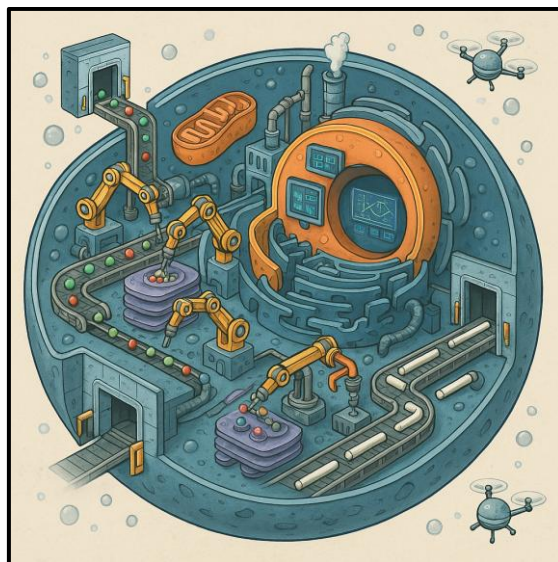


## Graphical Abstract



Flavor & Fragrance industry makes use of nature's chemistry to make the processes of obtaining ingredients more sustainable.

## **BIOTECNOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE INGREDIENTES MAIS SUSTENTÁVEIS NA INDÚSTRIA DE AROMAS E FRAGRÂNCIAS**

**Osmar Vieira Machado Junior <sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

\*e-mail: osmar.jr.95@gmail.com

---

## BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING MORE SUSTAINABLE INGREDIENTS IN THE FLAVOR AND FRAGRANCE INDUSTRY

Flavors and fragrances are essential components in a wide range of consumer products, significantly influencing consumer perception despite their small quantitative presence. Traditionally sourced through natural extraction or chemical synthesis, these ingredients face challenges such as low yields, high environmental impact, and supply chain instability. The growing demand for sustainable and natural products has intensified interest in alternative production methods. Biotechnology emerges as a promising solution, offering environmentally friendly and economically viable approaches to aroma and fragrance synthesis. Through microbial fermentation and biocatalysis, it is possible to produce high-value compounds using renewable feedstocks under mild conditions, with greater selectivity and reduced waste. Advances in metabolic engineering and synthetic biology have enabled the development of genetically modified microorganisms capable of producing complex aroma molecules, mimicking or even surpassing natural profiles. This biotechnological approach not only addresses sustainability concerns but also enhances supply security and product consistency. As the global market for flavors and fragrances continues to expand, biotechnology stands out as a key enabler for greener, safer, and more efficient ingredient production.

Keywords: Flavor; Fragrance; Biotechnology; Enzyme.

## INTRODUÇÃO

Aromas e fragrâncias são encontrados em uma ampla variedade de bens de consumo: alimentos e bebidas, perfumes, produtos farmacêuticos, cosméticos, sabonetes, produtos domésticos, etc. Embora geralmente representem apenas uma pequena fração quantitativa do produto final, esses desempenham um papel importante na percepção qualitativa deste pelos consumidores. Desde a introdução da vanilina e da cumarina no mercado no século XIX, a demanda global por aromas e fragrâncias tem aumentado constantemente. Em 2002, o mercado global era de US\$ 15,1 bilhões, então subiu para US\$ 18 bilhões em 2006 e atingiu US\$ 25,9 bilhões em 2021. Em 2022, atingiu US\$ 29,27 bilhões. Prevê-se que o mercado global dessa indústria ultrapassará US\$ 35 bilhões em 2028. Ainda, as projeções sugerem que o mercado deverá crescer para aproximadamente US\$ 48,82 bilhões até 2032. Um dos fatores associados à expansão do mercado é a crescente inovação no setor cosmético e a demanda cada vez maior por aromas e fragrâncias naturais.<sup>1-7</sup>

Hoje, mais de 3.000 moléculas são usadas para fabricar produtos que estimulam nossos sentidos de olfato e paladar.<sup>1</sup> Sabores e fragrâncias são compostos orgânicos que interagem com nosso paladar e sentidos olfativos para trazer um prazer geral dos produtos.<sup>8-10</sup> A maioria dessas moléculas pertence a grupos de compostos, incluindo aromáticos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, ésteres, pirazinas, terpenos e lactonas.<sup>11</sup> Também, podem ser categorizados como naturais, idênticos aos naturais e artificiais.<sup>10</sup> Os naturais são diretamente isolados de recursos naturais, como plantas ou animais. Os idênticos aos naturais têm a mesma composição química que os naturais, mas são produzidos sinteticamente por meio de métodos químicos ou biotecnológicos. Já os compostos classificados como artificiais são sintéticos que não existem na natureza.<sup>3</sup>

A grande maioria dos compostos utilizados no mercado são extrações naturais ou sintetizados quimicamente.<sup>10</sup> A extração direta de fontes naturais, como plantas, representa a prática original de produção de aromas e fragrâncias naturais. As técnicas convencionais para

capturar os compostos-alvo utilizam métodos de separação, incluindo destilação, prensagem a frio e extração por solvente.<sup>9</sup> Devido à eficiência relativamente baixa do processo e ao rendimento do produto (relacionados a alta necessidade de mão de obra para a colheita ou esgotamento dos recursos naturais e escassez dos compostos de interesse no extrato),<sup>12</sup> essas abordagens tradicionais são altamente demandante em energia, demoradas e exigem imensas quantidades de matérias-primas, cuja disponibilidade está sujeita a vários fatores de risco, como padrões climáticos (estações do ano, área geográfica de produção, desastres climáticos), doenças de plantas e restrições comerciais (flutuações geopolíticas, econômicas e sociais)<sup>9-11</sup> o que significa que os materiais derivados de plantas são frequentemente sujeitos a flutuações de preço, volumes de produção anual (cultivo limitado) e qualidade.<sup>12</sup>

Economicamente, a extração de material vegetal é cara devido aos níveis frequentemente muito baixos de tais compostos neste e isso exige um enorme uso da terra sendo dedicado a culturas não alimentares - valendo lembrar do empreendimento de todas as nações do planeta em alimentar uma população mundial crescente. Como exemplo, para produzir um único grama de  $\alpha$ -ionona natural, seriam necessárias 50 a 100 toneladas de framboesas, o que equivale a 20 hectares de terra (200.000 m<sup>2</sup>). Além disso, o longo período de crescimento dessas plantas está sujeito a altos níveis de variabilidade, podendo significar dificuldades na cadeia de suprimentos para as empresas.<sup>13</sup> Portanto, embora a extração de matérias-primas naturais forneça produtos naturais com perfis olfativos complexos, esta sofre com rendimentos de produção extremamente baixos.<sup>1</sup> Consequentemente, a produção industrial de aromas e fragrâncias migra para métodos de síntese química para melhores resultados.<sup>1,11</sup>

Diversas rotas de síntese orgânica estão disponíveis para criar compostos aromáticos e alifáticos com propriedades de sabor e odor. Além disso, a síntese orgânica representa a abordagem mais eficaz e barata para a descoberta de novos compostos com perfis olfativos e de sabor únicos, pois permite modificações estruturais fáceis.<sup>14,15</sup> No entanto, as sínteses químicas sofrem de múltiplos problemas que levam ao aumento dos custos de produção e a impactos ambientais adversos. Por exemplo, a falta de seletividade causa a formação de

misturas racêmicas e subprodutos, que requerem extensa separação e purificação para isolar o composto alvo.<sup>15,16</sup> Além disso, muitas rotas sintéticas requerem catalisadores metálicos tóxicos, utilizam matérias-primas petroquímicas, geram resíduos perigosos e demandam insumos energéticos significativos.<sup>1,16</sup> Um exemplo são os processos de produção de aldeídos e ésteres aromáticos, que utilizam reagentes perigosos e geram uma quantidade significativa de resíduos.<sup>16,17</sup> Além disso, os compostos gerados são rotulados como “artificiais” ou “idênticos aos naturais”, o que, em última análise, diminui seu valor econômico.<sup>12</sup>

A obtenção de ingredientes de origem natural tem ocasionalmente levado à escassez de alguns recursos vegetais, como baunilha ou hortelã-pimenta.<sup>1,3</sup> As crescentes preocupações ambientais da sociedade acompanham uma demanda cada vez maior por produtos “naturais” e sustentáveis, um âmbito geralmente não compreendido por rotas químicas ou extrativas estabelecidas. Dessa forma, na busca por rotas intermediárias, têm-se observado esforços no desenvolvimento de métodos biotecnológicos para síntese verde de moléculas de aromas e fragrâncias com baixo impacto ambiental, maior segurança do produto e ganho econômico.<sup>1,2,10,11</sup> Considera-se também que as principais estratégias a serem empregadas para alcançar a produção responsável nesta indústria incluem: (i) o uso de materiais de partida de matérias-primas renováveis, principalmente terpenos ou fontes de carbono reciclado de fluxos laterais ou resíduos (como biomassa); (ii) o uso de procedimentos sintéticos caracterizados por alta seletividade (químico, regio e estereosseletividade) para limitar o desperdício e exigindo condições de reação suaves para aumentar a segurança e economizar energia; (iii) o desenvolvimento de odorantes potentes que tenham uma alta relação odor-carbono e, se possível, sejam quase completamente biodegradáveis.<sup>18</sup>

É verdade que há séculos a humanidade vem utilizando sistemas microbianos para conferir novos aromas a produtos de fermentação, como cerveja, vinho e queijo. Tão logo, pesquisas demonstraram que microrganismos também podem ser usados para produzir aromas e

fragrâncias.<sup>19</sup> Assim, um método alternativo atraente para a síntese de aromas e fragrâncias baseia-se em processos microbianos (fermentação) ou em bioconversões de precursores naturais utilizando células microbianas ou enzimas (biocatálise). Existem muitos microrganismos que sintetizam aromas naturalmente como metabólitos secundários durante a fermentação. Não obstante, atualmente, bactérias e leveduras geneticamente modificadas estão sendo desenvolvidas para carregar os genes necessários para a produção de aromas a partir de plantas.<sup>19</sup>

O primeiro relato do uso de cepas de bactérias geneticamente modificadas tornou-se prevalente em 2010, quando houve uma escassez aguda de óleo de fragrância comumente extraído de *Pogostemon cablin* (patchouli). A planta de patchouli produz um óleo essencial que é usado como fragrância em incensos e outros produtos de cuidados pessoais e de saúde. Foi relatado que o tempo chuvoso na Indonésia destruiu o arbusto medicinal, resultando em uma colheita ruim do óleo aromático. A condição piorou ainda mais quando erupções vulcânicas e terremotos exacerbaram os problemas de fornecimento. Para atender a demanda pelo óleo, microrganismos geneticamente modificados foram projetados especificamente para produzir a “fragrância” da planta de patchouli (patchoulol).<sup>19</sup>

Um outro exemplo de produto gerado a partir destes agentes microscópicos é o "valenceno", uma molécula cítrica geralmente encontrada na casca de laranjas Valência, e o outro é o "nootkatona", presente na casca de toranja. Esses compostos são comumente usados em bebidas e perfumes com sabor de frutas. O aroma de vanilina, normalmente produzido por meio de reações sintéticas, também pode ser produzido por fermentação microbiana. As moléculas de aroma e fragrância produzidas por biotecnologia prometem um suprimento abundante, independente de condições climáticas e desastres naturais, com qualidade uniforme.<sup>19</sup>

Terpenoides, como por exemplo, limoneno, mentol e santaleno, são uma grande classe de compostos derivados de plantas comumente usados como aromas e fragrâncias naturais devido às suas características aromáticas e voláteis. A rota convencional de produção é extrair

diretamente de plantas, mas o rendimento é geralmente baixo, o que leva a um alto custo de produção e impacto significativo no ambiente ecológico. A síntese química também tem sido amplamente utilizada, no entanto, como os terpenoides naturais são estruturalmente específicos, um desafio técnico fundamental para a síntese química é que os produtos sintéticos são frequentemente isômeros mistos com quiralidade diferente. Comparada à extração e à síntese química, a biossíntese oferece uma rota alternativa para a produção natural de terpenoides. Por meio das abordagens de engenharia metabólica e biologia sintética - que visa construir novos sistemas biológicos, ou modificar os existentes, com o objetivo de atribuir novas funções e tarefas a organismos vivos - a biossíntese estuda as enzimas-chave na via biossintética natural dos terpenoides e as insere em cepas microbianas apropriadas para produção. Alguns compostos terpenoides alcançaram com sucesso produção escalável por meio de biossínteses microbianas, como o farneseno (130 g/L) e a nootkatona (1,08 g/L).<sup>20</sup> A Tabela 1 a seguir sumariza alguns destes compostos:

**Tabela 1.** Exemplos de compostos aromáticos biotecnológicos comercializados por diferentes empresas. Adaptada da referência 11

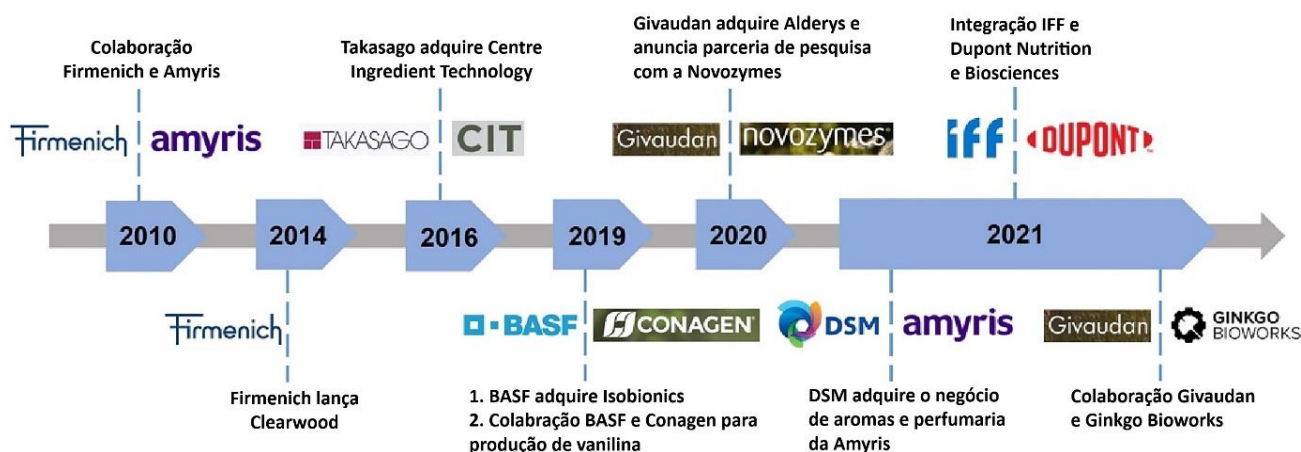
Composto	Empresa
Farneseno	Amyris
Nootkatona	Isobionics Evolva
Patchoulol	Firmenich
Esclareol	Firmenich
Valenceno	Evolva
Vanilina	Evolva IFF Solvay

Dados os avanços na biotecnologia, um aumento no interesse na fabricação de aromas e fragrâncias usando plataformas microbianas ou enzimáticas está em andamento. Abordagens de biofabricação podem oferecer alternativas mais ecológicas e também têm potencial para exibir maiores rendimentos e seletividade. Além disso, moléculas de aromas e fragrâncias

derivadas de bioprocessos podem ser mais desejáveis comercialmente do que rotas de síntese química se puderem atingir o "rótulo natural" começando com substratos identificados em plantas ou outras fontes naturais. É importante ter em mente que o uso de biocatalisadores enzimáticos ou celulares para converter substratos sintetizados quimicamente em produtos naturais não se qualifica como "natural", nem a biossíntese de um produto que não existe na natureza.<sup>21</sup>

Por fim, vale destacar que um grande número de empresas químicas especializadas, estabelecidas e start-ups, em todo o mundo, estão recorrendo cada vez mais à biotecnologia para a fabricação de aromas e fragrâncias, como a International Flavors and Fragrances (IFF), Givaudan, Solvay, DSM, Novozymes, BASF, Robertet, Ajinomoto, Conagen, Evolva, Manus Bio e Ginkgo Bioworks.<sup>21</sup> A Figura 1 destaca algumas destas movimentações: Em 2010, a Firmenich se uniu à empresa de biotecnologia dos EUA Amyris para desenvolver aromas e fragrâncias. Esta é uma das primeiras parcerias entre uma indústria deste tipo e a indústria de fermentação; Em 2014, a Firmenich lançou o Clearwood, um produto com aroma de patchouli que é entendido como a primeira fragrância biotecnológica do mundo; Em 2016, a Takasago adquiriu o Centre Ingredient Technology na Carolina do Norte, EUA, para promover a pesquisa e desenvolvimento de sabores usando biotecnologia de ponta e ingredientes renováveis; Em 2019, a BASF adquiriu a empresa de biotecnologia holandesa Isobionics e adicionou 10 novos produtos de sabor por fermentação, incluindo valenceno e nootkatona; A Conagen assinou uma parceria com a BASF para produzir vanilina fermentada naturalmente; Em 2020, a Givaudan adquiriu a empresa francesa de biotecnologia Alderys e colaborou com a fornecedora de preparações enzimáticas Novozymes para explorar soluções sustentáveis nos setores de alimentos e limpeza; Em 2021, a DSM adquiriu o negócio de sabores e perfumes da Amyris e adicionou sete produtos intermediários para expandir suas ofertas de ingredientes de base biológica nas indústrias de sabores, fragrâncias e cosméticos; Em fevereiro de 2021, a IFF concluiu a fusão empresarial com a DuPont Nutrition e Biosciences; Em agosto de 2021, a Givaudan anunciou uma parceria com a Ginkgo Bioworks, uma empresa de biologia

sintética, para produzir ingredientes mais inovadores e sustentáveis por meio da fermentação.<sup>20</sup>



**Figura 1.** Eventos que marcam a inserção da biotecnologia na indústria de aromas e fragrâncias nos últimos anos. Adaptada da referência 20

## BIOTECNOLOGIA E INGREDIENTES DE AROMAS E FRAGRÂNCIAS<sup>12, 22</sup>

À medida que a demanda por produtos químicos de alto valor continua a crescer, a disponibilidade limitada ou inconsistente de recursos naturais exige o desenvolvimento de tecnologias de produção sustentáveis. A biotecnologia industrial oferece uma solução promissora para esse desafio. Esta pode ser entendida como um campo da ciência que utiliza células vivas ou componentes biológicos, como enzimas, para criar produtos e processos para a indústria.

As abordagens biotecnológicas no setor de fragrâncias vêm se desenvolvendo há várias décadas, com os primeiros artigos de pesquisa sobre produção biotecnológica de fragrâncias sendo publicados na década de 1980. No entanto, foi somente na década de 2000 que essas abordagens começaram a ganhar atenção significativa. Desde então, uma infinidade de

abordagens biocatalíticas foram desenvolvidas para melhorar a qualidade e a quantidade de óleos essenciais e extratos naturais usados em perfumaria. Inicialmente, técnicas de pré-tratamento utilizando celulases, pectinases e glicosidases foram desenvolvidas para aumentar os rendimentos de extração ou destilação, facilitando a liberação de moléculas voláteis de compartimentos celulares. Recentemente, o campo cresceu em complexidade e escopo, seja com foco em técnicas de ponta, como biocatálise, engenharia metabólica, biologia sintética, edição e clonagem de genes e química analítica, ou aproveitando o novo conhecimento sobre vias biossintéticas. Isso levou ao desenvolvimento de novas classes de ingredientes, incluindo ingredientes biotecnológicos obtidos por meio de engenharia metabólica, como compostos bioproduzidos, puros ou como misturas de componentes de óleos essenciais. Recentemente, a indústria de fragrâncias migrou para métodos de produção sustentáveis e ecologicamente corretos, abandonando o uso de matérias-primas de origem animal. A biotecnologia vem ganhando interesse como um novo meio de extração de ingredientes de fragrâncias e facilitando essa transição.

Em plantas, duas abordagens alternativas podem ser utilizadas para manipular geneticamente o perfil de fragrância. A primeira baseia-se na introdução de genes estranhos que codificam enzimas com atividades ausentes na planta-alvo. A segunda abordagem baseia-se na modulação (regulação positiva ou negativa) da expressão de um ou mais genes nativos. Com esta última abordagem, a produção de um composto volátil pode ser aumentada pela regulação positiva de um gene na via ou, alternativamente, pelo bloqueio da produção de um composto volátil indesejado. Portanto, a biotecnologia pode ajudar a modificar o aroma natural e os ingredientes aromáticos de plantas como lavanda, jasmim ou ylang-ylang, e operadores microbianos metabolicamente aprimorados podem produzir uma variedade de moléculas naturais, desde patchoulol, linalol, nerolidol, valenceno até esclareol.

Com o auxílio de ferramentas biotecnológicas, moléculas de aroma e fragrância podem ser produzidas, em alguns casos, de forma mais econômica e em maiores quantidades, superando muitas das desvantagens associadas à síntese química ou à extração vegetal.

### ***Bioprocessos através de plantas***<sup>12, 23, 24</sup>

A indústria de aromas e fragrâncias fornece importantes matérias-primas para produtos aromatizados e perfumados. Entre estes, terpenos e terpenoides (limoneno, mentol, santaleno, etc.) são uma grande classe de compostos derivados de plantas comumente usados como aromas e fragrâncias naturais devido às suas características aromáticas e voláteis.<sup>20</sup> O conhecimento levantado até o momento sobre a biossíntese de terpenos tem aberto possibilidades para a engenharia metabólica de todas as fases da via bioquímica destes. Vários exemplos de manipulação do metabolismo para a biossíntese de terpenos e terpenoides em microrganismos e plantas demonstram as possibilidades de desenvolver vias bioquímicas de baixo custo para a produção de compostos terpênicos amplamente utilizados no setor de fragrâncias. De fato, uma das áreas mais interessantes desta linha de pesquisa concentra-se na obtenção de produtos naturais em plantas transgênicas para melhorar características agrônômicas, como resistência a pragas e competitividade, e para alterar perfis de fragrâncias e sabores.<sup>12</sup>

A engenharia do metabolismo de terpenos em plantas é uma alternativa atraente devido ao seu elaborado potencial biossintético e ao benefício econômico do uso da fotossíntese para impulsionar a produção. Além disso, outro benefício é a extração mais barata de óleos essenciais: os métodos para sua extração, se aplicados em larga escala, exigiriam pouca otimização e investimentos limitados, visto que os próprios métodos já são bem conhecidos em nível industrial.<sup>12</sup>

As plantas podem ser geneticamente modificadas por meio da introdução de genes estranhos ou da modulação da expressão de um ou mais genes nativos. Experimentos pioneiros válidos, realizados principalmente em plantas herbáceas, abriram caminho para a manipulação genética da característica odorífera. Resultados interessantes também foram obtidos com plantas lenhosas e musgos. Por exemplo, em 2010, Ohara *et al.*<sup>23</sup> modificaram o *Eucalyptus camaldulensis*, uma planta lenhosa amplamente utilizada na produção de celulose para as

indústrias de celulose e papel, e de óleos essenciais, por meio da expressão de uma sintase heteróloga (a limoneno-sintase de *Perilla frutescens*), a fim de aumentar seu teor de limoneno. Da mesma forma, em 2014, Zhan *et al.*<sup>24</sup> projetaram o musgo *Physcomitrella patens* por meio de duas sintases heterólogas, a patchoulol-sintase de *Pogostemon cablin* e a  $\alpha/\beta$ -santaleno-sintase de *Santalum album*, respectivamente para aumentar o patchoulol e o  $\alpha$ - e o  $\beta$ -santaleno; este último é o precursor do  $\alpha$ - e do  $\beta$ -santalol.

Embora os experimentos mencionados possam ser considerados bem sucedidos, os rendimentos obtidos com essas abordagens ainda não são altos o suficiente para competir com as abordagens tradicionais. Os rendimentos de compostos de fragrâncias obtidos experimentalmente por meio da engenharia metabólica de plantas têm se mostrado significativamente menores do que aqueles obtidos por métodos tradicionais ou com microrganismos. De fato, uma das principais desvantagens dessa abordagem é a complexidade bioquímica das plantas (compartimentalização da biossíntese, presença ou ausência de estruturas especializadas, etc.), o que torna o tempo necessário para gerar transformações gênicas estáveis mais longo e, conseqüentemente, o custo inicial mais alto.<sup>12</sup>

### ***Bioprocessos através de microrganismos e enzimas***

A biocatálise resume tanto as biotransformações (ou seja, a conversão de substratos definidos usando sistemas de células inteiras) quanto a catálise enzimática (ou seja, a conversão de substratos definidos usando extratos livres de células ou enzimas purificadas) e pode ser definida como um processo que descreve uma reação, ou um conjunto de reações simultâneas, nas quais uma molécula precursora pré-formada é convertida usando enzimas e/ou células inteiras, ou combinações delas, livres ou imobilizadas.<sup>25</sup>

Os processos biocatalíticos são cada vez mais utilizados para substituir processos químicos convencionais e possibilitar a formação de novos produtos. Entre as razões que justificam o uso de biocatalisadores, as mais atrativas são: 1. a alta especificidade e seletividade

(resultando em altos rendimentos e desperdício mínimo); 2. A possibilidade de usar condições mais amenas (por exemplo, abordagens sem solventes, baixas temperaturas e pressões de trabalho e redução do consumo de energia).<sup>2,22,25</sup> Além disso, a biocatálise permite a produção de moléculas novas ou complexas, como produtos naturais complexos, que são difíceis de sintetizar usando métodos químicos tradicionais, por vezes, pode até permitir a redução do número de etapas de uma rota sintética. A biocatálise está alinhada aos princípios da química verde inclusive porquê as enzimas são biodegradáveis e ecologicamente corretas.<sup>22,25</sup>

Ainda que células inteiras isoladas e enzimas possam ser usadas como biocatalisadores, células inteiras são frequentemente preferíveis porque são fontes mais convenientes e estáveis do que enzimas purificadas, sem necessidade de purificação dispendiosa e adição de coenzima. De fato, ainda que as enzimas sejam consideradas ferramentas poderosas, o número de enzimas disponíveis comercialmente no mercado ainda é bastante limitado, particularmente para alguns tipos de substratos incomuns. Além disso, quando as enzimas são mantidas em seu ambiente natural (citoplasma da célula inteira), geralmente ocorre menor inativação. Por outro lado, no caso de biotransformação em etapa única, enzimas isoladas podem realmente ser consideradas a melhor escolha, e a aplicação de enzimas imobilizadas, seja em meio aquoso ou orgânico, pode aumentar a produtividade biocatalítica.<sup>25</sup>

Mesmo que enzimas nativas apresentem bom desempenho em condições relevantes às condições fisiológicas dos hospedeiros originais, elas são limitadas em escopo de substrato, taxa de reação e estabilidade em aplicações industriais. Para superar esses problemas, pesquisadores recorrem à engenharia de proteínas para gerar enzimas com especificidade de substrato personalizada, atividade catalítica aprimorada, bem como estabilidade aprimorada em solventes orgânicos, temperatura elevada e tempo de reação prolongado. Nos últimos anos, enzimas projetadas aceleraram o crescimento da indústria alimentícia.<sup>2,11,16</sup>

Famílias de enzimas proeminentes nessas aplicações incluem lipases, álcool desidrogenases e proteases. As lipases catalisam a esterificação de aromas a partir de ácidos graxos e álcoois e frequentemente apresentam ampla correspondência de substratos. Consequentemente, são

largamente utilizadas para produzir acetato de isoamila (sabor de banana), acetato de geranila (odor de rosas) e acetato de citronelila (sabor de limão). Álcool desidrogenases estão ganhando popularidade por produzir aldeídos graxos como hexanal (odor verde-frutado) e álcoois monoterpênicos como geraniol (aroma floral). Proteases ou enzimas proteolíticas são comumente usadas para hidrolisar ligações peptídicas de fontes proteicas para produzir sabores salgados e semelhantes aos da carne. Essas são enzimas bem caracterizadas e foram extensivamente revisadas quanto às suas aplicações.<sup>1,2,11,16</sup> Outro exemplo é a produção de L-mentol, o principal constituinte do óleo de hortelã-pimenta. Foram encontradas lipases microbianas que hidrolisam preferencialmente os L-mentilésteres (da mistura racêmica) em L-mentol, deixando os D-mentilésteres intactos.<sup>26</sup>

Embora as plantas sejam a fonte natural de terpenoides, os últimos anos têm sido caracterizados por um aumento notável na produção de terpenoides pela via microbiana. O uso de fábricas de células microbianas na produção de compostos de fragrância naturais pode potencialmente superar desafios que podem surgir não apenas com as abordagens tradicionais, mas também com abordagens de engenharia genética de plantas. Primeiro, a biossíntese microbiana permite a produção em escala industrial de compostos puros. Segundo, a conversão microbiana pode economizar tempo e custos devido a maiores rendimentos, crescimento mais rápido (quando comparado às plantas) e recuperação mais fácil do produto. Finalmente, a produção microbiana pode usar estoques abundantes, renováveis e/ou sustentáveis, como resíduos biológicos (ácidos carboxílicos) ou biomassa lignocelulósica, é independente das condições climáticas e tem um nível mais alto de sustentabilidade quando comparado aos processos de produção química; até mesmo um óleo essencial raro pode ser isolado e produzido em grandes quantidades.<sup>12</sup>

Uma das principais vantagens da produção de substâncias aromáticas a partir de microrganismos é, no entanto, a manipulação genética mais fácil devido ao seu genoma menor e menos complexo. Na maioria dos casos, a primeira estratégia consiste geralmente em transferir uma terpeno-sintase exógena para o microrganismo hospedeiro e realizar a

expressão heteróloga (atividade a partir do material genético estrangeiro), enquanto a segunda se concentra na otimização da via endógena (por exemplo, por meio da regulação positiva de genes limitantes na via e da regulação negativa de genes envolvidos nas vias competitivas). Das duas, a primeira estratégia tem a principal vantagem de evitar possíveis mecanismos de regulação por retroalimentação, uma vez que os metabólitos são estranhos às células hospedeiras produtoras.<sup>12</sup>

No entanto, como no caso das plantas, deve-se considerar que a expressão de genes heterólogos no hospedeiro pode afetar seu metabolismo endógeno ou que, às vezes, alguns produtos podem gerar citotoxicidade (dano e/ou destruição celular). Portanto, além de otimizar as vias metabólicas e o fluxo, muitas vezes também é necessário fornecer estratégias integradas de remoção *in situ*. Certamente, devido à alta volatilidade desse tipo de composto e aos possíveis efeitos inibitórios no crescimento celular, é necessário remover o produto durante a fermentação por meio de métodos como a “remoção” gasosa ou a separação em dupla fase (misturas bifásicas), sendo esta última particularmente adequada para maiores rendimentos. Além disso, a escolha de uma cepa hospedeira adequada deve ser considerada com muito cuidado, pois isso também determina o sucesso do desenvolvimento de um processo de produção com boa relação custo-benefício. As cepas hospedeiras ideais devem ser bem caracterizadas em termos de sequência do genoma e também ser geneticamente acessíveis. Além disso, para tornar a produção custo-efetiva, os microrganismos devem ser facilmente cultiváveis em condições de laboratório e em escala de produção, crescer rapidamente com demandas simples de nutrientes e se alimentar de matérias-primas de baixo custo.<sup>12</sup>

Normalmente, os microrganismos mais utilizados para esses tipos de processos têm sido os microrganismos modelo *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*. Todavia, em relação à molécula-alvo, às vias metabólicas e à fonte de carbono a ser utilizada, organismos hospedeiros alternativos podem apresentar vantagens genéticas e fisiológicas em comparação com estes supracitados. Em particular, o desenvolvimento progressivo de tecnologias ômicas

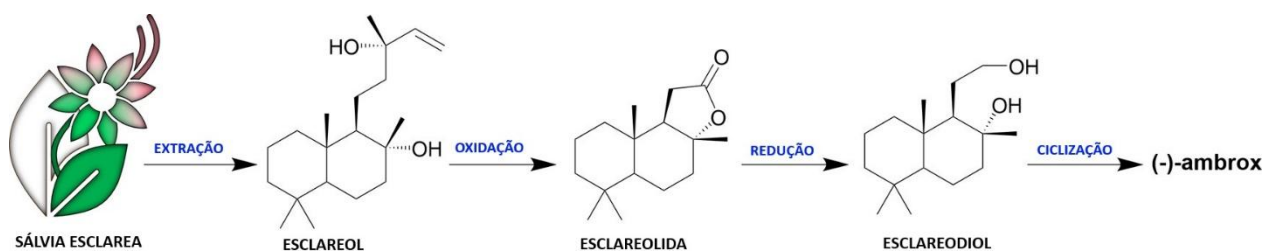
- que visam analisar grandes conjuntos de dados biológicos - e novas ferramentas de engenharia metabólica tornaram organismos alternativos disponíveis para o projeto de fábricas de células microbianas.<sup>12</sup>

### *Pesquisas e casos de sucesso*

Wang *et al.* (2021) e Zhang *et al.* (2022) concentraram-se na produção do precursor de  $\alpha$ -santalol, o  $\alpha$ -santaleno, utilizando *E. coli* como hospedeiro. Ambos os estudos sugerem que *E. coli* é uma alternativa promissora para a síntese de  $\alpha$ -santaleno, fornecendo sugestões práticas para a produção de terpenoides por meio da engenharia genética e proteica.<sup>12, 27, 28</sup>

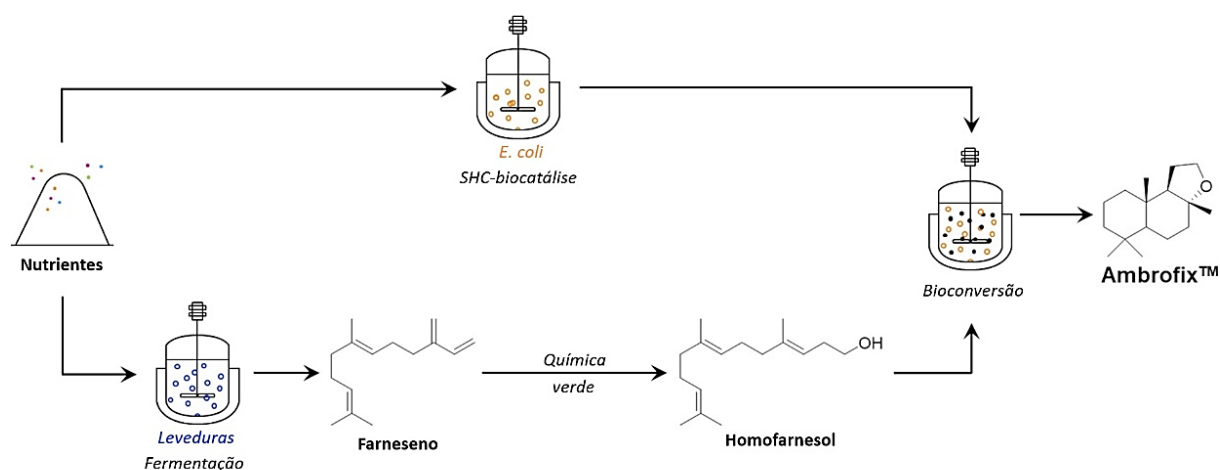
A mesma abordagem de expressão heteróloga de terpeno-sintases e o aprimoramento da via metabólica foi usada para a produção de esclareol, amplamente utilizado como material de partida para a síntese de moléculas perfumadas com notas de ambergris. O ambergris é um produto de excreção cerosa de cachalotes (*Physeter macrocephalus L.*) que tem sido usado desde os tempos antigos como um agente valioso na formulação de perfumes por seu aroma agradável, doce e terroso. Os odorantes de ambergris são popularmente produzidos por vias sintéticas ou semissintéticas. Um exemplo emblemático desse tipo de composto é o Ambrox™ (Firmenich), é o produto comercial enantiomericamente puro igual ao natural, ou seja, o (-)-ambrofurano. Dada a escassa disponibilidade da fonte natural e para evitar problemas éticos, econômicos e de fornecimento, alternativas válidas foram identificadas para a síntese desses tipos de compostos. Entre as alternativas, a síntese de ambrofurano a partir do esclareol, coproduzido na produção do óleo essencial de *Salvia sclarea*, demonstrou ser muito bem-sucedida (vide Figura 2). No entanto, devido ao consumo estável e moderado do óleo essencial de *S. sclarea* e ao uso crescente de ambrofurano, esse processo de produção acoplado não suportou a demanda.<sup>12</sup> Dessa forma, a fim de contornar tal cenário, foi pensado o desenvolvimento de um processo industrial para produção do Ambrofix™ (Givaudan), gerado por meio de uma ciclização de etapa única do (E,E)-homofarnesol, um substrato

resultante de um alongamento do farneseno, tal como visto na Figura 3. Este novo processo apresenta eficiência de carbono significativamente melhorada em comparação aos processos originais que produzem (-)-ambrox (síntese de várias etapas a partir do esclareol isolado da sálvia esclarea assim como mencionado logo acima). Estima-se que a produção de um quilo (1 kg) de Ambrofix a partir de açúcar exija 100 vezes menos terra em comparação com a rota tradicional da sálvia esclarea. Outro aspecto relevante para a sustentabilidade é que o (-)-ambrox cristaliza a partir do caldo de reação. Essa propriedade permite uma recuperação ambientalmente correta do produto por meio da separação sólido-líquido, evitando o uso de qualquer tipo de solvente para extração durante a recuperação do produto.<sup>29,30</sup>



**Figura 2.** Obtenção do (-)-Ambrox a partir da sálvia esclare. Adaptada da referência 29

O exemplo do Ambrofix™ demonstrou pela primeira vez que, aproveitando a flexibilidade, plasticidade e a possibilidade de serem evoluídas, as enzimas esqualeno-hopeno ciclases (*SHC - Squalene Hopene Cyclase*) podem ser transformadas em biocatalisadores aplicáveis em escala industrial. Para ampliar o escopo do substrato, também foi demonstrado que as enzimas *SHC* são aplicáveis à produção de decalinas 2-oxigenadas. Esses compostos podem ser usados diretamente como moléculas de fragrância ou servir como intermediários na síntese de outros ingredientes de fragrância. Em contraste com os métodos de ciclização química, que exigem condições severas e altamente ácidas, estas enzimas permitem a produção de decalinas 2-oxigenadas usando condições de reação mais brandas e maior controle sobre os estereoisômeros e/ou regioisômeros resultantes.<sup>29-31</sup>

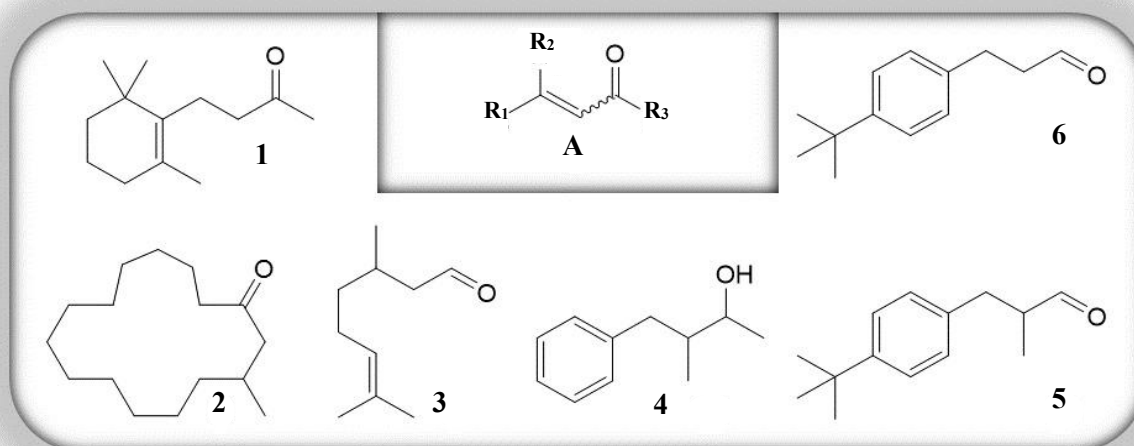


**Figura 3.** Rota de obtenção do Ambrofix™. (–)-Ambrox produzido a partir de homofarnesol através da biocatálise pela esqualeno-hopeno ciclase (SHC): Adaptada da referência 29

As chamadas ene-redutases são enzimas que devido ao seu amplo escopo de substratos – como aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, cetonas, ácidos carboxílicos e derivados (ésteres, lactonas, anidridos de ácidos cíclicos, ácidos carboxílicos) – também ganharam vasto uso prático. Sua aplicabilidade em escala preparativa com excelentes rendimentos e excesso enantiomérico foi demonstrada, e sua utilidade em aplicações biocatalíticas está bem estabelecida.<sup>29</sup>

As ene-redutases são muito procuradas na indústria farmacêutica devido às suas propriedades intrínsecas, como sua excelente estereosseletividade e regioseletividade. Em relação às aplicações para moléculas odorantes, foi recentemente descrita uma ene-redutase isolada de uma cepa de levedura *Kazachstania exigua*, que reduz a  $\beta$ -ionona monocíclica a dihidro- $\beta$ -ionona. Outra ene-redutase que atua em grandes enonas monocíclicas (anel de C<sub>12</sub> a C<sub>15</sub>), isoladas do fungo leveduriforme *Sporidiobolus salmonicolor* foi caracterizada, que gera o composto Muscona ao catalisar a redução assimétrica da enona de anel C<sub>15</sub> substituída por  $\beta$ -metil. Diversas enzimas desse grupo reduzem (E/Z)-citral, produzindo ambos os enantiômeros de citronelal que podem então ser transformados em isopulegol, um intermediário na síntese de mentol, após ciclização com variantes de esqualeno-hopeno

ciclase. Um processo biocatalítico baseado em ene-redutases foi descrito para a produção de decanal - um poderoso aldeído floral com facetas de casca de laranja e cítricos - a partir do substrato linear 2E-decenal. Em uma cascata de duas enzimas em combinação com álcool desidrogenases, uma ene-redutase foi usada para produzir os dois principais vetores de odor a partir dos quatro estereoisômeros de Muguesia®, uma molécula de fragrância transparente floral, muguet e rosada com facetas verde e mentolada. Na mesma família de odores (muguet, lírio-do-vale), as enzimas em questão serviram para preparar derivados de  $\alpha$ -metil dihidrocinamaldeído não racêmicos, como Lilial® (também conhecido como Lysmeral®) e Tropional® (corresponde também ao Helional®). Esses compostos foram produzidos com rendimento quantitativo e alta seletividade.<sup>18,29</sup> Figura 4 indica alguma destes compostos:

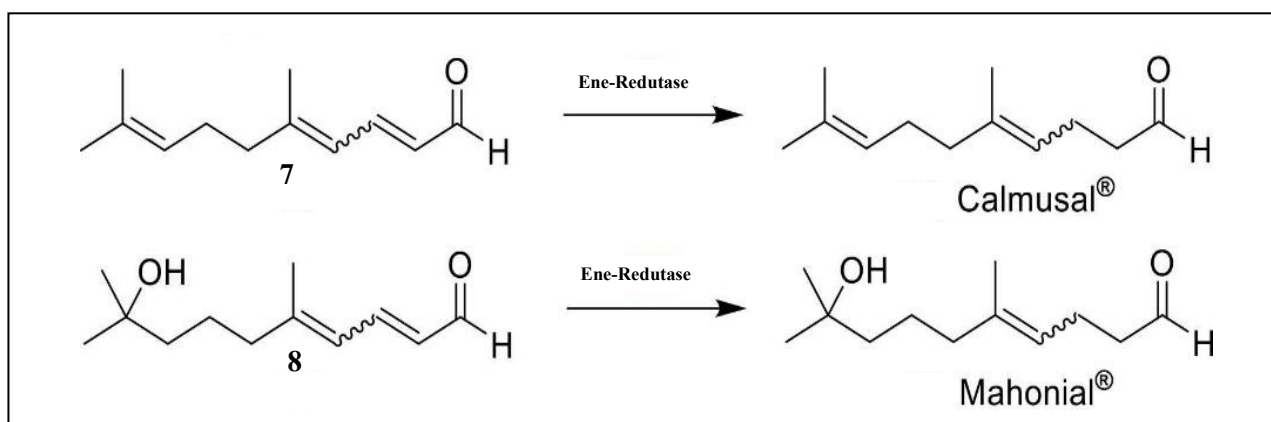


**Figura 4.** Várias moléculas odoríferas preparadas a partir de blocos de construção “A” utilizando ene-redutases. Dihidro- $\beta$ -ionona (1), Muscona (2), Citronellal (3), Muguesia (4), Lilial (5), Tropional (6). Adaptada da referência 29

O próprio cinamaldeído, o principal componente do óleo essencial de canela (*Cinnamomum sp.*), é um substrato bem estabelecido para estas, formando o di-hidrocinamaldeído, usado em perfumaria por sua nota floral, balsâmica e de jacinto característica. Da mesma forma, alguns

derivados de  $\beta$ -metilcinamaldeído têm sido investigados como intermediários relevantes para a indústria de aromas e fragrâncias. O análogo m-isopropílico foi reduzido com cepas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) para fornecer o enantiômero (S)- do produto, com redução concomitante do grupo carbonila a álcool primário. A oxidação química restaurou a funcionalidade do aldeído e produziu o mais potente dos dois enantiômeros da fragrância Florhydal®, com um perfil mais verde e menos aquoso.<sup>18</sup>

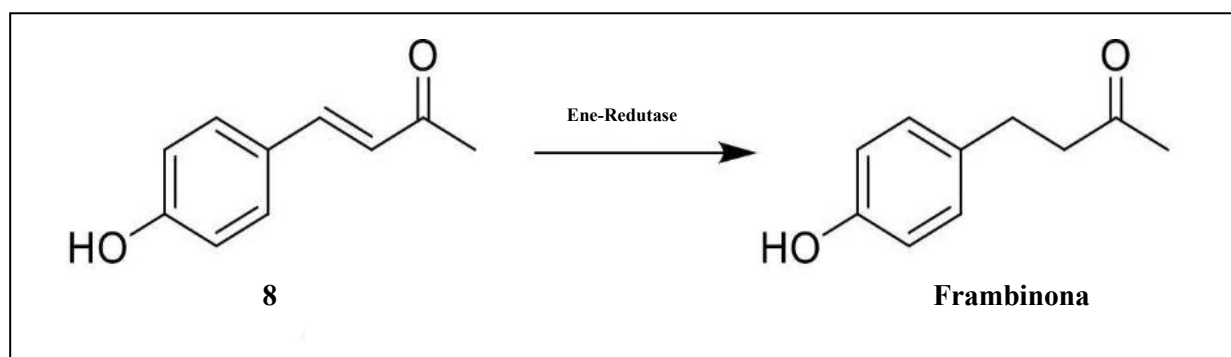
Similarmente, a empresa Givaudan patenteou a bio-hidrogenação de dois dienais análogos (compostos 7 e 8 da Figura 5) para produzir dois aldeídos  $\gamma,\delta$ -insaturados, comercialmente vendidos como Calmusal® (também conhecido como geraldeído) e Mahonial®. Os substratos foram obtidos por alongamento da cadeia do citral e, portanto, são constituídos por uma mistura de diastereoisômeros (E) e (Z), assim como os produtos, sem que a relação E/Z seja alterada na biorredução.<sup>18</sup>



**Figura 5.** Biorredução de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados por ene-redutase. Adaptada da referência 18

Um dos estudos de caso mais famosos é o da cetona de framboesa, também conhecida como frambinona (Figura 6), o principal componente ativo do aroma de framboesas (*Rubus idaeus*). O composto está presente em outras frutas e vegetais, mas sua extração é economicamente

insustentável devido à baixíssima abundância em todas as fontes naturais. Em 2022, uma cepa de *E. coli* modificada metabolicamente foi desenvolvida para produzir biossinteticamente até 62 mg/L de cetona de framboesa em culturas em batelada alimentada sob condições otimizadas, partindo da glicose como única fonte de carbono. Nesses casos, a biorredução de C=C ocorre apenas como etapa final, mediada por pelo menos uma enzima benzalacetona-redutase endógena.<sup>18, 32</sup>



**Figura 6.** Obtenção da cetona de framboesa a partir da biorredução por ene-redutase do precursor *p*-hidroxibenzalacetona (8). Adaptada da referência 18

A  $\beta$ -ionona é um sesquiterpeno de importância central para a indústria de fragrâncias e é um componente-chave do aroma de rosas e violetas. Seu produto de redução, a dihidro- $\beta$ -ionona, ocorre naturalmente em *Osmanthus fragrans* e em diversas outras plantas e flores, e é empregada como fragrância em cosméticos, produtos de higiene pessoal e detergentes. Recentemente, dois grupos publicaram, de forma independente, a identificação de novas ene-redutases capazes de realizar essa biorredução desafiadora com eficiência: *DBR1* de *Artemisia annua* e *KaDBR1* de *Kazachstania exigua* HSC6. Em ambos os casos, a enzima isolada conseguiu converter  $\beta$ -ionona em dihidro- $\beta$ -ionona com boa conversão e seletividade perfeita.<sup>18,33,34</sup>

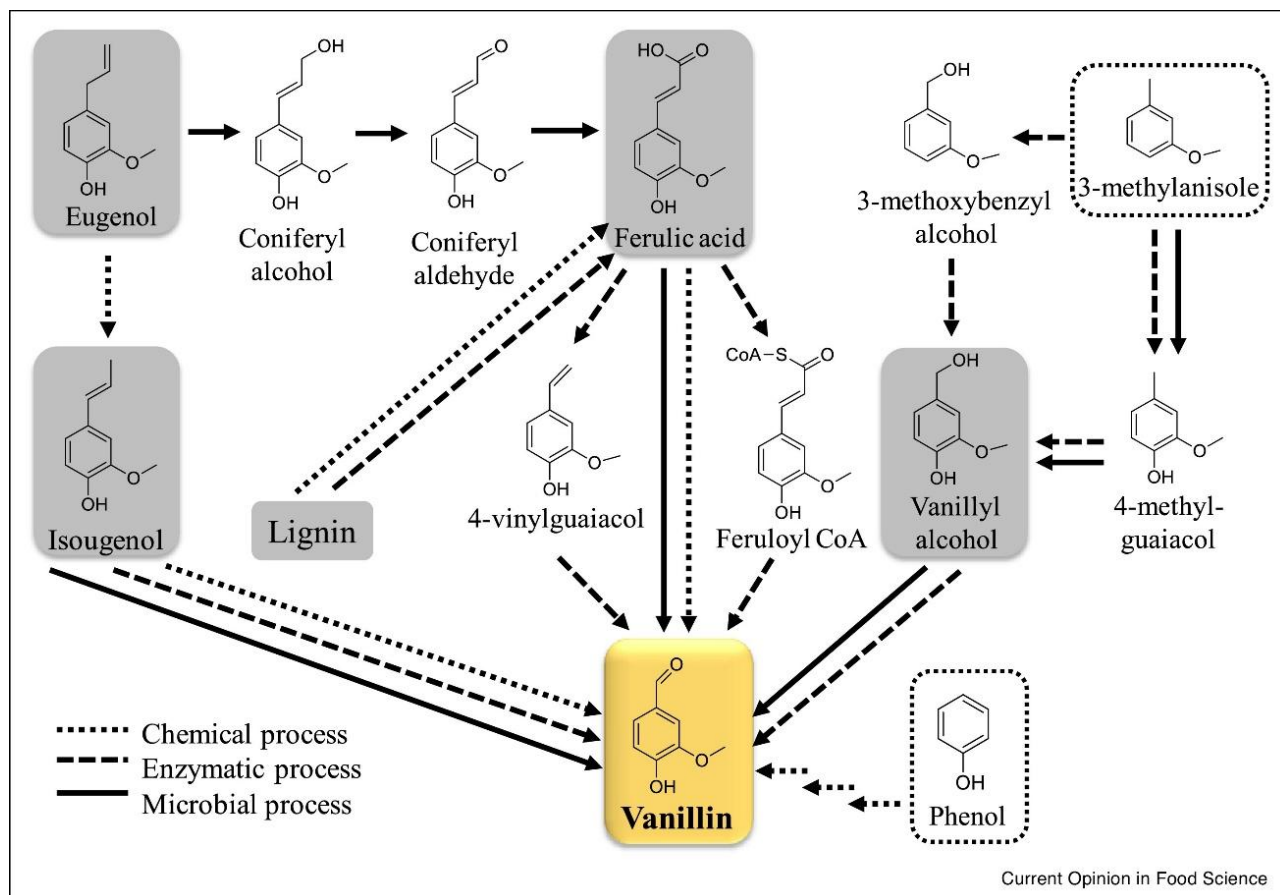
Por fim, biorredução de ligações C=C tem sido estudada e realizada usando microrganismos por muitos anos, com as vantagens de uma configuração simples, processo barato e sem

necessidade de sistemas adicionais de regeneração de cofatores (restauração de um cofator ao seu estado ativo após utilização em uma reação enzimática). Entre as cepas investigadas, *Saccharomyces cerevisiae* sem dúvida ocupou um lugar de destaque devido à sua excelente atividade aliada à sua disponibilidade comercial em larga escala e a baixo custo. No entanto, uma série de desvantagens estão associadas a essa abordagem: eficiência catalítica limitada devido aos níveis tipicamente baixos de expressão dos genes de interesse, ocorrência de reações colaterais associadas a outras enzimas no proteoma, complexidade do processamento, muitas vezes envolvendo a separação do produto de grandes quantidades de biomassa. Além disso, se a bioconversão for realizada em condições de fermentação, ou seja, com células viáveis, os efeitos tóxicos ou inibidores de crescimento de substratos ou produtos podem restringir as faixas de concentração de trabalho.<sup>18</sup>

A vanilina, um metabólito secundário de plantas, é amplamente utilizada como agente aromatizante em bebidas, alimentos e produtos farmacêuticos. O tamanho do mercado de vanilina deve atingir US\$ 724,5 milhões até 2025. No entanto, a produção de vanilina a partir da fitoextração (uso da planta) exige muita mão de obra e baixo rendimento enquanto que a síntese química apresenta vários desafios, como alto impacto ambiental e baixa qualidade, com consequências para as potenciais restrições impostas pelas autoridades de controle de segurança alimentar. Neste cenário, prevê-se a utilização de células microbianas para a conversão ou transformação de substratos baseados em biomassa renovável em vanilina.<sup>35</sup>

Dois processos são seguidos para a produção de vanilina. Um dos fungos mais comuns, *Aspergillus niger*, converte ácido ferúlico em vanilina com a ajuda de basidiomicetos (cogumelo *Pycnoporus cinnabarinus* ou *Phanerochaete chrysosporium*). Outra forma de síntese de vanilina é por meio da bioconversão de eugenol via ácido ferúlico, ferulaldeído ou coniferilaldeído por cepas de *Arthrobacter*, *Corynebacterium* ou *Pseudomonas*. As bactérias também parecem converter o eugenol em ácido vanílico muito melhor do que a levedura. A

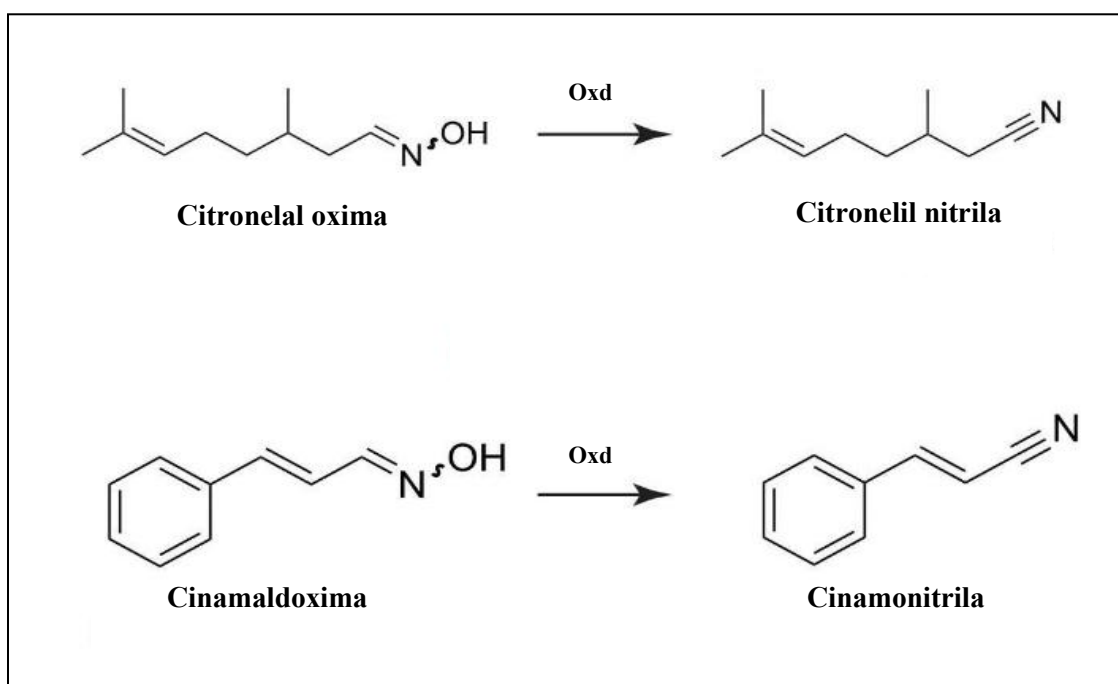
cepa *Pseudomonas putida* foi capaz de converter ácido ferúlico eficientemente em ácido vanílico e uma cepa de *Streptomyces setonii* transformou ácido ferúlico em vanilina.<sup>26</sup>



**Figura 7.** Diferentes rotas para a produção de vanilina<sup>11</sup>

As nitrilas também são de grande interesse para as indústrias de aromas e fragrâncias. A citronelil nitrila emite um forte odor semelhante ao de limão e é um ingrediente-chave para a criação de novas fragrâncias. A cinamonitrila tem um aroma forte e picante semelhante ao da canela e nuances florais. A conversão de aldeídos em aldoximas é simples; portanto, nitrilas aromatizantes podem ser sintetizadas em condições moderadas usando a aldoxima-desidratase (*Oxd*). A BASF patenteou a produção biocatalítica de citronelil nitrila aplicando tal enzima, esquema da reação pode ser visto na Figura 8. A citronelal oxima foi transformada

na nitrila correspondente usando células inteiras contendo a enzima em condições livres de solventes. A citronelal oxima foi misturada com células inteiras, convertendo completamente a aldoxima em citronelil nitrila após 90h. Outro exemplo é a síntese quimioenzimática de citronelil nitrila e cinamonitrila a partir dos aldeídos correspondentes via aldoximas.<sup>36</sup>



**Figura 8.** Produção biocatalítica de citronelil nitrila e cinamonitrila usando aldoxima-desidratase (Oxd). . Adaptada da referência 36

Contudo, pesquisas ainda apontam para alguns compostos desafiadores, por exemplo o limoneno e seus derivados, como álcool perílico, mentol, carveol e  $\alpha$ -terpineol, que são amplamente aplicados em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, biomateriais e biocombustíveis, pois as produtividades e os rendimentos de carbono alcançados ainda são muito baixos para bioprocessos economicamente viáveis. Por exemplo, a produção de mentol baseia-se em extrações vegetais tradicionais, e a cânfora é produzida principalmente por síntese química. Dado o custo de produção e a escalabilidade do processo de produção, as indústrias geralmente preferem os planos de produção já existentes e maduros, como a síntese

química. No modelo industrial do mentol, a BASF, a Symrise e a Takasago estão há muito tempo envolvidas no desenvolvimento de processos de síntese química que representam cerca de 30% da produção global de mentol. Em suas rotas de produção, a BASF e a Symrise utilizam materiais fósseis como matéria-prima para a síntese química de mentol, enquanto a Takasago utiliza mirceno, sintetizado principalmente pelo craqueamento de  $\beta$ -pineno, um produto derivado do processo de extração da terebintina da madeira. Por outro lado, grande parte da cânfora mundial provém de síntese química utilizando  $\alpha$ -pineno como matéria-prima, também um subproduto da terebintina.<sup>20</sup> Existem alguns obstáculos na engenharia de fábricas de células microbianas para a biossíntese de limoneno e seus derivados, incluindo: 1. dificuldades na identificação de enzimas eficientes para vias biossintéticas desejáveis, uma vez que as monoterpeno sintases geralmente apresentam atividade diversa; 2. baixos fluxos metabólicos em direção ao produto alvo, especialmente quando a via biossintética envolve múltiplas etapas; 3. interferências do metabolismo nativo dos hospedeiros com vias biossintéticas heterólogas complexas; 4. a falta de ambientes adequados para a expressão heteróloga de enzimas com atividade ótima, particularmente as ligadas à membrana; 5. a grave citotoxicidade do limoneno em células. A engenharia metabólica para a produção microbiana de limoneno e seus derivados é instrutiva para a engenharia do metabolismo celular para superproduzir certos monoterpenoides e aumentar a robustez da célula contra produtos isoprenoides tóxicos.<sup>37</sup>

### ***Biotecnologia como estratégia de mercado***

A biotecnologia oferece uma alternativa atraente para a produção de moléculas de aromas e fragrâncias em grandes quantidades. Isso abriu caminho para empresas biotecnológicas como a DSM, uma multinacional holandesa de ciências da vida e dos materiais (Koninklijke DSM N.V., ou Royal DSM), e outra grande produtora química com sede na Alemanha, a BASF (Badische Anilin- und Soda-Fabrik). Essas empresas investiram um montante fixo de

US\$ 13,5 milhões na produção microbiana de moléculas de aromas e fragrâncias em colaboração com uma empresa chamada Allylix, sediada em San Diego.<sup>19</sup>

Observa-se, portanto, um crescimento nos relacionamentos entre empresas de fragrâncias e empresas de biotecnologia nas últimas duas décadas, à medida que a biotecnologia começou a se tornar um novo conjunto de ferramentas para inovação com o potencial de oferecer benefícios além dos limites da química tradicional. Os ingressantes na biotecnologia estão expandindo a lista de moléculas disponíveis que podem oferecer ao setor. Ao mesmo tempo, grandes empresas químicas fizeram aquisições ou investiram significativamente internamente para encontrar maneiras de aumentar seu conhecimento e experiência em fermentação. Estas querem criar compostos odorantes sem impactar negativamente pessoas e meio ambiente; além de elaborar aromas que proporcionem uma experiência eficaz para os consumidores. Por exemplo, o primeiro ingrediente derivado da biotecnologia para substituir o patchouli colhido naturalmente foi lançado em 2014. Adicionalmente, em 2020, moléculas foram lançadas em resposta ao fornecimento insustentável de santalol, às vezes obtido de espécies ameaçadas de extinção de árvores de sândalo.<sup>38</sup>

Ingredientes derivados da biotecnologia para fragrâncias também estão ganhando interesse porque tornam a formulação de produtos mais fácil e previsível. Ingredientes naturais podem ser imprevisíveis devido a mudanças sutis de estação para estação e às condições de cultivo. Moléculas derivadas da biotecnologia oferecem uma maneira de contornar esse contratempo. Estas podem gerar formulações mais eficazes e seguras, pois são produzidas em um ambiente altamente controlado. Isso não apenas ajuda a acelerar a criação de novos produtos, como também permite fragrâncias estáveis de um ano para o outro, tornando não apenas o aroma estável, mas também o preço e a sustentabilidade da fragrância. Além disso, as torna altamente rastreáveis. Matérias-primas naturais podem vir de centenas de agricultores diferentes. Ingredientes derivados da biotecnologia geralmente vêm de uma única fonte.<sup>38</sup>

Por sua vez, o mercado de aromas biotecnológicos (também chamados de bioaromas), seja por fermentação microbiana ou reações enzimáticas, avaliado em US\$ 1,54 milhão em 2021, está projetado para atingir US\$ 3,17 milhões até 2028. O crescimento do mercado é impulsionado por condições climáticas adversas e pela crescente demanda por ingredientes alimentícios de alta qualidade. No entanto, o alto custo associado ao processamento, produção e preservação de aromas naturais e biotecnológicos deve prejudicar o crescimento do mercado, já que os aromas biotecnológicos são comparativamente mais caros do que as alternativas sintéticas. Os altos custos de produção de bioaromas vêm principalmente da etapa de purificação dos compostos produzidos, representando mais de 50% do custo do bioprocessamento devido à alta volatilidade das moléculas de aroma e sua baixa solubilidade em solventes verdes. Além de ser financeiramente custosa, a etapa posterior da produção de bioaromas é complexa e resulta em baixos rendimentos. Uma alternativa para reduzir os custos na produção de bioaromas é o uso de subprodutos agrícolas, o que atende ao desejo dos consumidores por produtos mais sustentáveis, naturais e ecologicamente corretos.<sup>6,11</sup>

### ***Desafios e perspectivas futuras***

Embora o cenário seja bastante promissor, os processos biotecnológicos ainda enfrentam um conjunto de desafios. Um dos principais desafios técnicos está relacionado à complexidade dos organismos vivos e à dificuldade de prever todas as consequências das modificações genéticas. Embora as técnicas de engenharia genética tenham evoluído, ainda há riscos associados a mutações inesperadas e efeitos colaterais não planejados. Assim, nota-se também que a necessidade de uma regulamentação ética e eficaz para garantir a segurança tanto ambiental quanto para a saúde humana é um dos aspectos mais debatidos no campo, afinal a biotecnologia tem o poder de alterar geneticamente organismos e manipular suas propriedades, o que levanta questões sobre a modificação do patrimônio genético e os possíveis efeitos a longo prazo dessas alterações.<sup>39</sup>

Muitos países adotam legislações rigorosas para a liberação de novos produtos derivados da biotecnologia, o que pode retardar a inovação e o lançamento comercial destes. A necessidade de testes extensivos e protocolos de segurança rigorosos também aumenta o custo do desenvolvimento de produtos biotecnológicos, tornando sua viabilidade econômica um fator crítico para sua implementação em larga escala.<sup>39</sup>

Adicionalmente, a transição da produção de escala laboratorial para a escala comercial representa um dos maiores desafios enfrentados pela biotecnologia industrial. Esse processo de escalonamento demanda investimentos substanciais em projeto, engenharia e validação, o que frequentemente se traduz em altos custos e longos prazos de desenvolvimento. Além disso, a viabilidade da escalabilidade está diretamente ligada ao sistema biológico empregado, sendo que alguns desses sistemas apresentam limitações técnicas, ambientais ou regulatórias que dificultam sua expansão.<sup>39-41</sup>

Para que um bioprocessamento se torne um empreendimento comercial de sucesso, é necessário considerar uma série de variáveis e insumos ao longo de toda a cadeia produtiva. Isso inclui tanto o processamento a montante (*upstream*), que envolve o cultivo e a preparação dos organismos produtores, quanto o processamento a jusante (*downstream*), responsável pela recuperação e purificação do produto final. A regulamentação e a constante atualização desses processos são fundamentais para garantir eficiência, segurança e conformidade com as exigências do mercado e das autoridades regulatórias.<sup>39-41</sup>

Tratando brevemente destas duas etapas essenciais no bioprocessamento industrial, tem-se que a fase *upstream* envolve o cultivo de células ou microrganismos para a produção de biofármacos, biocombustíveis, enzimas e outros subprodutos. Já o *downstream* trata da purificação e recuperação desses produtos a partir de misturas biológicas complexas. No *upstream*, os principais desafios estão na otimização das condições de cultivo, como pH, temperatura, oxigênio e nutrientes, além da escalabilidade dos processos. A transição para

escala comercial exige controle rigoroso e sistemas avançados de monitoramento, além de engenharia cuidadosa para manter a produtividade. Por outro lado, avanços em engenharia genética e biologia sintética têm permitido o desenvolvimento de linhagens celulares mais eficientes e a produção de compostos inovadores.<sup>42</sup>

O *downstream* enfrenta dificuldades na separação e purificação seletiva dos produtos, que geralmente requerem múltiplas etapas e equipamentos especializados. Métodos tradicionais nem sempre são eficazes, podendo comprometer rendimento e pureza. Portanto, essa etapa representa uma parte significativa dos custos de produção, por exemplo, para produtos biofarmacêuticos as etapas de *downstream* representam cerca de 60-80% do custo total de produção já que requerem maior grau de pureza e, sendo assim, a complexidade do processo de purificação para tais produtos é elevada. Por isso, é crucial a operação em condições otimizadas e, quando possível, a substituição dos métodos tradicionais por técnicas alternativas mais eficientes e econômicas, diminuindo o número de operações unitárias.<sup>42-44</sup>

Todavia, o futuro da biotecnologia ainda promete avanços disruptivos. Uma das áreas mais promissoras é a biotecnologia de precisão, que utiliza inteligência artificial (IA) e aprendizado de máquina para otimizar a engenharia genética e a biomanufatura. Silva Neto *et al.* (2025)<sup>45</sup> destaca a integração da biotecnologia moderna com as tecnologias da era 4.0 e o potencial transformador que essa convergência pode trazer para questões ambientais. A chamada "Indústria 4.0" engloba avanços como inteligência artificial, automação, *big data* e internet das coisas (IoT), que, quando aplicados à biotecnologia, permitem uma abordagem mais eficiente e sustentável para enfrentar desafios globais.

Ainda, a biotecnologia industrial tem se beneficiado da automação e da robótica para otimizar a produção de enzimas e catalisadores biológicos que substituem processos químicos poluentes, reduzindo emissões de gases do efeito estufa. Dessa forma, a interseção entre essas áreas não apenas amplia as possibilidades de inovação, mas também impulsiona uma transição para uma economia de baixo carbono, fundamental para mitigar os efeitos do aquecimento global.<sup>39</sup>

Os avanços em IA oferecem enorme potencial para abordar questões altamente complexas relacionadas a *big data* e tarefas repetitivas, como engenharia metabólica de sistemas, modelagem em escala genômica, análise de conjuntos de dados complexos e engenharia de enzimas, bem como simular, prever e avaliar projetos de bioprodução. Por exemplo, a IA tem sido usada com sucesso na manufatura microbiana, incluindo anotação de genoma, engenharia de proteínas auxiliada por IA, projeto de proteínas funcionais artificiais, predição de vias habilitadas por IA e controle de bioprocessos.<sup>46</sup>

A inteligência artificial tem ampliado significativamente as possibilidades da engenharia enzimática (que visa modificar enzimas para melhorar sua estabilidade, especificidade e eficiência catalítica). Modelos de aprendizado de máquina são usados para prever propriedades catalíticas e estruturas enzimáticas, como demonstrado por Ryu *et al.* (2019)<sup>48</sup>, que aplicaram redes neurais para prever números de comissão enzimática (sistema de classificação numérica usado para identificar e classificar enzimas com base nas reações químicas que catalisam). Também, estudos como o de Cheng *et al.* (2023)<sup>49</sup> mostram como a IA pode identificar enzimas e metabólitos ausentes, viabilizando o design de sistemas biológicos sintéticos.<sup>47</sup> Ainda, Singh *et al.* (2021)<sup>51</sup> complementa que a IA ofereceu soluções para modelagem estrutural, observando pontos críticos de alteração e orientando mutações para necessidades específicas, o que ajuda muito a engenharia enzimática. Wang *et al.* (2023)<sup>52</sup> delibera que as ferramentas baseadas em IA mostraram grandes vantagens na redução do tempo computacional, permitindo maior precisão de previsão e fornecendo modelos treináveis adequados para usos amplos.<sup>50</sup>

Um marco interessante foi o desenvolvimento do *AlphaFold*, pela *DeepMind*, que revolucionou a predição da estrutura de proteínas. Com precisão quase experimental, o *AlphaFold* previu estruturas de mais de 350.000 proteínas, acelerando o design de fármacos

e a modelagem proteína-ligante. Este trabalho concedeu o Prêmio Nobel de Química de 2024 a três personalidades: David Baker, da Universidade de Washington, Demis Hassabis e John Michael Jumper, da *Google DeepMind*.<sup>47, 53</sup>

Com tudo, esses avanços demonstram como a IA está transformando a bioquímica, reduzindo tempo e custos em processos como descoberta de fármacos, engenharia enzimática e otimização metabólica, e promovendo inovações na biotecnologia industrial.<sup>47</sup>

## CONCLUSÃO

Considerando a necessidade de atender aos requisitos da química verde, a biotecnologia tem desempenhado um papel cada vez mais importante na indústria de aromas e fragrâncias, permitindo a produção sustentável e de alta qualidade de ingredientes. Os avanços no campo da bioquímica e das técnicas de manipulação genética, bem como o uso de intervenções de engenharia metabólica em plantas e microrganismos, levaram a uma compreensão mais aprofundada de novas vias biotecnológicas para a produção de compostos tradicionalmente extraídos de recursos naturais.

Ainda, pondera-se que, avanços na engenharia computacional de enzimas ajudarão a entender as relações estrutura-função, descobrir novas atividades enzimáticas e melhorar os biocatalisadores para que se tornem ainda mais econômicos e amplamente aplicáveis. Embora a Inteligência Artificial (IA) não substitua completamente a necessidade de experimentos, esta poderá reduzir o número desses, portanto, o tempo e os recursos necessários. Ao melhorar a eficiência e a especificidade das enzimas, a engenharia enzimática orientada por IA ajudará a reduzir o desperdício e o consumo de energia em processos industriais. Também acelerará a transformação da indústria química, tornando esses processos mais eficientes e ecologicamente corretos, contribuindo para um futuro mais sustentável.

Por fim, vale destacar que lançamentos bem-sucedidos de novos ingredientes produzidos biotecnologicamente na indústria de perfumes (por exemplo, Ambrox™, Ambrofix™,

Clearwood™) indicam que esses processos continuarão a ganhar popularidade devido a sua maior sustentabilidade, maior qualidade e relativa aceitabilidade econômica.<sup>12</sup>

## REFERÊNCIAS

1. Ribeaucourt, D.; Bissaro, B.; Lambert, F.; Lafond, M.; Berrin, J-G. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *56*, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107787
2. Maldonado, A. A.; Guo, J.; Niu, W.; *J. Biotechnol.* **2024**, *385*, 1–12, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.02.013
3. Malik, T.; Rawat, S. Em *Sustainable Bioeconomy*. Venkatramanan, V.; Shah, S.; Prasad, R., Springer, Singapore (2021), p. 131-170.
4. Shukla, R. Em *Flavor Development for Functional Foods and Nutraceuticals*. Pathak, Y.; Selvamuthukumar, M. CRC Press (2019), p. 141-165.
5. Maurya, R.; Patel, H.; Bhatt, D.; Shakhreliya, S.; Gohil, N.; Bhattacharjee, G.; Lam, N. L.; Alzahrani, K. J.; Gyanchander, E.; Singh, V. Em *Recent Advances in Food Biotechnology*. Kumar, A., Patruni, K., Singh, V. Springer, Singapore (2022), p. 139–159.
6. Moreira, R. C.; Leonardi, G. R.; Bicas, J. L.; *J. Biotechnol.* **2024**, *392*, 25–33, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.06.010
7. Na, S. W.; *Tese de Mestrado*. The Cooper Union, Estados Unidos, 2022
8. R, R. K.; Gopi, S.; Balakrishnan, P.; Em *Flavors and Fragrances in Food Processing: Preparation and Characterization Methods*. American Chemical Society, Bangalore, 2022, 1–19.
9. Burger, P.; Plainfossé, H.; Brochet, X.; Chemat, F.; Fernandez, X.; *Chem. Biodiversity.* **2020**, *17*, e1900424, doi: 10.1002/cbdv.201900424
10. Braga, A.; Guerreiro, C.; Belo, I.; *Food Bioprocess Technol.* **2018**, *11*, 2217–2228, doi: 10.1007/s11947-018-2180-8
11. Paulino, B. N.; Sales, A.; Felipe, L.; Pastore, G. M.; Molina, G.; Bicas, J. L.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *37*, 98–106, doi: 10.1016/j.cofs.2020.09.010

12. Manina, A. S.; Forlani, F.; *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7874, doi: 10.3390/ijms24097874
13. Chen, X.; Zhang, C.; Lindley, N. D.; *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10252–10264, doi: 10.1021/acs.jafc.9b06203
14. Armanino, N.; Charpentier, J.; Flachsmann, F.; Goeke, A.; Liniger, M.; Kraft, P.; *Angew. Chem.* **2020**, *59*, 16310–16344, doi: 10.1002/anie.202005719
15. Lin, Z.; Huang, B.; Ouyang, L.; Zheng, L.; *Molecules* **2022**, *27*, 3576, doi: 10.3390/molecules27113576
16. Sá, A. G. A.; Meneses, A. C.; Araújo, P. H. H.; Oliveira, D.; *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *69*, 95–105, doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.004;
17. Zhao, X.; Zhang, Y.; Cheng, Y.; Sun, H.; Bai, S.; Li, C.; *Sci. Total Environ.* **2020**, *757*, 144771, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144771
18. Cancellieri, M. C.; Nobbio, C.; Gatti, F. G.; Brenna, E.; Parmeggiani, F.; *Catalysts* **2024**, *13*, 1224, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.05.006
19. Gupta, S.; Gupta, C.; Garg, A. P.; Prakash, D.; A biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *J. Microbiol. Exp.* **2015**, *2*, doi: 10.15406/jmen.2015.02.00034
20. Jiang, H.; Wang, X.; *Biotechnol. Adv.* **2023**, *65*, doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108151
21. Dickey, R. M.; Gopal, M. R.; Nain, P.; Kunjapu, A. M.; *Biotechnol. Adv.* **2024**, *389*, 43-60, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.04.004
22. Michailidou, F.; Bearth, A.; Deilmann, C.; Siegrist, M.; *Food Qual. Prefer.* **2023**, *111*, 104994, doi: 10.1016/j.foodqual.2023.104994
23. Ohara, K.; Matsunaga, E.; Nanto, K.; Yamamoto, K.; Sasaki, K.; Ebinuma, H.; Yazaki, K.; *Plant Biotechnol. J.* **2009**, *7*, 829, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00461.x>
24. Zhan, X.; Zhang, Y.-H.; Chen, D.-F.; Simonsen, H. T.; *Plant Biotechnol. J.* **2014**, *5*, 636, doi: 10.3389/fpls.2014.00636
25. Forti, L.; Di Mauro, S.; Cramarossa, M. R.; Filippucci, S.; Turchetti, B.; Buzzini, P.; *Molecules* **2015**, *20*, 10377, doi: 10.3390/molecules200610377

26. Poornima, K.; Preetha, R.; *Asian J. Chem.* **2017**, *29*, 2521, doi: 10.14233/ajchem.2017.20748
27. Wang, Y.; Zhou, S.; Liu, Q.; Jeong, S.-H.; Zhu, L.; Yu, X.; Zheng, X.; Wei, G.; Kim, S.-W.; Wang, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 12949, doi: 10.1021/acs.jafc.1c05486
28. Zhang, J.; Wang, X.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Wang, F.; Li, X.; *Metab. Eng.* **2023**, *75*, 152, doi: 10.1021/acs.jafc.2c00754
29. Eichhorn, E.; Baumgartner, C.; Biermann, M.; *Chimia* **2023**, *77*, 439, doi: 10.2533/chimia.2023.384
30. Eichhorn, E.; Schroeder, F.; *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 5037, doi: 10.1021/acs.jafc.2c09010
31. Wiltschi, B.; Cernava, T.; Dennig, A.; Galindo Casas, M.; Geier, M.; Gruber, S.; Haberbauer, M.; Heidinger, P.; Herrero Acero, E.; Kratzer, R.; Luley-Goedl, C.; Müller, C. A.; Pitzer, J.; Ribitsch, D.; Sauer, M.; Schmörlzer, K.; Schnitzhofer, W.; Sensen, C. W.; Soh, J.; Steiner, K.; Winkler, C. K.; Winkler, M.; Wriessnegger, T.; *Biotechnol. Adv.* **2020**, *43*, 107520, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107520
32. Masuo, S.; Saga, C.; Usui, K.; Sasakura, Y.; Kawasaki, Y.; Takaya, N.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 843843, doi: 10.3389/fbioe.2022.843843
33. Zhang, X.; Liao, S.; Cao, F.; *BMC Biotechnol.* **2018**, *18*, 26, doi: 10.1186/s12896-018-0438-x
34. Long, Z.; Li, K.; Xue, Y.; Sun, Y.; Li, J.; Su, Z.; Sun, J.; Liu, Q.; Liu, H.; Wei, T.; *Biotechnol. Lett.* **2023**, *45*, 33, doi: 10.1007/s10529-023-03355-1
35. Ren, Y.; Qin, Z.; Li, C.; Yuan, B.; Yang, Y.; Qu, G.; Sun, Z.; *J. Biotechnol.* **2024**, *382*, 3, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.03.004
36. Yamaguchi, T.; Asano, Y.; *J. Biotechnol.* **2024**, *384*, 20, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.02.007
37. Ren, Y.; Liu, S.; Jin, G.; Yang, X.; Zhou, Y. J.; *Biotechnol. Adv.* **2020**, *43*, 107628, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107628

<https://www.croda.com/mediaassets/files/corporate/biotechnology/fragrancesbiotechnologyreport.pdf?la=en-GB&hash=2FC093180F81662CC30FF07F23657873>, acessada em maio de 2025;

39. Silva, D. R. T.; Silva, G. F.; Sousa, R. M. D. D.; Vilela, M. S.; Pires, M. C.; Peixoto, J. R.; Marinho, M. S.; *IOSR J. Bus. Manag.* **2025**, 27, 17, doi: 10.9790/487X-2702041722

40. Yasmeeen, S.; *Int. Res. J. Biotechnol.* **2023**, 14, 1, doi: 10.14303/2141-5153.2023.42

41. Seth, A.; Banyal, A.; Kumar, P.; Em *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*; Bhatt, A. K.; Bhatia, R. K.; Bhalla, T. C.; Academic Press, 2023, cap. 31, doi: 10.1016/B978-0-12-816109-8.00031-3

42. Beng, S.; *J. Adv. Chem. Eng.* **2023**, 13, 320, doi: 10.35248/2090-4568.23.13.320

43. Kilikian, B. V.; Pessoa Júnior, A.; *Purificação de produtos biotecnológicos - Operações e processos com aplicação industrial*. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020

44. Santana, C. C.; Lima, Á. S.; *Processos de Purificação de Bioativos para a Indústria Farmacêutica*. Aracaju-SE: EDUNIT, 2023

45. Silva Neto, R. C.; Pinheiro, L. A. L.; Souza, J. P. C.; Nascimento, A. V. S.; Nacif Junior, L. C.; Almeida, S. S. M. A.; Diniz, M. H. S.; *Rev. Gest. Soc. Ambient.* **2025**, 19, e010919, doi: 10.24857/rgsa.v19n1-108

46. Liu, L.; Wang, F.; Wang, L.; Jiang, X.; Zhang, H.; *The Innovation*, **2025**, 6, 100871, doi: 10.1016/j.xinn.2025.100871

47. Junaid, M. A. L.; *Biomol. Biomed.*, **2024**, 105, 11537, doi: 10.17305/bb.2024.11537;

48. Ryu, J. Y.; Kim, H. U.; Lee, S. Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, 116, e1821905116, doi: 10.1073/pnas.1821905116

49. Cheng, Y.; Bi, X.; Xu, Y.; Liu, Y.; Li, J.; Du, G.; Lv, X.; Liu, L.; *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2023**, 21, 1475, doi: 10.1016/j.csbj.2023.03.045

50. SALES, M. B.; *Monografia*, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Brasil, 2023

51. Singh, N.; Malik, S.; Gupta, A.; Srivastava, K. R.; *Emerg. Top. Life Sci.* **2021**, *5*, 113, doi: 10.1042/etls20200257
52. Wang, X.; Yang, P.; Zhao, B.; Liu, S.; *Syst. Microbiol. Biomanuf.* **2023**, *3*, 75, doi: 10.1007/s43393-022-00138-z
53. <https://theconversation.com/premio-nobel-de-quimica-como-a-ia-esta-revolucionando-a-predicao-de-estruturas-de-proteinas-240942>, acessada em agosto de 2025