

# Aromas E BIOTECNOLOGIA

Os aromas são aditivos alimentares responsáveis por até 90% do cheiro e do sabor dos alimentos industrializados. Avanços recentes na área de biotecnologia proporcionaram novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de aromas.

## OS AROMAS

Os aromas sempre fizeram parte da história da humanidade. Nos primórdios da civilização, tinham a função de verificar se um alimento não estava estragado ou diferenciar plantas nocivas das comestíveis. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico na área de alimentos, os aromas assumiram a função de melhorar a qualidade sensorial dos alimentos. Grande parte do sabor de um alimento é diretamente influenciado pelo seu aroma. Em meio a uma grande quantidade de opções e novos alimentos surgindo no mercado, são as características diferenciais que garantirão a aceitação do produto pelo consumidor.

Os aromas dão sabor e odor aos alimentos industrializados. Sem eles, enlatados, congelados, empacotados e desidratados não teriam nenhum atrativo, já que os processos industriais e de armazenamento destroem grande parte do sabor original.

Além da inovação em equipamentos, a indústria alimentícia tem utilizado

aditivos cada vez com maior frequência, com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor e modificar ou manter seu estado físico geral.

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

A maior parte dos alimentos consumidos contém, em sua composição, substâncias aromáticas no seu estado *in natura* ou outras formadas através da preparação ou cocção do alimento. O uso dos aromas é diferente do uso dos demais aditivos, já que ao contrário destes, precisam ser notados pelo consumidor, pois são responsáveis pela caracterização do sabor do produto a ser ingerido. Seu emprego também está diretamente ligado ao prazer de comer e beber, satisfazendo os paladares mais requintados ou contribuindo para a ingestão de alimentos de alto

valor nutritivo, porém, de sabor não muito atrativo.

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

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

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

Nesta classe de aditivos é onde existe o maior número de substâncias, uma vez que os aromas são muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de 1.000 substâncias que, em conjunto, conferem um aroma característico. Um exemplo é o aroma natural de café. O café torrado apresen-

ta um aroma tão complexo que já foram identificados mais de 1.000 componentes na sua constituição.

Os aromatizantes aumentam a aceitabilidade dos alimentos, melhorando o seu aroma; desde o século XIX são sintetizados numerosos aromatizantes químicos. A cumarina foi sintetizada em 1868; o aroma de baunilha em 1874; em 1884 sintetizou-se o aroma de canela. Até o século XX foram descobertos quase 1.000 agentes químicos aromatizantes. Estão catalogadas mais de 3.000 substâncias simples voláteis que podem ser utilizadas para compor os mais variados aromas que existem na natureza. O mel apresenta um aroma composto por mais de 200 aromas individuais; a maçã apresenta em seu aroma mais de 130 componentes individuais, voláteis.

Os aromas são formados por substâncias químicas, como ésteres, ácidos, cetonas, aldeídos, alcoóis e terpenos, utilizados em quantidades mínimas, que não se relacionam com o valor nutricional do alimento. Por ser neutro em relação à base, tecnicamente, um aroma de pêssego pode ser aplicado tanto no amaciante de roupas como no iogurte.

A maioria dos aromas consumidos hoje são "idênticos aos naturais", como são classificados os aromas sintéticos que possuem as mesmas moléculas aromáticas dos naturais. A diferença entre um idêntico e um autêntico está no método de obtenção dessas moléculas. Enquanto nos aromas naturais as moléculas são obtidas a partir de produtos de origem animal ou vegetal, por processos físicos, os demais são criados por reações químicas

TIPOS DE AROMAS E SUAS APLICAÇÕES		
Aditivo	Alimentos em que podem ser adicionados	Limite máximo g/100g - g/100ml
Aromas artificiais	Creme vegetal	q.s.q.
	Gorduras para fins industriais	q.s.q.
	Iogurtes aromatizados	q.s.q.
	Leites aromatizados, leites gelificados aromatizados	q.s.q.
	Leites fermentados	q.s.q.
	Licores	q.s.q.
	Margarinas	q.s.q.
Aroma natural de fumaça	Produtos de pescado defumado (somente nos tipos consagrados)	0,009
	Queijos defumados (como reforço nos tipos consagrados)	0,009
Aroma natural, aroma idêntico ao natural	Açúcar (somente aroma idêntico ao natural)	q.s.q.
	Aguardentes compostas	q.s.q.
	Batidas	q.s.q.
	Bebidas alcoólicas mistas	q.s.q.
	Chás (preparações para infusões ou decocções)	q.s.q.
	Conhaque	1,0
	Cooler	q.s.q.
	Creme vegetal	q.s.q.
	Frutas em conservas	q.s.q.
	Geléias e doces de frutas	q.s.q.
	Gorduras e compostos gordurosos	q.s.q.
	Iogurtes aromatizados	q.s.q.
	Leites aromatizados, leites gelificados aromatizados	q.s.q.
	Leites fermentados	q.s.q.
	Licores	q.s.q.
	Margarinas	q.s.q.
	Néctares de frutas (somente aromas naturais)	q.s.q.
	Picles (somente aromas naturais)	q.s.q.
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit suisse e similares	q.s.q.
	Produtos derivados de soja	q.s.q.
Queijos aromatizados e/ou condimentados	q.s.q.	
Sangria	q.s.q.	
Suco de frutas concentrado (somente aromas naturais)	q.s.q.	
Suco de frutas reprocessado (somente aroma idêntico ao natural)	q.s.q.	
Uísque	1,0	
Vinhos compostos	q.s.q.	
Etil vanilina sintética (aroma imitação de baunilha)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	0,007 (base seca)
	Alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância	0,007 no p.s.c.
Extrato de baunilha	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	q.s.q.
	Alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância	q.s.q.
Vanilina natural (aroma natural de baunilha)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	0,007 (base seca)
	Alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância	0,007 no p.s.c.
Vanilina sintética (aroma imitação de baunilha)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	0,007 (base seca)
	Alimentos de transição para lactentes e crianças de primeira infância	0,007 no p.s.c.

cas de síntese em laboratórios. Quando essa síntese dá origem a moléculas que não existem na natureza, os aromas são considerados artificiais.

Os bioaromas são outra categoria técnica. Obtidos pela fermentação de fungos, são considerados naturais. Existem mais de 3.000 microorganismos,

entre fungos, bactérias e leveduras, que são cultivados nos mais diferentes meios para a produção de aromas. Além disso, existem mais de 6.000 moléculas aromáticas conhecidas.

A Tabela acima apresenta os tipos de aromas e suas aplicações no setor alimentício.

### A BIOTECNOLOGIA APLICADA AOS AROMAS

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

Baseada na história e na avançada experiência dos métodos de bioengenharia e engenharia genética de fermentações em escala industrial de aromas não voláteis, como ácidos orgânicos ou aminoácidos bioprocessados, a geração de aromas voláteis recebeu maior atenção nos últimos anos.

Entre as origens desta tendência estão a crescente demanda da indústria alimentícia por aromas voláteis, relacionada a uma crescente fatia do mercado por alimentos termicamente processados e pela preferência do consumidor por produtos intensamente aromáticos; a decrescente disponibilidade de determinadas fontes naturais, devido a problemas agrícolas ou ecológicos nos países produtores; e a falta de alternativas quimiossintéticas convincentes. As propriedades fisiológicas de muitas substâncias químicas dos aromas dependem de uma regioespecificidade ou estereoespecificidade precisas, que podem ser obtidas com o uso de substratos e reações específicas altamente (bio) catalisadoras, não usando, porém, uma aproximação quimiossintética multipasso. Além disso, a compatibilidade ambiental do bioprocessamento, que normalmente precede uma fase aquosa, é considerada superior. Além disso, em muitos países, regulamentos legais distinguem aroma "natural" dos demais; produtos obtidos por bioprocessos são classificados como "naturais", o que resulta em maior valor no mercado. Outro fator, é que muitos consumidores tendem a rejeitar alimentos que contêm aditivos não-naturais. Esta alta estima com relação ao atributo "natural" na indústria alimentícia é ilustrada pelo fato de que os produtos quimiossintéticos somam 90% de todos os aromas e fragrâncias químicas mundiais; inversamente, 2/3

dos aromas processados pela indústria alimentícia alemã são rotulados de "naturais".

### OS BIOAROMAS

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

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

O elemento-chave incluiu um selecionado biocatalisador capaz de executar, em uma única etapa, a transformação de um substrato, ou a sua conversão em múltiplas etapas, que tem início com o metabólito intermediário, ou uma síntese dos nutrientes básicos de uma fermentação, em um controlado e aperfeiçoado processo técnico. Microrganismos alimentícios clássicos ou geneticamente modificados e misturas de modelos que imitam alimentos foram os pontos de partida para o desenvolvimento de novos processos. Porém, a maioria dos aromas usados em alimentos processados industrialmente depende do potencial biossintético das células das plantas.

### BIOCATALISADORES DE CÉLULAS VEGETAIS

Após o sucesso do primeiro cultivo submerso de células vegetais nos anos de 1950, surgiram revisões na sua exploração comercial. O uso biotecnológico de células vegetais rompe o arranjo celular altamente estruturado de uma planta

inteira, transferindo as células para um ambiente estéril de divisão ilimitado. Esse processo envolve o tratamento do tecido da planta com fitoatuadores e a conversão da crescente calosidade em uma suspensão finamente espalhada para subcultivo em biorreatores.

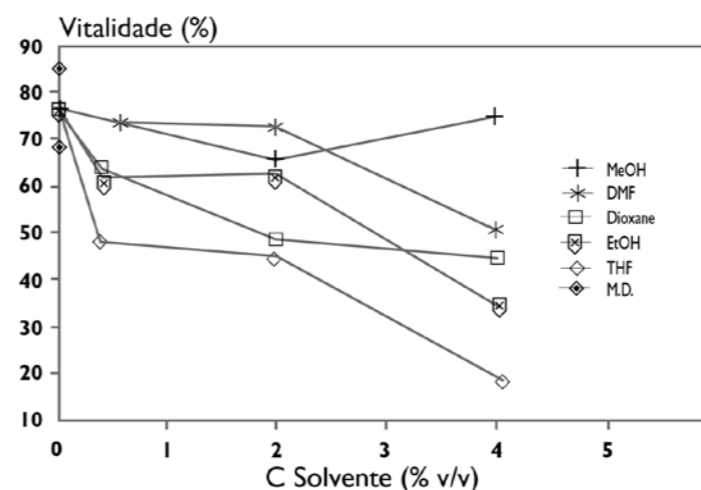
A substância química uniforme em ambientes físicos, a ausência da comunicação intercelular, e os estímulos de crescimento sintéticos, induzem a uma troca do metabolismo da célula para rotas primárias. Como resultado, *in vitro*, é comum que as células produtoras de aromas não contenham qualquer aroma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

### SUBSTRATOS EXÓGENOS E A VITALIDADE DAS CÉLULAS

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

Durante estudos para transformação de  $\beta$ -caroteno exógeno em células vegetais suspensas, vários solventes provaram ser úteis, sendo sua biocompa-

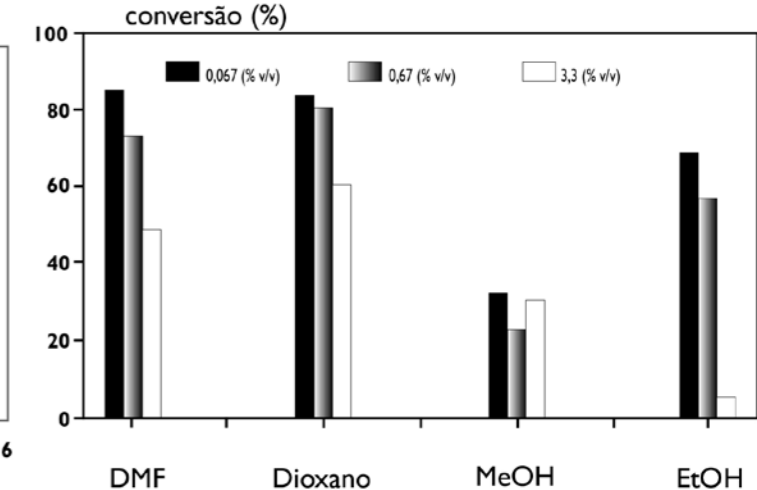
FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE SOLVENTES E VITALIDADE DAS CÉLULAS SUSPENSAS DE LIMON CITRUS



tibilidade examinada. Todos os solventes escolhidos afetaram a vitalidade das células de limões, na fase estacionária, após uma exposição de cinco horas; metanol, dimetilformamida, dioxano e etanol, foram os mais compatíveis (veja Figura 1). Em concentrações mais altas (> 2% v/v), o metanol apresentou efeitos menos tóxicos do que o etanol, mas estabilizou a vitalidade da célula. O tetrahydrofurano representou o grupo de solventes mais tóxicos. O comportamento inesperado das células tratadas com metanol e a perda da correlação entre estes resultados, além da constante dielétrica dos solventes, necessitam de um estudo mais aprofundado.

A bioconversão do exógeno geraniol em álcool monoterpene, característica presente em muitas culturas de células

FIGURA 2 - EFEITO SOLVENTE NA TAXA DE CONVERSÃO DE GERANIOL EXÓGENO PARA TERPENÓIS POR CÉLULAS SUSPENSAS DE LIMON CITRUS



em suspensão, foi selecionado como uma característica metabólica para estudar a sensibilidade das enzimas das plantas envolvidas. Utilizando as mesmas espécies e condições de cultivo nos testes microscópicos de vitalidade, os efeitos adversos do etanol foram confirmados, enquanto, em contraste, o metanol foi observado como não sendo superior a dimetilformamida ou ao dioxano (veja Figura 2). Utilizando as mesmas condições de cultivo, mas em células suspensas de maçãs, um quadro diferente foi obtido: o etanol foi superior ao metanol em concentrações inferiores, e o dimetilformamida e o dioxano exibiram efeitos inibitórios em concentrações crescentes (veja Figura 3). O estudo concluiu que somente em muito baixas concentrações de dimetil-

formamida e dioxano e, para menores extensões, o etanol foi tolerado sem reduzir significativamente as atividades celulares.

Células suspensas de limão foram tratadas com várias concentrações de 1% v/v dioxano para eliminar a toxicidade do geraniol aplicado (veja Figura 4). Além das concentrações usadas nas experiências anteriores (8,7  $\mu$ M), o limiar crítico, determinado como a vitalidade das células na fase estacionária, estava na gama de 2 a 3 mM de geraniol. Foram encontrados valores limite semelhantes em suspensões de *Pelargonium fragrans* providos com limoneno ou terpenóides.

Por outro lado, as concentrações milimolares de componentes de óleo essencial foram prejudiciais, inclusive, após um curto prazo de exposição; o

FIGURA 3 - EFEITO SOLVENTE NA TAXA DE CONVERSÃO DE GERANIOL EXÓGENO PARA TERPENÓIS POR CÉLULAS SUSPENSAS DE MALUS SILVESTRIS

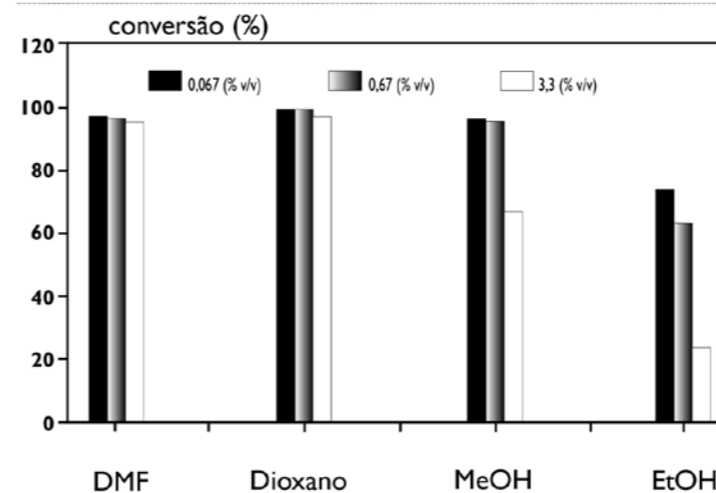
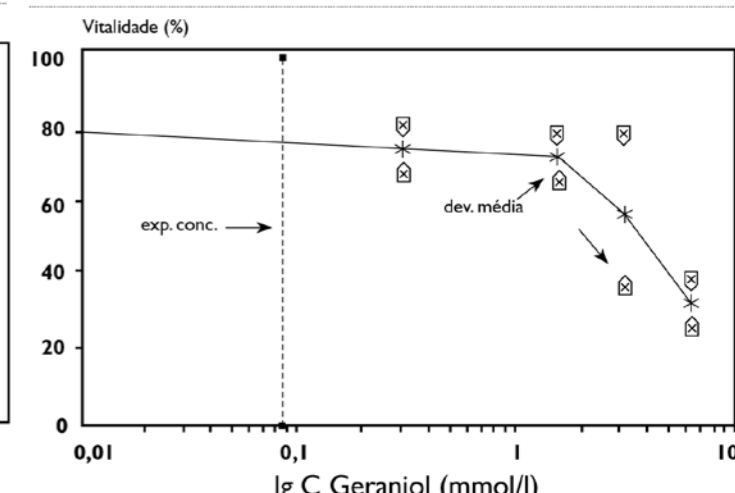


FIGURA 4 - EFEITOS DO GERANIOL NA VITALIDADE DAS CÉLULAS SUSPENSAS DE LIMON CITRUS



acúmulo de quantidades significantes de nutrientes no crescimento das culturas, como era esperado, deve ser claramente excluído.

O metabólito de plantas de interesse comercial é, frequentemente, armazenado intracelularmente. Para superar esse problema, particularmente em células imobilizadas, foi introduzido dimetil-sulfóxido (DMSO) como agente permeabilizante; células de *Catharanthus roseus*, permaneceram viáveis nas condições de crescimento aplicadas. Porém, pesquisas sobre *Cinchona ledgeriana* em suspensão apresentaram resultados opostos. Concentrações de DMSO correlataram com o aumento da liberação do produto e com danos as células; muitas das membranas permeabilizadas não recuperaram sua integridade. A atividade extracelular de peroxidase (POD), e a alta atividade em muitas suspensões de células, foi medida por um marcador metabólico (veja Figura 5). Após quatro horas de incubação na presença de 0,1% v/v de DMSO, o total de atividade peroxidase foi notavelmente reduzido; em concentrações maiores de solvente, foram observadas atividades inferiores e redução da vitalidade das células. As sensibilidades relativas da fase tronco e fase estacionária das células foram bastante semelhantes. Outras técnicas de ceifa, como eletroporação ou ultrasonificação foram menos destrutivas.

### ALTERNATIVAS À ACUMULAÇÃO SINTÉTICA

A toxicologia e, em maior escala, os problemas de segurança com solventes orgânicos, induziram a procura por locais alternativos de acumulação sintética nas fases lipofílicas. Os efeitos benéficos em rendimento de triglicerídeos definidos, ou de RP-8 sílica gel, podem ser interpretados como uma proteção eficiente aos rastros

de metabólitos segregados do subsequente catabolismo ou de perdas de evaporação. Previne-se, por exemplo, os efeitos citotóxicos da acumulação de terpenos, o qual retifica a planta inteira através da secreção em estruturas especializadas de armazenamento. O Miglyol, um triglicerídeo sintético, foi prosperamente adicionado às células suspensas de camomila e de uva. Já com o uso de culturas de células de maçã e de limão, a inércia metabólica necessária não pôde ser confirmada, demonstrando os riscos de uma generalização de resultados. Quando as células de maçã da fase tronco foram incubadas na presença de Miglyol, um amplo espectro de metabólitos acil voláteis foram isolados do meio nutriente. A estrutura dos produtos, o tempo de formação, e a experiência paralela utilizando os ácidos graxos livres, correspondem a uma atividade precursora direta dos triglicerídeos exógenos em lipólises. Células de limão

oligômeros podem ser resolvidos por procedimentos de corrente térmica ou purificação química. Um estudo comparativo utilizando um sistema modelo de célula livre mostrou que alguns dos materiais voláteis de referência, eficientemente removidos, compõem o meio nutriente.

### MELHORA NUTRICIONAL

Enquanto técnicas aprimoradas de acumulação ainda estão sendo desenvolvidas, a chave para o sucesso comercial continua sendo o desafio científico. A estratégia convencional tem sido variar e modificar o ambiente químico da célula. Embora demorado e um pouco fortuito, estes esforços obtiveram alguns resultados positivos como, por exemplo, substratos menos dispendiosos, como soro penetrante ou xarope de milho, e com um meio mais adequadamente divisor, os agentes gelificantes para culturas de calosidades, condicionando fatores e elicitores.

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

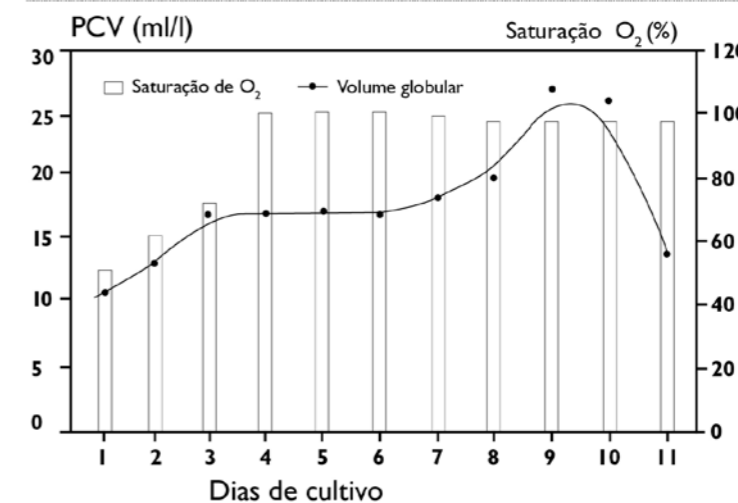
Células suspensas de pêra, cultivadas em um reator de transporte aéreo, foram usadas livremente para demonstrar o stress imposto por concentrações elevadas de oxigênio (veja Figura 6). As células da fase tronco deixaram de crescer quando a concentração limite foi excedida. Entre o quarto e sexto dias, a hidrólise da sacarose permaneceu, mas o crescimento sofreu inibição. Após esta longa fase de adaptação, chamada de

“última fase secundária”, o crescimento e o consumo de glicose tiveram início novamente. O uso de gás capilar cromatográfico com solvente revelou a presença de alguns odores no ar. A concentração de oxigênio dissolvida não é um fator crucial para apoiar a respiração do transporte aéreo no cultivo de células, contudo um perfil de oxigênio cuidadosamente controlado pode ajudar a estabelecer condições de aumento da produção de voláteis.

Embora a sacarose tenha hidrolisado completamente após três dias, a atividade de  $\beta$ -frutoseidase permaneceu alta até o sétimo dia (veja Figura 7). Em paralelo, culturas de células suspensas de limão cresceram muito lentamente. Baseado em um modelo de célula recentemente desenvolvido, a baixa atividade inicial de  $\beta$ -frutoseidase foi sugerida como a causa. As atividades medidas foram, porém, duas vezes mais altas, em média, comparadas com pêra e hortelã, sendo mantidas além do décimo dia sem razão fisiológica aparente.

Foram monitoradas as concentrações de componentes iônico na mesma suspensão de pêra. Com exceção da

FIGURA 6 - CÉLULAS DE PYRUS COMMUNIS CULTIVADAS EM TRANSPORTE AÉREO E O EFEITO NA FASE SECUNDÁRIA



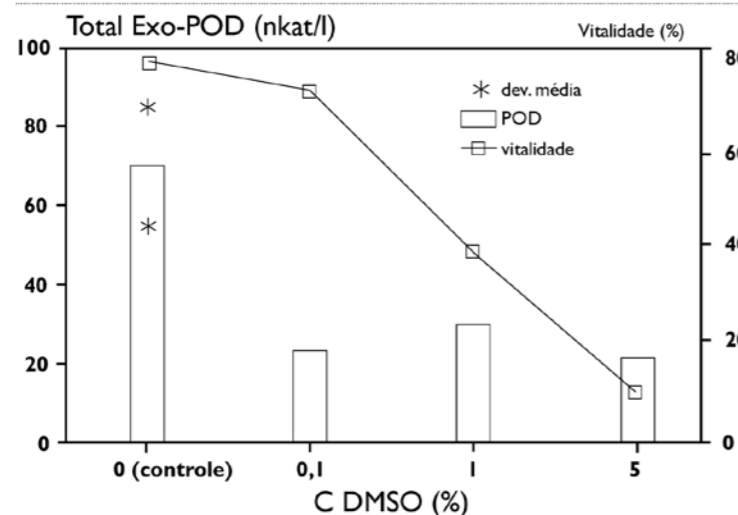
Pi, as concentrações de todos os íons quantificados permaneceram praticamente inalteradas durante o ciclo de crescimento completo. Menos de 20% da concentração férrea inicial e menos que 10% do cálcio e magnésio sofreram aumento. Valores de nitrato e de amônia apresentaram aumentos fracos durante a fase tronco, e a concentração de nitrato caiu somente na fase estacionária, resultando em um fraco aumento de amônia (veja Figura 8). O crescimento, às vezes, mais lento das células em biorreator e os efeitos da pré-cultura podem responder por um consumo reduzido de nutrientes. O efeito adverso de uma alta concentração de substratos na formação

de metabólito secundário foi substanciado, persistindo a linha de célula de tabaco em baixos níveis de Pi interno. Pode ser preditos efeitos semelhantes em formação secundária de outros componentes iônicos reguladores de nutrientes, como o cálcio.

### METABOLISMO DOS MONOTERPENOS

Desde que a instabilidade metabólica e o desempenho biológico dos terpenos voláteis foram mais amplamente reconhecidos, os isoprenóides já não podem ser considerados produtos finais inertes do metabolismo das plantas. Isso conduziu a um novo ponto de vista sobre as razões pelas quais a maioria das culturas de células em suspensão não acumulam quantidades significativas de componentes de óleos essenciais. Mais importante do que a existência de enzimas ativas fundamentais e locais especializados de armazenamento, é a remoção insuficiente das atividades catabólicas dentro das células. Isso levanta a questão de como atingir um estado de citodiferenciação (diferenciação entre células

FIGURA 5 - EFEITO DO DMSO NA VITALIDADE DE CÉLULAS SUSPENSAS DE MALUS SYLVESTRIS



produziram um espectro semelhante ao éster, mas nenhum álcool, nem lactona, apenas indícios de aldeídos. O transbordamento metabólico em adição à fonte excessiva, dá origem a esta formação de voláteis. Até mesmo metabólitos não encontrados na planta inteira, como a lactona, podem ocorrer nesta situação metabólica desequilibrada.

Recentemente, foram introduzidos polímeros lipofílicos sólidos em sistemas de células de plantas. Problemas citotóxicos de monômeros e contaminantes de

FIGURA 7 - ATIVIDADE DE INVERTASE DE PYRUS COMMUNIS

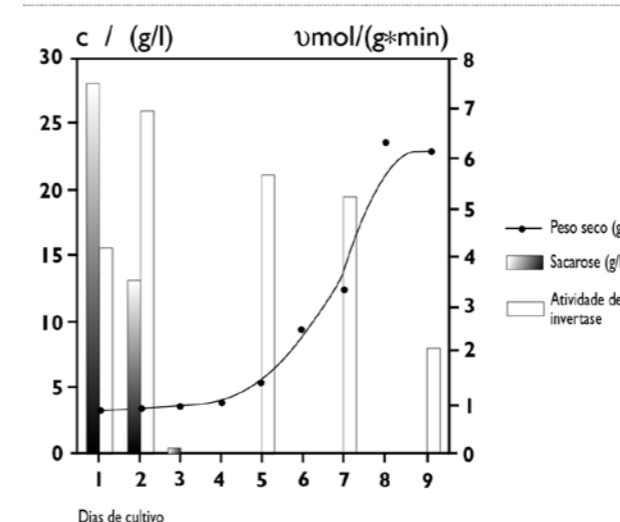
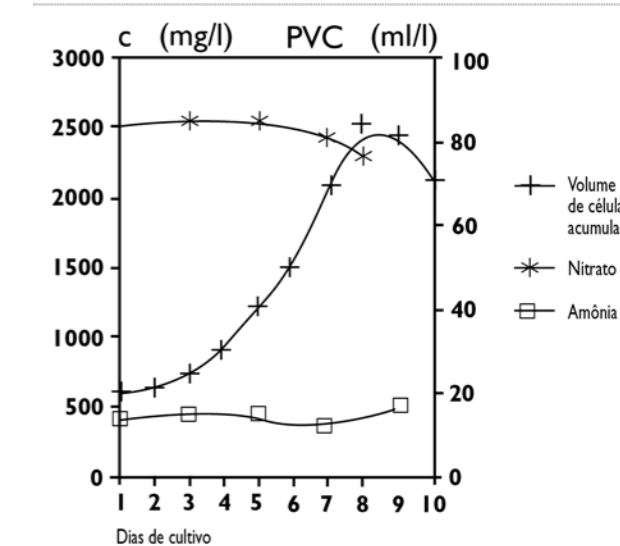


FIGURA 8 - CULTIVO DE CÉLULAS EM TRANSPORTE AÉREO DE PYRUS COMMUNIS E O CURSO DE TEMPO DE CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E DE AMÔNIA



causada por alterações nas células e não através de mudanças nos seus cromossomos) que favoreça a estabilidade intracelular; assim, o tipo de local alternativo de acumulação pode armazenar somente a proporção extracelular, contribuindo indiretamente para aumentar o rendimento através de equilíbrios intracelulares de troca para o produto desejado. Esta visão é apoiada na diminuição rápida, frequentemente observada nos monoterpenos exógenos, em aplicações de culturas regulares de células. Em alguns casos, foram encontrados produtos voláteis de conversão; estes sofrem uma fase de acumulação passageira e, então, da mesma forma que o substrato original, também desaparecem, normalmente dentro de horas.

Para elucidar a estrutura de alguns dos produtos de degradação intermediária, o geraniol foi adicionado às células suspensas de limão. Um catabolismo rápido foi registrado e, ao mesmo tempo, foram formados ácidos gerânico e citronílico, seguido pela rápida acumulação de formas ramificadas e não ramificadas de ácidos graxos. Uma ação combinada de enzimas de  $\alpha/\beta$ -oxidação nos ácidos terpênicos resultaram em um aumento de acetil CoA, o que explica o curso de tempo de formação e a estrutura do produto. Como o meio nutriente é uma fonte rica de oxidases e hidrolases, esse catabolismo pode ter iniciado no comportamento do ciclo lítica extracelular.

#### Fotomixotrofia

Determinações quantitativas mostram que a glicosilação de mentol e de alguns fenóis são estimuladas pela luz. Evidências na literatura e considerações fisiológicas conduzem à suposição de que a formação de outros metabólitos voláteis também pode ser ampliada através da luz. As altas densidades de células fotoheterotróficas utilizam condições que se assemelham a existência de raiz em células. De fato, muitos relatórios sobre a produção secundária de metabólito em culturas de células vegetais

recorrem a alcalóides, tipicamente em raiz sintetizada, em plantas inteiras. A síntese de terpenos voláteis, fenilpropanóides ou combinações alifáticas, através de contraste, é frequentemente associado com as partes verdes da planta.

Um trabalho pioneiro em tabaco estabeleceu, fotoautotroficamente, condições de crescimento *in vitro* em células de plantas. A habilidade genuína de uma célula em sintetizar materiais orgânicos complexos que usam CO<sub>2</sub> e luz é obviamente extremamente econômica. Foram realizadas muito poucas tentativas de explorar este potencial para aplicações comerciais. Um olhar mais aprimorado em relatórios de células voláteis de plantas *in vitro* revelam que a maioria destas culturas heterotróficas tiveram crescimento na luz. Recentemente, foram publicadas comparações quantitativas de culturas com crescimento no escuro e na luz, indicando um efeito significativo de luz na formação de voláteis. Embora diferentes mecanismos de fitocromo possam ser envolvidos e, embora a acumulação de clorofila necessariamente não esteja relacionada com a acumulação de terpenóides inferiores, o papel essencial desempenhado pela luz não pode ser mais negligenciado.

A indução de luz citodiferencial e a acumulação de mono e sesquiterpenos foi recentemente relacionada em culturas de células mixotróficas de *Coleonema album*, uma *Rutaceae*. Em talos e folhas foram detectados 41 voláteis, principalmente terpenos e fenilpropanóides. A Z- $\beta$ -ocimere e a myrcene foram os principais monoterpenos encontrados, enquanto o  $\alpha$ -guajene foi o sesquiterpeno mais abundante, e o eugenol, a combinação fenólica mais abundante.

Células fotoheterotróficas e mixotróficas não contêm nenhum volátil. Em um meio modificado que contém uma auxina fraca e uma alta concentração de cinetina, a produção de óleo essencial é iniciada nas células verdes, enquanto as células escuras permaneceram improdutivas.

$\beta$ -felandreno e  $\delta$ -selinene foram os voláteis mais proeminentes da cultura em luz; numerosos terpenóides e voláteis não identificados contribuíram para o espectro de voláteis.

As culturas de *Coleonema* não exibiram, microscopicamente, diferenciação morfológica visível em luz. A microscopia de elétron mostrou que as células contêm uma população heterogênea de plastídeos. Nunca foram vistos cloroplastos e leucoplastos na mesma célula; as gotículas osmiofílicas descobertas em alguns leucoplastos eram, em um estudo anterior simulado, representadas por terpenos.

## CONCLUSÃO

Atualmente, a aplicação industrial de modernas biotecnologias de plantas na indústria alimentícia é limitada a micropropagação clonal e a seleção de plantas com desempenho aprimorado. A alteração das propriedades sensoriais de materiais alimentícios através da manipulação genética já é conhecida. Os processos em operação que utilizam células vegetais apontam para a produção de metabólitos interessantes. Contudo, o conhecimento mais aprofundado dos caminhos que levam à formação de voláteis de plantas e dos fatores relacionados que os afetam se faz necessário para o desenvolvimento mais combinado de processos. Parâmetros que conduzem reproduzivelmente a acumulação e secreção do produto precisam ser identificados.

Pelo menos seis células de plantas *in vitro* estão posicionadas na ordem de magnitude maior que algumas bactérias; estas células contêm três genomas diferentes por célula e são derivadas de um macrorganismo altamente complexo.

A especial fisiologia das células vegetais ajudará a bioengenharia a estabelecer aromas adicionais em culturas produzidas em escala laboratorial, o que poderá induzir o grau de pesquisas industriais com relação ao cultivo de células vegetais.