *headspace*, sob agitação e adição de solução de NaCl a 25% (p/v). Os resultados reportados mostram que o melhor tempo de fermentação foi 48 h, e um teste determinou a carboxen-polidimetilsiloxano, como melhor fibra para captura dos voláteis.

Palavras-chave: compostos voláteis, resíduos agroindustriais, FES, SPME.

Abstract

This work presents the development and application of a methodology to identify the best fiber for extraction of volatile compounds generated by solid phase fermentation of residues from coffee processing industries in the Southwest of Bahia. The filamentous fungus *Aspergillus niger*. was used for solid phase fermentation, impregnating a nutrient solution to the dry matter. Extraction was done by the solid phase microextraction technique in *headspace* mode, with shaking and addition of 25% (w/v) NaCl solution. The results showed that the best fermentation time was 48 h, and a test determined carboxen-polydimethylsiloxane as the best fiber for capturing volatiles.

Keywords: volatile compounds, agroindustrial waste, FES, SPME.

Introdução

A cafeicultura no Brasil tem grande importância pela sustentação econômica dos setores de produção, comercialização, industrialização e consumo, relacionados à cultura, e pela distribuição de renda a diversos segmentos da economia brasileira¹. Os principais Estados brasileiros produtores de café são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Rio de Janeiro².

O Estado da Bahia tem importância considerável na economia agrícola, ocupando o quarto lugar na produção de café, com potencialidades para o desenvolvimento de processos para a reutilização das grandes quantidades de resíduos agroindustriais produzidos, e que têm baixo ou nenhum valor comercial, mas são potenciais matérias-primas para a produção de combustíveis renováveis, produtos químicos e energia de acordo com a disponibilidade local de materiais¹.

As indústrias cafeeiras produzem resíduos que poderiam ter uma finalidade muito mais benéfica ao homem e ao meio ambiente. Com o aumento da produção, é crescente também a quantidade de resíduos advindos do despulpamento do café (cascas e bagaços), que representa um sério problema ambiental relacionado ao seu descarte.

Alguns resíduos agroindustriais podem ser utilizados como ração animal, como é o caso de cascas e bagaços de frutas tropicais, mandioca, cana-de-açúcar, dentre outros. No entanto, essa utilidade não se aplica ao café, e o grande desafio do cafeicultor é o aproveitamento da grande quantidade de resíduos gerados, que, muitas vezes, são apenas utilizados na forma de fertilizantes³.

As cascas e bagaços dos frutos processados que são descartados poderiam ser utilizados como substratos na produção de vários metabólitos de origem biotecnológica de interesse industrial, como é a obtenção de aromas naturais a partir da fermentação em estado sólido utilizando microorganismos apropriados⁴.

Em virtude de seu elevado conteúdo de açúcares, cascas e bagaços tornam-se um substrato em potencial para utilização em processos biotecnológicos, atuando como fonte de carbonos para microorganismos; sua conversão em produtos mais nobres vem aumentando nos últimos anos⁵. Várias pesquisas tem sido direcionadas para utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos: bagaço de maçã utilizado como fonte de carbono para microrganismos na produção de ácido cítrico e ácido láctico⁶, farelo de trigo, bagaço de cana e de mandioca para obtenção de aromas frutais⁷, resíduos de processamento de café na geração de um forte aroma alcoólico com notas frutais⁸, ricos em pectina, podem ser utilizados por microrganismos capazes de sintetizar enzimas pectinolíticas para degradar a pectina presente no meio e utilizá-la como substrato para a produção de aromas frutais; o produto formado depende do substrato e do microrganismo utilizado na bioconversão.

Diferentes métodos podem ser utilizados para análise de compostos orgânicos voláteis, em geral todos envolvem processos de extração, concentração, separação e identificação dos componentes individuais. Quando são submetidos a qualquer variação de temperatura, estão sujeitos à modificações, como rearranjos, ciclizações, oxidações, logo, os métodos aplicados devem ser eficientes e brandos devido à quantidade, estabilidade e volatilidade desses compostos⁹.

Dentre as técnicas recentes para análise de voláteis podem-se destacar a microextração em fase sólida – MEFS (em inglês, SPME – *solid phase micro extraction*)¹⁰. Surgida na década de 90, consiste na adsorção de substâncias voláteis em uma superfície polimérica de espessura de fase entre 07 e 100 µm fixadas em uma seringa. A extração dos voláteis por adsorção pode ser feita por seu *headspace* (HS-SPME) ou ainda por contato direto da fibra com a matriz (DI-SPME).

Após a adsorção dos voláteis, os compostos são liberados por dessorção térmica no próprio injetor cromatográfico por efeito da temperatura, o que torna a técnica muito simples para utilização¹¹.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para identificar a melhor fibra para extração dos compostos voláteis produzidos pela fermentação do resíduo de café feita por fungo filamentosos.

Materiais e métodos

Materiais

Cascas e bagaços de café da espécie *coffea arabica* foram cedidos por produtores localizados nas cidades de Vitória da Conquista, Barra do Choça, Planalto, Poções, Ribeirão do Largo e Encruzilhada; após a secagem a 60 °C em estufa com circulação de ar por 24 horas, foram moídos e peneirados a fim de obter partículas de 0,8-2,0 mm de tamanho.

Todo o material empregado para MEFS – fibras revestidas: Carboxen Polidimetilsiloxano (CARPDMS) de 756 µm; Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno (PDMS-DVB) de 65 µm; Poliacrilato (PA) de 85 µm; Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, aparato para injeção manual em CG, recipientes de vidro com capacidade para 40 mL, tampas de polipropileno e septos de teflon/silicone) foi adquirido de Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Microrganismo e condições de cultura

O microorganismo selecionado para o desenvolvimento desse trabalho foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, proveniente do Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA) da UESB, Campus de Itapetinga-BA. A conservação do fungo foi obtida através da repicagem mensal das cepas em PDA (HIMEDIA), mantidas em refrigerador a 4 °C. Os esporos dos fungos foram produzidos em frascos de erlenmeyer (500 mL) contendo PDA (HIMEDIA), incubados a 35 °C ± 1 °C até a completa esporulação. Os mesmos foram recuperados em solução de água destilada estéril e quantificados em Câmara de Neubauer espelhada em um microscópio binocular (BIOVAL, L1000). As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 125 mL, contendo 10g de substrato e enriquecidas com a solução nutriente contendo 30 g/L de glicose anidra (VETEC), 0,943 g/L de ureia (VETEC), e os sais NaCl (VETEC), KH₂PO₄ (VETEC), MgSO₄.7H₂O (REAGEN), nas concentrações de 0,5 g/L, 2,0 g/L, e 1,0 g/L, respectivamente. Os substratos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos, em seguida o co-produto estéril foi inoculado com 1 mL de uma suspensão com 2,76 x 10⁷ esporos/mL do fungo filamentoso *Aspergillus niger* e mantido durante 03 (três) dias na temperatura de 35 °C ± 1°C em estufa microbiológica. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Métodos analíticos

Os compostos voláteis produzidos após fermentação foram analisados através da técnica SPME de acordo com o procedimento descrito por Nascimento Junior *et al*¹². Amostras de 0,250 g do mosto fermentado foram transferidas para frascos de vidro com capacidade de 40 mL, contendo 10 mL de solução salina de NaCl (25% - p/v), hermeticamente fechado com tampa de polipropileno e septo de teflon/silicone. O conjunto foi imerso em banho com temperatura controlada a 80 °C e mantido sob agitação magnética. A seringa de SPME foi introduzida pelo septo, expondo-se a fibra adsorvente acima da matriz (aproximadamente 3 cm) durante 30 minutos. Após a extração, os voláteis sofreram dessorção térmica a 250 °C por 5 minutos no injetor do cromatógrafo à gás (VARIAN, modelo 3800, FID, coluna CP Sil DB-5 – 30 m, 0,25 µ, 0,25 mm). As análises foram realizadas utilizando-se a temperatura inicial da coluna de 40 °C por 5 minutos, aumentando-se gradativamente de 10 °C por minuto até atingir 150 °C, onde permaneceu por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 °C, empregando como gás de arraste o nitrogênio na vazão de 5,0 mL por minuto em sistema de injeção *splitless*. Todo o procedimento foi repetido para cada uma das fibras.

Resultados e discussão

A figura 1 abaixo mostra os três tempos de fermentação monitorados (24, 48 e 72 h), onde pode-se observar o decaimento da concentração dos compostos voláteis produzidos evidenciado pela diminuição das áreas de vários picos monitorados.

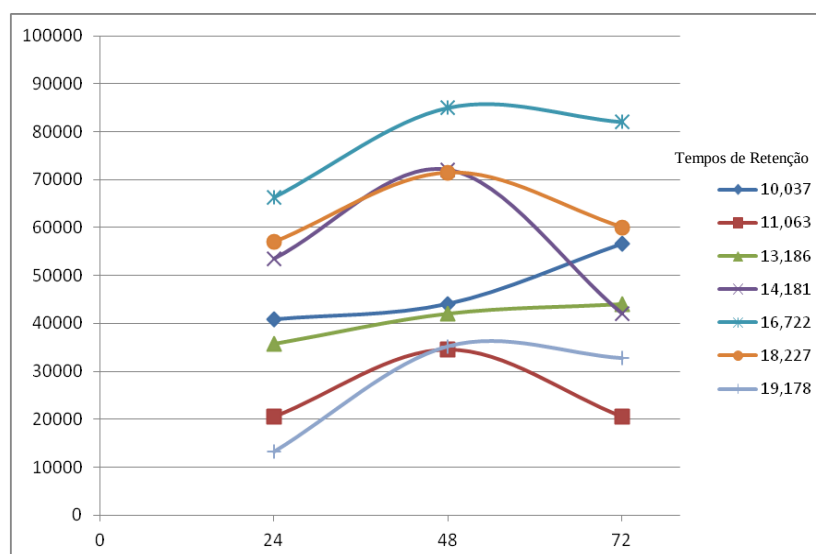


Figura 1. Comparação entre os tempos de (24, 48, 72 h)

Foi observada uma tendência em formar os compostos voláteis nas primeiras 48 h de fermentação, havendo um declínio na concentração, evidenciado pela diminuição da área dos picos após esse período devido ao consumo do substrato ou a presença dos metabólitos, que pode ter sido prejudicial para o desenvolvimento dos microrganismos dificultando a síntese de novos compostos. As variações nas concentrações dos compostos voláteis durante o período fermentativo podem ter sido ocasionadas por perdas durante a manipulação das amostras, como nas etapas de extração e concentração e também podem ter sido ocasionadas pela presença dos metabólitos que poderiam ter prejudicado o desenvolvimento microbiano inibindo a produção dos mesmos. Rodríguez-Bustamante *et al.*¹³ observaram que a β -ionona, principal produto de degradação de β -caroteno, 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.

Sánchez-Contreras *et al.*¹⁴, observaram uma produção máxima de 8 mg L⁻¹ de compostos de aromas 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.*¹⁵ 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).

Portanto, o tempo de 48 h de fermentação foi adotado para seguir com o teste das fibras. Como o objetivo dessa fermentação foi a produção de metabólitos associados ao crescimento, esse tempo de fermentação ideal, diminuiu sensivelmente o tempo de extração e análise dos compostos.

A comparação da eficiência de extração das fibras foi realizada em relação ao número de picos referentes às substâncias discriminadas e aos tempos de retenção. Foi consideravelmente mais eficiente a fibra CAR-PDMS, uma vez que o número de compostos voláteis identificados pelo CG foi maior (Tabela 1).

A fibra Carboxen-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) possui uma grande área superficial, é bipolar e por isso a literatura indica seu uso para as mais variadas amostras, que vão desde matrizes vegetais, como folhas secas e fresca, frutos, óleos essenciais, condimentos, tais como alho e pimentões, além de voláteis de culturas de fungo e de produtos alimentícios, como voláteis de queijo, empregando temperatura que vão desde a ambiente até 80 °C, dependendo da matriz sendo também capaz de resistir a altas temperatura no injetor (250 °C).

Tabela 1. Tempos de retenção dos compostos monitorados durante o teste das fibras

Tempo de Retenção do pico* (min.)	CAR - PDMS	PDMS - DVB	PA	PDMS
8,224	X			
9,017		X	X	
11,353			X	
13,186	X			X
14,181	X			X
16,722	X			
16,919		X	X	
17,054	X			X
17,659	X	X		
18,361	X	X		X
18,555		X	X	
19,178	X		X	
19,545	X			
19,940	X	X		

*em tempos de análises distintos (24 h, 48 h e 72 h)

Considerações Finais

A microextração em fase sólida (SPME), seguida da cromatografia gasosa, mostraram-se adequadas na extração de compostos voláteis. A fibra CAR-PDMS foi a que apresentou maior eficiência na extração dos compostos voláteis produzidos por fermentação em fase sólida utilizando o fungo *Aspergillus niger*, no tempo de 48 h de incubação.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *Campus* de Itapetinga-BA e Jequié-BA.

Referências Bibliográficas

- [1] KRING, U.; BERGER, R.G.; Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.49, p. 1-8, 1998.
- [2] JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 195-215, 1992.
- [3] MARQUES, D. B. Produção e caracterização de aromas de frutas por *Pichia membranaefaciens*. 1998. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- [4] ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. *Journal of Chromatography A*, v. 847, 155-159, 1999
- [5] SARHY-BAGNON, V. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 1-2, p. 103-109, 2000.

- [6] SOMOGY L. P., RHOMBERG B., TAKEI N. 1995 report Obtido de <http://wwwcmrc.sri.com/CIN/JanuaryFebruary96/Article12.htm>
- [7] ABIFINA – Associação Brasileira da Indústrias de Química Fina. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/notas-mercado-de-aromas-e-fragrancias-apresenta-crescimento-1060.asp>. Acesso em 20/01/2012.
- [8] SOARES, M., CHRISTEN, P., PANDEY, A., & SOCCOL, C. R. (2000). Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 35, 857– 861.
- [9] MADRUGA, MS. Studies on some factors affecting meat flavour formation [Tese de Doutorado]. Reading, University of Reading, England, UK, 1994.
- [10] WARDENCKI, W., MICHULEC, M., CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 703-717, 2004.
- [11] ARTHUR, C. L., PRATT, K., MONTLAGH, S., PAWLISZYN, J. Environmental analysis of organic compounds in water using solid phase micro extraction. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 741-744, 1992.
- [12] NASCIMENTO JUNIOR, B. B.; REZENDE C. M.; SOARES, A. G.; FONSECA, M. J. de O. Efeito do 1-metilciclopropeno sobre a emissão dos ésteres voláteis de bananas ao longo do amadurecimento. *Quím. Nova*, v. 31, n.6, p. 1367-1370, 2008.
- [13] 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.
- [14] SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHES, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 54, n. 4, 528-534, 2000.
- [15] 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.