



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS**



**UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NO
PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
*Croton argyrophyllus***

MATHEUS ANDRADE ROCHA COSTA

Itapetinga – Bahia
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Utilização de Extratos Enzimáticos no Processo de Extração do
Óleo Essencial de *Croton argyrophyllus*

Autor: Matheus Andrade Rocha Costa

Orientadora: Dra. Simone Andrade Gualberto

Co-orientador: Dr. Marcelo Franco

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga – Bahia
Fevereiro – 2018

583.69 Costa, Matheus Andrade Rocha
C874u Utilização de Extratos Enzimáticos no Processo de Extração do Óleo Essencial de *Croton argyrophyllus*. / Matheus Andrade Rocha Costa. – Itapetinga, BA: UESB, 2018.

63fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Simone Andrade Gualberto e co-orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco.

1. *Croton argyrophyllus* – Hidrodestilação. 2. *Croton argyrophyllus* - Óleo Essencial. 3. *Nopalea cochenillifera* - Fermentação em Estado Sólido. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Gualberto, Simone Andrade. III. Franco, Marcelo. IV. Título.

CDD(21): 583.69

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Siva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Croton argyrophyllus* – Hidrodestilação
2. *Croton argyrophyllus* – Óleo Essencial
3. *Nopalea cochenillifera* – Fermentação em Estado Sólido

MATHEUS ANDRADE ROCHA COSTA

“UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophyllus*”

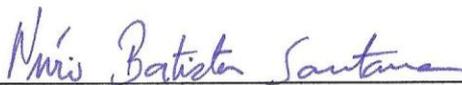
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 27/02/2018

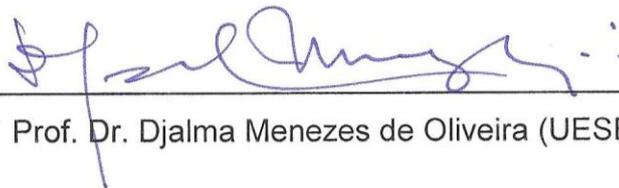
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Simone Andrade Gualberto (Orientadora/UESB)



Prof. Dr. Nívio Batista Santana (UESB)



Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UESB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde e força necessária para superar os obstáculos e conseguir alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais Sandra e Jesus, pelo amor, conselhos e por toda a dedicação e confiança em mim depositadas, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Aos meus irmãos Diógenes, Aída e Laiz que mesmo distantes são minha fortaleza e refúgio.

À minha namorada Neura por esta ao meu lado com todo carinho, amizade, atenção e incentivo constante, seja nos momentos alegres ou difíceis. Grato por todo o apoio ao longo da minha jornada acadêmica. Muito obrigado!

À Prof^ª Dra. Simone Andrade Gualberto pela amizade, confiança, respeito e paciência. Agradeço também por toda dedicação e inestimável orientação, contribuindo para minha formação acadêmica e pessoal. Obrigado por fazer parte da minha vida!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro possibilitando a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela contribuição em minha formação acadêmica e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA), pela motivação à pesquisa científica e oportunidade na realização do curso de mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON), pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e colaboração no desenvolvimento dos trabalhos, em especial, Cleia, Erica, Letícia e Mateus

À equipe dos laboratórios de pesquisa (LABRA e LAPIN), pelos conhecimentos compartilhados, inúmeros auxílios prestados e amizade, em especial, Dhiéssica, Juliana, Jabson e Quirlan.

À todos os professores de pesquisa que sempre me apoiaram e contribuições para realização deste trabalho, em especial, Marcelo Franco, Kátia Iro, Sandra Cunha, Nívio Batista e Danilo Leão.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pelos conhecimentos transmitidos, e a secretária Daniele Pita pelo carinho e toda atenção.

Aos gestores da Floresta Nacional Contendas do Sincorá pelo apoio na realização das atividades de campo, em especial ao Sr. Antonio Correia.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho e a Frances Regiane dos Santos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela disponibilidade e apoio na execução das análises química do óleo essencial.

Aos membros da banca examinadora por vir a contribuir com sugestões construtivas e pela disposição.

E finalmente a todos os familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Bioma Caatinga.....	03
2.2 Gênero <i>Croton</i>	05
2.3 Óleos essenciais.....	09
2.4 Métodos de extração de óleos essenciais.....	10
2.5 A parede celular vegetal.....	13
2.6 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal.....	15
2.6.1 Celulases.....	15
2.6.2 Hemicelulases.....	16
2.6.3 Enzimas Ligninolíticas.....	17
2.6.4 Enzimas Pectinolíticas.....	17
2.7 Fermentação em estado solido (FES)	18
2.7.1 Palma forrageira.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Local de realização dos trabalhos.....	22
3.2 Obtenção do Extrato enzimático.....	22
3.2.1 Preparação e caracterização do farelo de palma forrageira.....	22
3.2.2 Preparo do inóculo do fungo.....	22
3.2.3 Processo de fermentação em estado sólido (FES).....	23
3.2.4 Obtenção do extrato multienzimático.....	23
3.3 Determinação da atividade enzimática do extrato	24
3.3.1 Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	24
3.3.2 Atividade de CMCase (endoglucanase).....	24
3.3.3 Atividade de Celulases totais – FPase (endoglucanase e exoglucanase).....	25
3.3.4 Atividade de Poligalacturonase.....	25
3.3.5 Cálculo das atividades enzimáticas.....	26

3.4 Otimização do processo de extração de óleos essenciais das folhas <i>C. argyrophyllus</i>	26
3.4.1 Coleta do material vegetal e identificação botânica.....	26
3.4.2 Extração do óleo essencial das folhas secas de <i>C. argyrophyllus</i>	27
3.4.3 Aplicação do extrato multienzimático nas folhas frescas de <i>C. argyrophyllus</i>	27
3.4.4 Extração do óleo essencial após o pré-tratamento enzimático.....	28
3.4.5 Avaliação do tempo de pré-tratamento enzimático.....	28
3.4.6 Análises cromatográficas.....	29
3.4.7 Avaliação micromorfológica.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Caracterização físico-química do farelo de palma forrageira.....	31
4.2 Processo fermentativo.....	32
4.3 Obtenção do óleo essencial de <i>C. argyrophyllus</i>	35
4.3.1 Extração do óleo essencial.....	35
4.3.2 Análise cromatográfica do óleo essencial.....	43
4.3.3 Análise micromorfológica.....	50
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Planejamento estatístico Doehlert utilizado para a extração do óleo essencial de <i>C. argyrophyllus</i> , com os valores reais e codificados (entre parênteses).....	28
Tabela 2. Caracterização físico-química do farelo de palma forrageira (<i>Nopalea cochenillifera</i>).....	31
Tabela 3. Atividade enzimática obtida no processo fermentativo da palma forrageira com o fungo <i>Aspergillus niger</i>	32
Tabela 4. Rendimento do óleo essencial obtido das folhas secas de <i>C. argyrophyllus</i> em diferentes tempos de extração e sem a realização de tratamento enzimático.....	36
Tabela 5. Matriz Doehlert com os valores reais para as variáveis independentes aplicadas no pré-tratamento das folhas frescas de <i>C. argyrophyllus</i> (temperatura e volume de extrato enzimático), e a variável resposta do aumento do teor de óleo essencial, após 2h de extração.....	37
Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos e interações das variáveis estudadas no aumento de teor de óleo essencial.....	37
Tabela 7. Valores mínimos e máximos utilizados no planejamento experimental e valores ótimos obtidos através da análise estatística.....	40
Tabela 8. Aumento no teor de óleo essencial das folhas frescas de <i>C. argyrophyllus</i> a partir da variação do tempo de pré-tratamento enzimático com as condições ótimas pré-definidas (temperatura e volume de enzima).....	40
Tabela 9. Composição química do óleo essencial obtido de folhas frescas com e sem o tratamento enzimático e do óleo obtido das folhas secas de <i>C. argyrophyllus</i>	44
Tabela 10. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG/EM nos óleos essenciais das folhas de <i>C. argyrophyllus</i>	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Croton argyrophyllus</i>	08
Figura 2. Extrator de Clevenger.....	11
Figura 3. Estrutura da parede celular vegetal representando as fibras de celulose, hemicelulose, lignina e pectina.....	13
Figura 4. Mecanismo de ação do complexo enzimático.....	16
Figura 5. Representação da fermentação em estado sólido.....	18
Figura 6. Palma forrageira (<i>Nopalea cochenillifera</i>).....	21
Figura 7. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos da temperatura e volume de enzima no aumento de massa do óleo essencial extraído das folhas frescas de <i>C. argyrophyllus</i>	38
Figura 8. Gráfico de superfície de resposta para o aumento de massa de óleo em função do volume de enzima e da temperatura de contato.....	39
Figura 9. Aumento no rendimento de extração do óleo essencial de <i>C. argyrophyllus</i> em função do tempo de contato, com as condições ótimas de temperatura e volume de enzima.....	41
Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura das folhas de <i>C. argyrophyllus</i> : Face adaxial (A) e face abaxial (B, C e D).....	51
Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura das folhas frescas após tratamento enzimático faces adaxial (E3) e abaxial (E1 e E2) / Controle - Faces adaxial (F1) e abaxial (F2 e F3).....	52

RESUMO

COSTA, M.A.R. **Utilização de extratos enzimáticos no processo de extração do óleo essencial de *Croton argyrophyllus***. Itapetinga-BA: UESB, 2018. 73 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

Muitas espécies vegetais produzem substâncias bioativas que podem ser utilizadas na formulação de diversos fármacos, destacando-se o *Croton argyrophyllus*, que produz um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos, com propriedades farmacológicas já comprovadas. No entanto, o rendimento deste óleo essencial é baixo, tornando-se necessário buscar alternativas para aumentar a eficiência de extração. A aplicação de extratos enzimáticos, associado aos processos convencionais de extração dos óleos essenciais, vem adquirindo grande interesse da indústria biotecnológica, tornando-se uma alternativa consistente para minimizar os custos e proporcionar o aumento no rendimento de extração destes óleos. Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar o teor do óleo essencial obtido no processo de extração por hidrodestilação das folhas de *C. argyrophyllus*, com e sem o pré-tratamento enzimático, realizado com extratos produzidos por fermentação em estado sólido da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), com o fungo *Aspergillus niger*, bem como realizar a análise da composição química dos óleos e analisar microscopicamente a estrutura foliar. As condições ótimas para a obtenção do extrato enzimático foram: Temperatura de 30°C, Tempo de 96 horas e 60% de umidade. As atividades enzimáticas quantificadas foram: CMCase (10,75 U/mL), Celulases Totais (19,40 U/mL) e Poligalacturonase (28,74 U/mL). Posteriormente, o extrato enzimático foi utilizado no pré-tratamento das folhas frescas da espécie em estudo, conforme planejamento pela matriz Doehlert, que foi utilizada para otimizar a temperatura e o volume de extrato. Foram avaliadas cinco faixas de temperaturas (25, 32,5, 40, 47,5 e 55°C) e três volumes de extrato enzimático (60, 120 e 180 mL), com o tempo de contato das folhas frescas com o extrato enzimático sendo fixado em 3 horas, seguindo a extração do óleo essencial por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, durante 2 horas. O modelo proposto foi bem ajustado, otimizando estatisticamente a temperatura em 41,3°C e o volume do extrato enzimático em 130,73 mL, elevando o rendimento de óleo extraído em até 9,81% em relação ao controle. A partir destas condições ótimas, realizou-se a avaliação do tempo de contato no pré-tratamento, sendo estudadas sete faixas de tempo (60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 min), sendo o tempo de 140 min determinado como valor ótimo. Em paralelo, foi realizada a obtenção do óleo essencial das folhas secas, utilizando a mesma técnica de hidrodestilação, sem o pré-tratamento enzimático, com o tempo de extração variando de 1 a 3,5 horas, obtendo-se um rendimento máximo de 0,37% (g/g). Foram realizadas avaliações micromorfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura na estrutura foliar, podendo ser observado o rompimento dos tricomas glandulares e a presença de muitos tricomas estrelados. A avaliação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), não sendo observadas alterações significativas na composição química do óleo obtido com e sem o pré-tratamento enzimático. Os constituintes majoritários identificados no óleo essencial foram o biciclogermacreno (13,64%) e o β -cariofileno (15,57%). A combinação do pré-tratamento enzimático associado à técnica de hidrodestilação promoveu uma elevação no rendimento do óleo essencial das folhas de *C. argyrophyllus*, preservando a integridade dos constituintes majoritários do óleo, demonstrando assim a eficiência do processo.

Palavras-Chaves: *Croton argyrophyllus*, Fermentação em Estado Sólido, *Nopalea cochenillifera*, Hidrodestilação.

ABSTRACT

COSTA, M.A.R. **Usage of enzymatic extracts in the process of essential oil extraction from *Croton argyrophyllus***. Itapetinga-BA: UESB, 2018. 73 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

Many plant species produce bioactive substances that can be used in the formulation of several drugs, mainly *Croton argyrophyllus*, which produces an essential oil rich in monoterpenes and sesquiterpenes, with attested pharmacological properties. However, the yield of this essential oil is low, it is necessary to look for alternatives to improve the extraction efficiency. The application of enzymatic extracts, associated to the standard extraction procedures of the essential oils, has obtained great interest of the biotechnology industry, becoming a consistent option to minimize costs and optimize results. Thus, the aim of this study was to evaluate the essential oil content obtained in the hydrodistillation process of the leaves of *C. argyrophyllus*, with and without enzymatic pretreatment, with extracts produced by solid state fermentation of forage palm (*Nopalea cochenillifera*), with the fungus *Aspergillus niger*, as well as to perform the analysis of the chemical composition of these oils and to analyze the leaf structure microscopically. The optimal conditions to achieve the enzymatic extract were: Temperature at 30°C, time 96 h and 60% humidity. Quantified enzymatic activities were: CMC_{case} (10.75 U/mL), Total Cellulases (19.40 U/mL) and Polygalacturonase (28.74 U/mL). Afterwards, the enzymatic extract was used in the pretreatment of the fresh leaves of the species under study, as planned by the Doehlert matrix, which was used to optimize temperature and extract volume. Five temperatures (25, 32.5, 40, 47.5 and 55°C) and three volumes of enzyme extract (60, 120 and 180 mL) were evaluated with the time of contact of the fresh leaves with the enzymatic extract being fixed in 3 hours, following the extraction of the essential oil by hydrodistillation in Clevenger apparatus, during 2 hours. The proposed model was well adjusted, statistically optimizing the temperature at 41.3 °C and the volume of the enzymatic extract in 130.73 mL, increasing the yield of extracted oil by up to 9.81% compared to the control. From these optimal conditions, the contact time was evaluated in the pretreatment, being studied seven timeslots (60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 min), being 140 min determined as optimal value. In parallel, the essential oil of the dried leaves was obtained, using the same technique of hydrodistillation, without the enzymatic pre-treatment, at extraction time from 1 to 3.5 h, obtaining a maximum yield of 0.37% (g/g). Micromorphological evaluations were performed by Scanning Electron Microscopy in the leaf structure, being possible to observe the rupture of the glandular trichomes and the presence of many starry trichomes. Chemical constituents were evaluated by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). No significant changes were observed in chemical composition with and without enzymatic pretreatment. The predominant constituents identified in the essential oil were bicyclogermacrene (13.64%) and β -caryophyllene (15.57%). The enzymatic pretreatment associated with the hydrodistillation technique promoted an increase in the yield of the essential oil of the leaves of *C. argyrophyllus*, preserving the integrity of its major constituents, thereby demonstrating the efficiency of the process.

Keywords: *Croton argyrophyllus*, Solid State Fermentation, *Nopalea cochenillifera*, Hydrodistillation.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana e atualmente, sua utilização encontra-se em expansão por todo o mundo, representando um importante recurso natural e terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos (SARAIVA et al., 2015; SADAT-HOSSEINI et al., 2017).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades de todo o mundo, com uma ampla variedade de espécies vegetais, representando cerca de 20% de toda a flora mundial, o que lhe confere relevante interesse junto à comunidade internacional em relação ao uso e exploração desses recursos (DUTRA et al., 2016). Em meio às inúmeras espécies vegetais que compõe a flora brasileira, o gênero *Croton* merece destaque, pois agrupa um grande número de espécies produtoras de óleos essenciais e metabolitos secundários, que as torna fontes promissoras de substâncias bioativas utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças, bem como para a formulação de fármacos, coadjuvantes e inseticidas (LOPES et al., 2012; RAMOS et al., 2013; SARAIVA et al., 2015; CARVALHO et al., 2016).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais, que apresentam uma composição química complexa de substâncias voláteis, dotados de um forte aroma. Nas folhas de grande parte das espécies vegetais se encontram a maior quantidade de glândulas especiais (tricomas), responsáveis por armazenar estes óleos. As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais de espécies vegetais são muitas, e elas vêm sendo cada vez mais estudadas pela comunidade científica para aplicação nas indústrias alimentícia, farmacológica e biotecnológica (MORAIS et al., 2006; NAVARRETE et al., 2011).

A extração de óleos essenciais normalmente é realizada através de diferentes processos convencionais, destacando-se a hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, enfloração e a prensagem a frio. Entretanto, um dos grandes desafios é a obtenção de quantidades adequadas desses produtos, pois o teor dos óleos extraídos normalmente é baixo e muitas vezes inferior a 1% para diversas espécies vegetais (SERAFINI et al., 2002; SILVEIRA et al., 2012).

O desenvolvimento e o aprimoramento de novas técnicas para minimizar os custos do processo de extração do óleo essencial e aumentar a sua eficiência é um dos grandes desafios do setor. Uma alternativa ainda com poucos estudos encontrados na literatura, é a utilização do tratamento enzimático associado aos métodos de extração de óleos essenciais (REIS, 2015).

A aplicação de enzimas contribui para a degradação da parede celular vegetal, facilitando a remoção do óleo essencial, podendo ser aplicadas no material vegetal fresco antes do processo de hidrodestilação, otimizando assim o tempo de extração, eliminando a etapa de secagem e reduzindo a energia necessária para o processo (REIS, 2015). O processo de secagem pode ser crítico para qualquer espécie aromática, podendo ocasionar a redução do teor do óleo essencial, através do rompimento dos tricomas, favorecendo a volatilização ou a degradação das substâncias presentes no óleo essencial (MACHADO et al., 2013).

A desvantagem deste pré-tratamento enzimático é o alto custo das enzimas comerciais, principalmente as mais purificadas. No entanto, a utilização de extratos enzimáticos brutos pode ser uma alternativa economicamente viável, visto que a produção de extratos multienzimáticos pode ser efetuada a partir da fermentação em estado sólido (FES), utilizando como substrato, resíduos agroindustriais, como: farelo de soja, farelo de trigo e de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, polpa de café, entre outros. O aproveitamento da biomassa vegetal regional também é importante para reduzir os custos de produção de biocompostos (SINGHANIA et al., 2009; RIGO et al., 2010).

Dentre as biomassas vegetais disponíveis, destaca-se a palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), uma cactácea de origem mexicana, largamente cultivada na região semiárida nordestina, com enorme potencial produtivo, apresentando quantidades elevadas de nutrientes digestíveis totais, com altos níveis de carboidratos solúveis e vitaminas (CHIACCHIO et al., 2006). E por ser rica em nutrientes, a palma forrageira apresenta características interessantes para a produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido, sendo que a aplicação destas enzimas no processo de extração do óleo essencial de espécies aromáticas poderá contribuir para o desenvolvimento desta tecnologia, possibilitando a redução dos custos do processo e um maior rendimento de obtenção do óleo essencial.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar o pré-tratamento enzimático nas folhas de *Croton argyrophyllus* para aumentar o teor de óleo essencial no processo de extração por hidrodestilação, a partir da utilizando extratos multienzimáticos produzidos por fermentação em estado sólido da palma forrageira com o fungo *Aspergillus niger*, bem como realizar a determinação da composição química destes óleos e analisar a estrutura foliar através de estudos micromorfológicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioma Caatinga

A Caatinga representa o principal ecossistema da Região Nordeste e é considerado o único bioma exclusivamente brasileiro. Sua área corresponde a 11% do território nacional, estando presente em ao menos dez estados, abrangendo uma porção da região sudeste (norte de Minas Gerais) até o nordeste brasileiro (Ceará e Rio Grande do Norte), e constitui o chamado Polígono das Secas (LEAL et al., 2003; ALVES et al., 2009).

O bioma apresenta um clima típico de semiárido, com a temperatura anual variando de 25°C a 29°C e uma precipitação média anual em torno de 1000 mm, mas metade da região recebe menos de 750 mm e algumas áreas mais centralizadas menos 500 mm (LEAL et al., 2003; PRADO, 2003). Normalmente, as chuvas na Caatinga são concentradas em três meses consecutivos, ocasionando uma longa estação de seca e irregularidades pluviométricas ao longo do ano, sendo que algumas localidades experimentam períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade hídrica (PRADO, 2003).

A vegetação no bioma é representada basicamente por plantas xerofíticas e caducifólias muito resistentes as secas, sendo adaptadas à escassez de água, com fisionomia e florística diversificada (PRADO, 2003). É uma mistura de estratos herbáceo, arbustivo e arbóreo de pequeno porte, tortuosa e espinhenta, com folhas pequenas ou modificadas em espinhos para evitar a evapotranspiração. São constituídas principalmente por espécies da família Cactaceae, Caesalpinaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Mimosaceae (GIULIETTI et al., 2004; CORDEIRO & FÉLIX, 2014).

Durante a estação seca, boa parte da vegetação da Caatinga perde suas folhas, permanecendo na paisagem apenas os troncos com aspectos esbranquiçados das árvores e arbustos, e devido a essas características, o bioma recebe o nome de “Caatinga”, de origem “Tupi-Guarani”, que significa “Mata Branca” (PRADO, 2003).

Até meados do século XX acreditava-se que a Caatinga seria o resultado da degradação de formações vegetais anteriores, como a Mata Atlântica ou a Floresta Amazônica (ALVES et al., 2009). Este pensamento produziu convicções equivocadas de que o bioma seria homogêneo,

com sua biota pobre em espécies e em endemismos, e com baixa prioridade de conservação, passando a ser considerado o bioma brasileiro mais desvalorizado e pouco estudado durante o período, ficando sempre em segundo plano quando se discutem políticas para o estudo e a conservação da biodiversidade do país (SILVA et al., 2003; ALVES et al., 2009).

Atualmente, novos estudos têm revelado o grande potencial da Caatinga, demonstrando que o bioma abriga uma ampla biodiversidade, com alto grau de endemismo e elevado potencial econômico e farmacológico. Apresentando ambientes extremamente heterogêneos, que incluem vários subtipos de caatingas, as quais variam em fisionomia e composição florística, formando paisagens únicas, com trechos se constituindo em verdadeiros “mosaicos” de vegetação, solo e disponibilidade de água (SILVA et al., 2003; ALVES et al., 2009).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o bioma abriga 178 espécies de mamíferos, 221 espécies de abelhas, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios e 241 de peixes, com níveis de endemismos variando de 3% a 7% para as aves e mamíferos, a 57% nos peixes. Enquanto que Giulietti et al. (2004), identificou 932 espécies de plantas vasculares, das quais 318 são endêmicas da Caatinga.

A biodiversidade na Caatinga certamente é muito maior do que expressam os dados relatados na literatura, pois ainda existem muitas outras espécies por descobrir, o que evidencia a precariedade do conhecimento sobre este rico bioma. Além de exibir uma rica biodiversidade, o bioma apresenta muitas espécies vegetais que são utilizadas pela população local, representando verdadeiras fontes de matéria-prima para a alimentação humana e animal, em reflorestamento e produtos madeireiros (lenha, carvão, estacas), bem como fonte de produtos medicinais e fitoterápicos (GIULIETTI et al., 2004).

Muitas pesquisas têm sido realizadas na Caatinga com o intuito de caracterizar a biologia, ecologia e compostos químicos da flora e, embora ainda não exista comprovação científica para todos os usos fitoterápicos indicados, muitas destas espécies vegetais são bastante utilizadas por comunidades tradicionais e curandeiros, como sedativos, estimulante do apetite, na cura de distúrbios intestinais e estomacais, febre, dor de cabeça, processos inflamatórios, gripe, câncer, reumatismos e doenças de pele (GIULIETTI et al., 2004; ALBUQUERQUE et al., 2007; SARAIVA et al., 2015).

Empresas fabricantes de essências e aromas, indústrias de alimentos e farmacêuticas também vêm utilizando as plantas da Caatinga e, com isso, o número de pesquisas sobre as suas propriedades tem aumentado consideravelmente e contribuindo com novos conhecimentos sobre a biodiversidade da região. Entretanto, este crescimento na procura por plantas medicinais gera preocupações para as comunidades do entorno, sobretudo quando as

espécies são coletadas de forma não sustentável, podendo resultar na destruição da biodiversidade, acarretando em perda do patrimônio genético do bioma, bem como da qualidade de vida das populações rurais (GARIGLIO, 2010; PEREIRA JÚNIOR et al., 2014).

A região Nordeste compreende cerca de 27 milhões de habitantes, a maioria carente e dependente dos recursos do bioma para sobreviver, e por conta da elevada prática de atividade extrativista, bem como as sucessivas temporadas de seca, a Caatinga tornou-se um dos biomas mais alterados e ameaçados do país, com extensas áreas degradadas e apresentando a menor extensão protegida dentre todos os biomas brasileiros, com 7,7% protegidos por unidades de conservação, sendo que apenas 1,2% destas unidades são de proteção integral (GIULIETTI et al., 2004; BRASIL, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Atualmente, cerca de 46% da Caatinga já foi desmatada e o que resta dos ecossistemas naturais do bioma é altamente fragmentado. O desmatamento é um dos maiores problemas associados à região, favorecendo os processos de desertificação e a perda de biodiversidade (BRASIL, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Existem inúmeras espécies vegetais que ainda não foram completamente elucidadas no bioma, além de outras que nem sequer foram descritas e que estão sendo ameaçadas de extinção. Desta forma, torna-se importante a existência de novas pesquisas e trabalhos de etnobotânica, que sejam complementados com planos de conservação e recuperação de áreas degradadas, visando à preservação da Caatinga e dos conhecimentos tradicionais sobre seus recursos naturais (GIULIETTI et al., 2004; ALVES et al., 2009; BRASIL, 2011).

2.2 Gênero *Croton*

O gênero *Croton* é considerado o segundo maior da família Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, podendo encontrar representantes tanto medicinais, quanto tóxicos. Esse gênero é distribuído predominantemente no continente americano, embora, também sejam encontrados representantes na África, Ásia e Oceania, sendo delimitado por áreas subtropicais e tropicais. Seu grande grupo abrange diversas espécies arbóreas, arbústeas, ervas e cipós. (BERRY et al., 2005; SILVA et al., 2010; MEIRELES et al., 2016).

No Brasil, o gênero *Croton* apresenta cerca de 350 espécies distribuídas em diferentes biomas, destacando-se o Cerrado, a Caatinga e os Campos Rupestres (BERRY et al., 2005; LIMA & PIRANI, 2008). Entre as espécies de ocorrência no Brasil, cerca de 300 são consideradas endêmicas (POLLITO et al., 2004), e de acordo com Carneiro-Torres et al. (2011), existem 68 espécies de *Croton* descritas na Caatinga, sendo apontado como um dos

principais gêneros de ocorrência nesse bioma. No entanto, este número não é definitivo, tendo em vista que este grupo é taxonomicamente pouco estudado, devido a sua variedade e complexidade morfológica, o que dificulta a sua identificação.

Na região do semiárido nordestino, as espécies do gênero *Croton* são conhecidas popularmente por velames ou marmeleiros e são utilizadas para os mais variados fins, tendo importância no tratamento de enfermidades como micoses, processos inflamatórios, diabetes, gripe, diarreia, indigestão, doenças de pele, câncer, reumatismo, dor e distúrbios gastrintestinais (ALBUQUERQUE et al., 2007; SARAIVA et al., 2015).

Muitas espécies desse gênero produzem metabólitos secundários com propriedades farmacológicas já comprovadas cientificamente como, cicatrizantes, antiinflamatória, anticancerígena, antioxidante, antimicótica, antibacteriana e antiviral, o que as torna fontes promissoras de substâncias bioativas utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças e na formulação de fármacos, coadjuvantes e inseticidas (ALMEIDA et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; COELHO et al., 2016; CORDEIRO et al., 2016; YAGI et al., 2016).

Os principais metabólitos secundários não voláteis identificados nas espécies de *Croton* pertencem, principalmente, às classes dos alcalóides, esteróides, terpenóides e flavonóides (LOPES et al., 2012; BARRETO et al., 2013; QIU et al., 2016). Coelho et al. (2016), investigou os efeitos de flavonóides isolados das folhas de *C. betulaster* sobre células tumorais de glioblastoma, verificando que os compostos isolados apresentaram atividade antitumoral e que podem ser utilizados como medicamentos promissores adicionais para o tratamento do glioblastoma.

Ravanelli et al. (2016), investigaram o potencial antiviral de dois alcalóides isolados do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. echinocarpus*, uma planta nativa e endêmica do Brasil, amplamente distribuída na Mata Atlântica brasileira. Os autores verificaram que os alcalóides isolados exibiram um potencial anti-HIV significativo, inibindo 40% da atividade da enzima reversa de HIV-1, indicando que *C. echinocarpus* apresenta uma boa fonte de alcalóides com atividade antiviral.

Além da presença de extratos bioativos, o gênero *Croton* apresenta uma grande variedade de espécies aromáticas produtoras de óleos essenciais, sendo estes óleos ricos em mono e sesquiterpenos e fenilpropanóides (MORAIS et al., 2006; LOPES et al., 2012). Estes compostos voláteis orgânicos são responsáveis pela fragrância de muitas plantas, possuindo uma grande diversidade estrutural, resultando em verdadeiras fontes de substâncias bioativas, o que contribui para o aumento da importância do gênero a partir do ponto de vista medicinal (MORAIS et al., 2006).

C. campestris, conhecido popularmente como velame do campo, é uma das espécies do gênero *Cróton* produtoras de óleo essencial e que apresenta substâncias bioativas de interesse farmacológico. De acordo com Almeida et al. (2013), o óleo essencial das folhas e ramos de *C. campestris* apresentam diferentes sesquiterpenos, que podem ser utilizados como fonte de produtos naturais com atividade antimicrobiana. Esta espécie é bastante utilizada na medicina popular como depurativo, bem como, para distúrbios gástricos, problemas respiratórios, reumatismo e processos inflamatórios (FRANCISCO JÚNIOR et al., 2014).

Em estudos realizados com *C. zenhtneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyllodes*, Morais et al. (2006), demonstraram que os óleos essenciais obtidos das três espécies, comuns do semiárido nordestino, apresentaram potencial antioxidante, com uma composição química rica em constituintes monoterpênóides e sesquiterpenóides (E-anetol, formiato de anisila, anisalaldeído, metileugenol, 1,8-cineol, α -pineno e espatulenol), e que tal atividade antioxidante pode estar relacionada com a ação sinérgica destes compostos.

Algumas espécies também apresentam potencial inseticida, como *C. tetradenius*, investigado por Carvalho et al. (2016), que comprovaram que o óleo essencial obtido das folhas dessa espécie apresenta atividade inseticida sobre as larvas e adultos de *Aedes aegypti*, e que esta atividade pode estar relacionada com a presença de cânfora na sua composição química. Silva et al. (2014), verificaram que extratos etanólicos obtidos dos caules de *C. linearifolius* também apresentaram potencial inseticida contra larvas de *Ae. aegypti*.

Além da importância medicinal e inseticida, algumas espécies do gênero *Croton*, também podem ser utilizadas como alternativa para a restauração de florestas degradadas. Apresentando características ecológicas ideais, como crescimento rápido em locais perturbados e uma boa produção de flores e frutos por longos períodos do ano (LOPES et al., 2012).

As espécies de *C. urucurana* e *C. floribundus*, foram cultivadas com a finalidade de reflorestamento na região Sudeste e apresentaram rápido crescimento, contribuindo para a criação de um ambiente favorável para as espécies não pioneiras (COLMANETTI et al., 2016). Silva et al. (2012), observaram que *C. blanchetianus* e *C. argyrophyllus* também são comuns em áreas com grandes perturbações, por apresentarem facilidade de reprodução e dispersão, e de acordo com os autores, as duas espécies se destacaram em todas as classes de tamanhos e áreas estudadas.

O *Croton argyrophyllus* Kunth (Figura 1), objeto de estudo deste trabalho, é uma espécie arbustiva, normalmente encontrada em países da América do Sul, como Brasil,

Colômbia, Bolívia e Venezuela, com ampla distribuição em vegetações da Caatinga e do Cerrado (SILVA et al., 2010).



Figura 1. *Croton argyrophyllus*. (Fonte: COSTA, M. A. R. 2017).

Na região da Caatinga do nordeste brasileiro, a espécie é popularmente conhecida como “velame falso”, “marmeleiro branco” ou ainda “alecrim-de-vaqueiro” (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2010). Apresenta importância na medicina popular, sendo utilizada como alternativa para o tratamento de doenças cardíacas, distúrbios do estômago, fígado, diarreia e indigestão (SILVA-FILHO et al., 2011; SARAIVA et al., 2015).

Alguns estudos já demonstraram que o óleo essencial de *C. argyrophyllus* apresenta atividades biológicas. Cruz et al. (2017), relataram que o óleo essencial de *C. argyrophyllus* é composto por monoterpenos e sesquiterpenos (oxigenados e hidrocarbonados), e que estas substâncias são responsáveis pelo efeito tóxico obtido sobre as larvas e adultos de *Ae. aegypti*, constatando também, que este óleo essencial apresenta uma boa margem de segurança para uso como inseticida botânico, podendo ser utilizado para o controle deste vetor.

Segundo Ramos et al. (2013), o óleo essencial de *C. argyrophyllus* apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante e, de acordo com os referidos autores, tal efeito anti-inflamatório pode estar relacionado, pelo menos em parte, com sua capacidade antioxidante. Outras atividades biológicas já identificadas para o óleo essencial de *C. argyrophyllus* são o

seu efeito antinociceptivo (RAMOS et al., 2016) e a atividade citotóxica (ARAÚJO et al., 2014).

Já Costa et al. (2017), investigaram que o extrato etanólico e frações obtidos dos caules de *C. argyrophyllus*, também apresentam potencial antioxidante, com altos teores de fenólicos e flavonoides totais, estando estes correlacionados com os valores da atividade antioxidante encontrados para os mesmos. Contudo, segundo Ramos et al. (2013), diversos mecanismos de ação dessa espécie ainda permanecem desconhecidos, principalmente quando comparada a outras espécies do mesmo gênero.

2.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também definidos como óleos voláteis ou estéreos, são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais, que apresentam uma composição química complexa de substâncias voláteis, dotados de um forte aroma, sendo mais viscosos e menos densos do que água à temperatura ambiente (MORAIS et al., 2006; NAVARRETE et al., 2011).

O armazenamento dos óleos essenciais no tecido vegetal pode ocorrer em diversos órgãos como flores, folhas, cascas do caule, frutos e sementes. No entanto, são nas folhas de grande parte das espécies vegetais que se encontram a maior quantidade de células (tricomas) especializadas em sintetizar e armazenar o óleo essencial (MORAIS et al., 2006; NAVARRETE et al., 2011).

Os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais pertencem à classe dos terpenos, podendo apresentar também outras classes de compostos voláteis, como fenilpropanoides, álcoois, aldeídos, ésteres de ácidos graxos e hidrocarbonetos alifáticos. A composição do óleo essencial varia consideravelmente de espécie para espécie, podendo, também, sofrer influência de fatores como a precipitação, radiação, temperatura, solo, umidade, bem como do período e a época de coleta (MORAIS et al., 2006; SIMÕES et al., 2007; LOPES et al., 2012).

A depender da espécie, os óleos essenciais podem conter mais de 100 constituintes químicos, com dois ou três componentes majoritários, que lhes confere os sabores e odores próprios. No óleo essencial de *C. argyrophyllus* já foram identificados diversos compostos (sesquiterpenos e monoterpenos), formando um conjunto complexo de metabólitos secundários, tendo como principais constituintes o biciclogermacreno, espatulenol, β -cariofileno e α -pineno (RAMOS et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; CRUZ et al., 2017).

Os componentes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *C. argyrophyllus* são responsáveis por suas atividades biológicas, já comprovadas cientificamente, como a atividade inseticida sobre larvas e adultos de *Aedes aegypti* (CRUZ et al., 2017), o efeito anti-inflamatório e antioxidante (RAMOS et al., 2013), o efeito antinociceptivo (RAMOS et al., 2016) e a atividade citotóxica (ARAÚJO et al., 2014). No entanto, é possível que a atividade dos componentes majoritários seja modulada por outros componentes menores.

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são muitas, e elas vêm sendo cada vez mais estudadas pela comunidade científica, e utilizadas pela indústria alimentícia, farmacológica e biotecnológica. A volatilidade do óleo essencial e o baixo peso molecular dos seus constituintes permitem que eles sejam absorvidos e rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas. Outra vantagem é que os óleos essenciais podem gerar produtos com baixo impacto ambiental, seguros e acessíveis, quando comparados aos produtos sintéticos. Essas características favorecem a utilização de óleos essenciais para a formulação de fármacos, coadjuvantes e inseticidas naturais, tornando-os populares entre consumidores que preferem produtos naturais e mais sustentáveis (SIMÕES et al., 2007; NORRIS et al., 2015).

2.4 Métodos de extração de óleos essenciais

Existem diferentes métodos para extração de óleos essenciais em plantas medicinais e aromáticas. Dentre os processos convencionais mais utilizados, destacam-se a hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, enfloração e a prensagem a frio (SERAFINI et al., 2002; SILVEIRA et al., 2012).

Cada método de extração apresenta suas particularidades. A hidrodestilação utiliza o princípio de evaporar uma mistura de água e componentes voláteis presentes no material vegetal, por meio do aparelho de Clevenger (Figura 2). É um processo simples e econômico, amplamente utilizado em escala laboratorial, podendo servir de base para o desenvolvimento de processos industriais. No entanto, essa técnica pode ocasionar a hidrólise de alguns compostos presentes no óleo essencial, visto que a matéria-prima permanece em contato direto com a água quente por longos períodos de tempo (SILVEIRA et al., 2012; BUSATO et al., 2014).

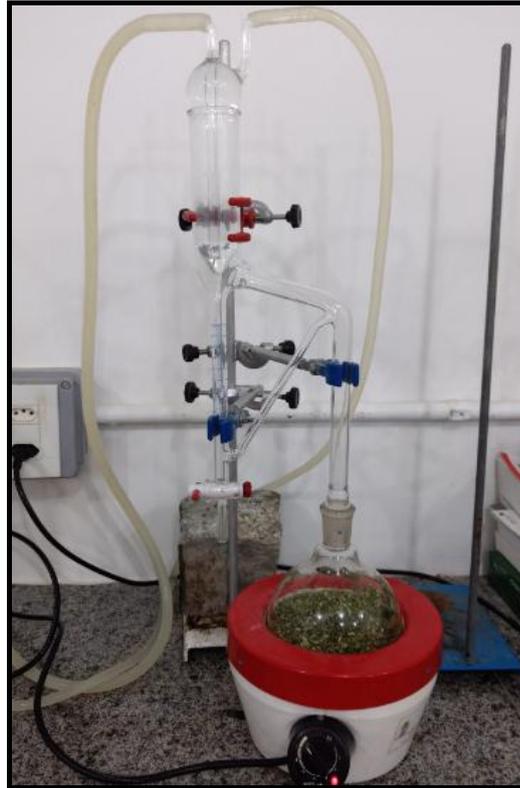


Figura 2. Extrator de Clevenger. (Fonte: COSTA, M. A. R. 2017).

A extração por solventes orgânicos apresenta algumas desvantagens: emprega preferencialmente solventes orgânicos (éter, éter de petróleo ou diclorometano), que podem ocasionar na remoção de cêras e pigmentos da matéria-prima junto com o óleo essencial, influenciando negativamente na qualidade final do produto, além de ser bastante difícil remover todo o solvente residual sem que ocorra um grande desperdício de energia (SERAFINI et al., 2002; SILVEIRA et al., 2012).

A destilação por arraste a vapor também é um método bastante simples e econômico, sendo muito empregado em escala industrial, principalmente, para matérias sensíveis à temperatura, entretanto, extrações mais demoradas apresentam compostos não apreciáveis (SILVEIRA et al., 2012).

A destilação e extração simultânea (SDE) é outra técnica tradicional e amplamente utilizada, que combina a extração de vapor e a extração de solventes de modo a simplificar os procedimentos experimentais, economizar solvente orgânico tóxico e reduzir a perda da amostra durante a sua transferência (ZHANG e LI, 2010). É uma técnica utilizada em todo mundo para extração de amostras sólidas e líquidas, principalmente devido à sua simplicidade, sendo o aparelho de Likens-Nickerson um dos dispositivos mais comuns utilizados no processo (PETRONILHO et al, 2014).

A extração por fluido supercrítico possibilita a obtenção de óleos essenciais de alta qualidade, mantendo de forma muito significativa a integridade dos compostos ativos da amostra, entretanto, é uma técnica que possui um custo inicial de instalação superior a outros métodos (SERAFINI et al., 2002; SILVEIRA et al., 2012).

Outros métodos menos utilizados são a enfloração, que é uma técnica normalmente empregada por indústrias de perfumes, na extração de óleo essencial a partir de flores e a prensagem a frio, empregada na extração de óleos de espécies cítricas (SILVEIRA et al., 2012; BUSATO et al., 2014).

Apesar dos diferentes métodos disponíveis para realizar a extração de óleos essenciais, o teor de óleo extraído normalmente é baixo, muitas vezes, inferior a 1% para diversas espécies vegetais, podendo ocorrer exceções, como no caso de botões florais de cravo, onde podem ser encontrados rendimentos superiores a 15% (SERAFINI et al., 2002).

De acordo com informações encontradas na literatura, as espécies do gênero *Croton*, apresentam um rendimento de óleo essencial variando de 0,05 a 3,15%. Cruz et al. (2017), estudando a espécie de *C. argyrophyllus* obteve um teor de óleo essencial das folhas secas equivalente a 0,48%, com 3 h de extração. Já o teor de óleo essencial das folhas frescas de *C. argyrophyllus* encontradas por Araújo et al. (2014) e Ramos et al. (2013), foi de 0,33% (3h) e 0,76% (2h), respectivamente. Todos os autores utilizaram o processo de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger para obtenção do óleo essencial.

Aumentar o rendimento de óleo essencial nos processos de extração é um dos grandes desafios encontrados, tornando-se necessário desenvolver e aprimorar novas técnicas. Uma alternativa, ainda com poucos estudos encontrados na literatura, é a utilização do tratamento enzimático associado aos métodos de extração de óleo essencial. As enzimas promovem a degradação do tecido celular vegetal facilitando a remoção do óleo essencial dos vacúolos intracelulares, aumentando o rendimento na extração do óleo sem ter a necessidade de alterar as etapas do processo de extração (SANTOS, 2008; OGEDA & PETRI, 2010).

A indústria de óleos vegetais já vem aplicando as enzimas através da extração combinada. A enzima normalmente é adicionada durante a etapa de cozimento, antes da prensagem do grão ou polpa, ocasionando uma pré-ruptura do tecido celular e aumentando o rendimento da prensagem. Essa etapa deve ser efetuada na temperatura de máxima atividade das enzimas, e a concentração de extrato enzimático deve ser otimizada por questões de viabilidade econômica (SANTOS, 2008).

A aplicação dessa tecnologia para obtenção de óleos essenciais pode ser feita através do pré-tratamento com soluções multienzimáticas e após o tempo de ação realiza-se a extração

do óleo essencial por hidrodestilação. A extração combinada com processo multienzimático possibilita a ruptura da parede celular vegetal, pois os extratos enzimáticos utilizados possuem diferentes atividades enzimáticas, que atuam sobre a superfície do material vegetal provocando rompimentos na epiderme foliar, atingindo a estrutura armazenadora de óleo e promovendo, dessa forma, a maior extração do óleo essencial (REIS, 2015).

2.5 A parede celular vegetal

A parede celular vegetal é formada por um complexo de polímeros, tais como celulose, hemicelulose e ligninas (Figura 3), que formam uma estrutura em ligações cruzadas, submersas em uma matriz de substâncias pécnicas e reforçadas com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (OGEDA & PETRI, 2010; REIS, 2015).

Pode-se dividir a parede celular vegetal em níveis estruturais: a parede celular primária, a parede secundária e a lamela média. A parede celular primária consiste principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas, possuindo um percentual de aproximadamente 70% de água. Já a parede secundária, embora não esteja presente em todas as células, fornece suporte estrutural, apresentando compostos de celulose e hemicelulose, sendo muitas vezes impregnados de lignina. Enquanto que a lamela média preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, e é constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose, sendo frequentemente difícil distingui-la da parede primária, principalmente nas células que formam paredes secundárias grossas (PRADE et al., 1999; CHANG, 2007; FARINAS, 2011).

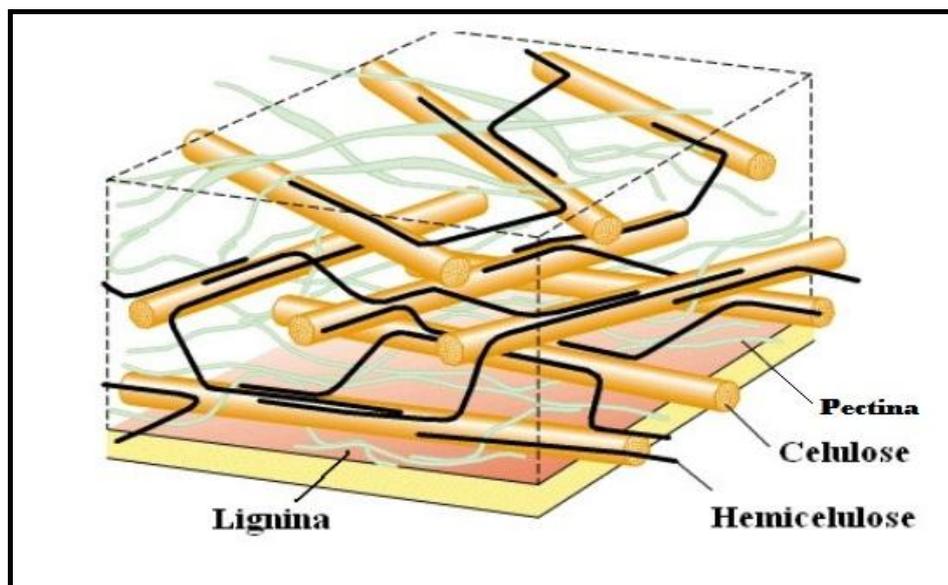


Figura 3. Estrutura da parede celular vegetal representando as fibras de celulose, hemicelulose, lignina e pectina. (Fonte: SANTANA, 2010).

A celulose é um polissacarídeo constituído por moléculas de glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando um polímero linear, que se entrelaça em finos filamentos (macrofibrilas). A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas, impermeáveis à água e resistentes à degradação química e biológica, sendo regiões altamente ordenadas e estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. A celulose também possui regiões menos ordenadas ou amorfas, com menos ligações de hidrogênio, sendo facilmente hidrolisáveis e hidratadas e mais acessíveis às enzimas (CHANG, 2007; FARINAS, 2011).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos constituído por vários monossacarídeos, que incluem pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila, diferenciando-se da celulose, principalmente por apresentar sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias bastante ramificadas e curtas (FARINAS, 2011). As hemiceluloses estabilizam a parede celular através de grupos que fazem ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina, e acredita-se que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas (OGEDA & PETRI, 2010).

As xilanas são os polissacarídeos mais comuns entre as hemiceluloses, sendo formadas por unidades de β -D-xilopiranosil unidas por ligações glicosídicas β -1,4, e são encontradas principalmente na parede celular secundária dos vegetais em íntima associação com a celulose, apresentando baixo grau de ramificação (LI et al., 2007; GÍRIO et al., 2010). A xilana ligada covalentemente com a lignina tem importante papel na manutenção da integridade da celulose, protegendo as fibras contra a ação de celulasas (WU et al., 2008).

A lignina representa um conjunto de polímeros amorfos, de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas, sendo caracterizada por uma estrutura aromática de natureza fenólica, tendo como função, conferir rigidez à parede das células, sendo considerada um dos maiores estoques de carbono e energia da natureza (FARINAS, 2011).

Já as substâncias pécnicas são macromoléculas glicosídicas que formam o maior componente da lamela média, contribuindo também para dar firmeza e estrutura aos tecidos vegetais. São polissacarídeos ácidos de natureza coloidal, compostas de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, que podem apresentar diferentes graus de esterificação (SANTI et al., 2014).

Uma vez que a parede celular vegetal apresenta essa estrutura resistente de celuloses, hemiceluloses, ligninas e substâncias pécnicas, faz-se necessário a ação de um conjunto de

enzimas degradadoras para rompê-la e possibilitar o aumento do rendimento na extração do óleo essencial de espécies vegetais (REIS, 2015).

2.6 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal

Existem muitos micro-organismos que desempenham um importante papel na conversão da biomassa vegetal, produzindo verdadeiros coquetéis enzimáticos capazes de degradar os componentes da parede celular vegetal (FARINAS, 2011). Entretanto, esta degradação ocorre lentamente na natureza, pois, a parede celular vegetal apresenta diferentes tipos de polímeros (celulose, hemicelulose, substâncias pécnicas, proteínas e lignina) que são dispostos e conectados de uma forma muito bem organizada, formando um material de estrutura rígida e muito resistente ao ataque enzimático (OGEDA & PETRI, 2010).

Desta forma, para que ocorra a degradação da parede celular vegetal de forma mais eficiente, torna-se necessário à ação de um conjunto de enzimas que precisam apresentar diferentes atividades, como as celulases, pectinases, xilanases e proteases, para ocasionar a ruptura da parede celular e aumentar o rendimento na extração do óleo essencial (SAHA et al., 2006).

2.6.1 Celulases

As celulases são um complexo enzimático que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose, que fazem parte da família das glicosil-hidrolases e reconhecem as ligações β -(1,4) entre as moléculas de glicose (HALCHAR et al., 2007). Podem ser produzidas por fungos ou bactérias, sendo que as enzimas fúngicas são amplamente disseminadas na natureza e dominam as aplicações comerciais (CHANG, 2007). Este complexo de enzimas celulolíticas pode ser dividido em pelo menos três grandes grupos que estão envolvidos no processo de hidrólise da cadeia de celulose: endoglucanases, exoglucanases e β -D-glucosidases (Figura 4) (OGEDA & PETRI, 2010; MENEZES & BARRETO, 2015).

As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Elas atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4) e liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos e conseqüentemente, gerando novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (OGEDA & PETRI, 2010). As endoglucanases também são conhecidas como celulases e carboximetilcelulases (CMC). Seus substratos naturais são a celulose e xiloglicana,

apresentando especificidade variável em carboximetilcelulose, avicel (celulose cristalina), β -glicana e xilana (LYNDY et al, 2002; REIS, 2015).

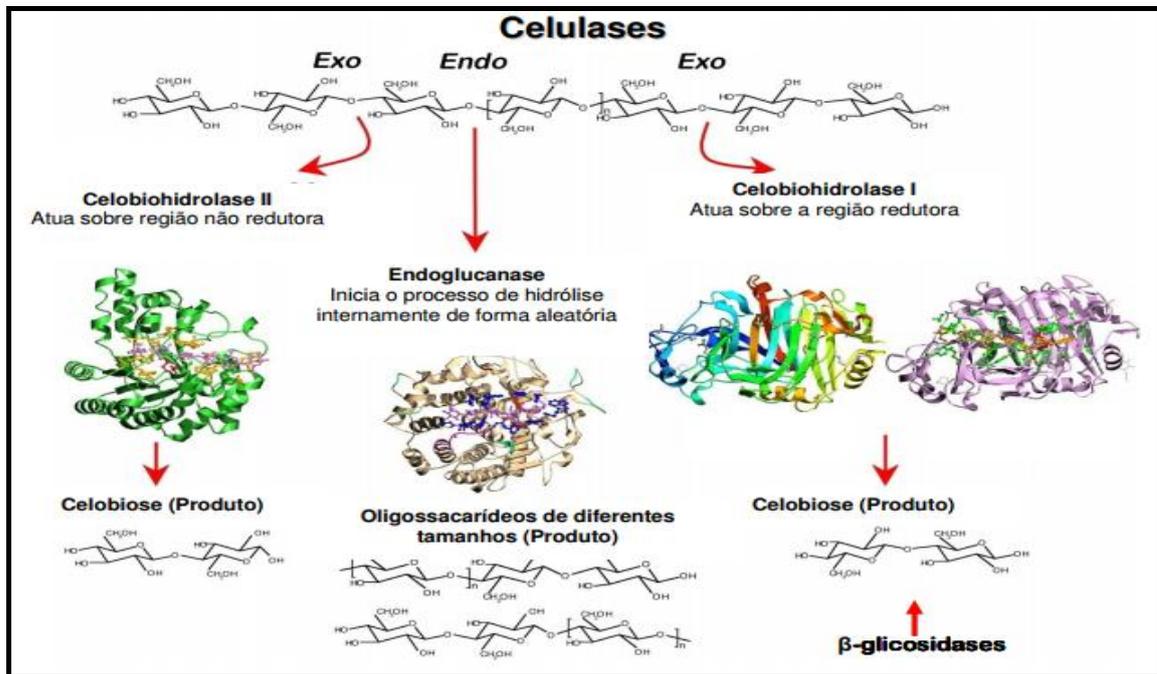


Figura 4. Mecanismo de ação do complexo enzimático. (Fonte: SANTANA, 2010).

As exoglucanases, também conhecidas como glucanohidrolases e celobiohidrolases, são enzimas que atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando celobiose das extremidades das cadeias (FARINAS, 2011). A celobiohidrolase pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Normalmente estas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose), sendo necessária a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico, como as β -glicosidases. As β -glicosidases são enzimas que têm a propriedade de hidrolisar a celobiose liberando glicose, diminuindo assim, a inibição das endo e exoglucanases pela presença deste produto (LYNDY et al, 2002; CASTRO & PEREIRA JÚNIOR, 2010).

2.6.2 Hemicelulases

As hemicelulases representam um grupo de enzimas capazes de degradar as estruturas complexas da hemicelulose, permitindo que as fibras de celulose se tornem mais acessíveis, sendo que as enzimas mais importantes desse grupo são as xilanases (hidrolisam ligações do tipo β -1,4 entre as unidades de xilose), as arabinases e as β -glicanases. As enzimas que

degradam a xilana vêm recebendo maior atenção, devido à sua complexa estrutura e por ser um dos polissacarídeos mais comuns entre as hemiceluloses (GÍRIO et al., 2010).

A degradação completa da xilana requer a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas e uma variedade dessas enzimas agem exclusivamente sobre as cadeias laterais, pois, com a liberação das cadeias laterais, a cadeia principal de xilana é exposta à clivagem pelas xilanases (FARINAS, 2011). A principal enzima para a despolimerização da xilana é a Endo-1,4- β -D-xilanase (1,4- β -D-xilana xilohidrolase). Sua ação ocorre na estrutura principal da xilana, acarretando na diminuição do grau de polimerização do substrato, enquanto que as β -xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolase) hidrolisam xilo-oligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010).

2.6.3 Enzimas Ligninolíticas

A degradação da lignina pode ser compreendida como o resultado da ação coordenada de um série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (SANTOS et al., 2011a). Esta biodegradação da lignina é um processo essencial na ciclagem de carbono, sendo que diversas enzimas estão envolvidas (peroxidases, lacases, manganês peroxidases, entre outras).

Estas enzimas que atuam na degradação da lignina podem ser agrupadas em fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. As fenoloxidasas são enzimas que pertencem às metaloproteínas, que podem se dividir em enzimas dependentes de peróxido, ou peroxidases, que incluem a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), sendo que esta última é a mais comum das ligninas peroxidases, desempenhando um papel crucial na degradação da lignina. O outro subgrupo contém as lacases que são cobre-proteínas e não dependem de peróxido para atuar (SANTOS et al., 2011a; REIS, 2015).

2.6.4 Enzimas Pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas são enzimas que degradam substâncias pécnicas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica, estando também associadas com a degradação dessa substância na parede celular vegetal (UENOJO & PASTORE, 2007). Estas enzimas também são conhecidas como pectinases e são produzidas em diferentes combinações pelas plantas e micro-organismo (fungos e bactérias). As pectinases podem ser classificadas em três tipos: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os

grupos metil éster dando origem ao ácido péctico; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (JAYANI et al., 2005; UENOJO & PASTORE, 2007).

Dentre a grande variedade de enzimas pécticas, as poligalacturonases (PGs) são as que mais se destacam, por serem consideradas as maiores enzimas com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido péctico. As poligalacturonases são úteis pela alta atividade enzimática, sendo também as enzimas mais bem estudadas dentro do complexo pectinolítico (JAYANI et al., 2005).

2.7 Fermentação em estado sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido (FES) é definido como o processo de crescimento de micro-organismos, principalmente fungos filamentosos, em substratos sólidos, contendo umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo do cultivo (Figura 5). Neste processo fermentativo, a água encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas, sendo que a sua quantidade varia consideravelmente de acordo com o substrato utilizado (CASCIATORI et al., 2015; BEHERA & RAY, 2016).

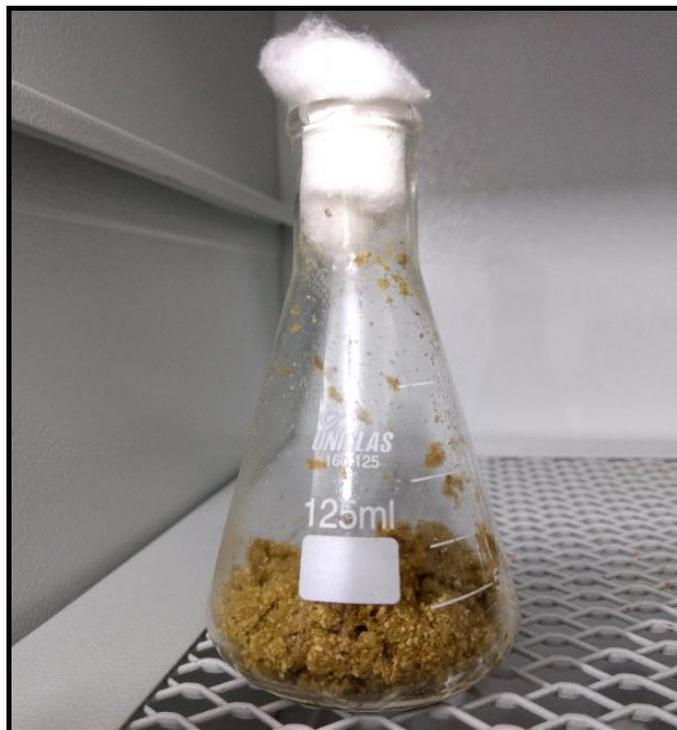


Figura 5. Representação da fermentação em estado sólido. (Fonte: COSTA, M. A. R. 2017).

O ambiente fornecido ao micro-organismo neste sistema é bem diferente daquele fornecido por outras técnicas de fermentação, como por exemplo, a fermentação submersa (FS), que ocorre em meio líquido (TAVARES, 2012). Devido à disponibilidade restrita de água na FES, a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de micro-organismos, na qual as condições de crescimento aproximam-se do *habitat* natural destes micro-organismos. Esta característica pode estimular a produção de algumas enzimas específicas, mais concentradas ou em grandes quantidades, que não seriam produzidas pelo mesmo organismo na fermentação submersa (RIGO et al., 2010; AMORIM et al., 2012; CASCIATORI et al., 2015).

Dentre os diferentes grupos de micro-organismos utilizados na fermentação em estado sólido, os fungos filamentosos são os mais explorados, pois apresentam um maior crescimento e melhor adaptação em substratos sólidos. Estes fungos são ideais para produção de substâncias de interesse biotecnológico, possuindo crescimento rápido e baixo custo de cultivo sob condições controladas (DURAND, 2003; CHANG, 2007).

As espécies do gênero *Aspergillus* são considerados fungos filamentosos mais comuns, apresentando uma ampla distribuição mundial e estando presente no solo, no ar e na água, além de estarem associados com a deterioração de materiais vegetais e alimentos. Muitas espécies de *Aspergillus* são capazes de sintetizar grande variedade de enzimas hidrolíticas, destacando-se o *Aspergillus niger*, um fungo filamentoso com esporos negros, comumente denominado como “mofo negro”. Este fungo é de fácil manipulação, sendo capaz de sintetizar uma ampla faixa de enzimas a partir de uma grande variedade de matérias primas (SANTOS, 2008; SILVA et al., 2015).

Pandey et al (1999), relataram que o *Aspergillus niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glicoamilase, β -glicosidase e protease ácida. Certamente o número de enzimas produzidas é maior, tendo em vista que novos estudos têm sido realizados e já descrevem produtos do *A. niger* como: lípase (AMORIM et al., 2012); amiloglicosidase (SANTANA et al. 2012); lacase, lignina peroxidase e Mn peroxidase (SANTOS et al., 2011a); invertase (NOVAKI et al., 2010), entre outras.

A FES tem recebido maior atenção dos pesquisadores, por apresentar um potencial econômico considerável na produção de enzimas e substâncias de interesse da indústria de alimentos, farmacêutica e agrícola. Além disso, a fermentação em estado sólido apresenta interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, pois tais resíduos podem ser utilizados como substratos na fermentação,

diminuindo assim, os custos de produção relacionados ao meio de cultivo e reduzindo os impactos ambientais proporcionados por estes resíduos (SINGHANIA et al., 2009; RIGO et al., 2010; AMORIM et al., 2012).

A utilização de biomassa regional ou resíduos agroindustriais como substratos em processos fermentativos fornece uma alternativa viável para adição de valor a estes materiais, muitas vezes considerado sem nenhum valor comercial, ou, simplesmente, subutilizados ou não utilizados (SINGHANIA et al., 2009). Entre os resíduos agroindustriais destaca-se o farelo de soja, farelo de trigo e de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, palha de café e casca de maracujá (PELIEZER et al., 2007; SINGHANIA et al., 2009; RIGO et al., 2010). Destacando-se também como biomassa, o farelo da palma forrageira, que por ser rica em nutrientes e com baixo custo de produção representa um importante recurso regional para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido (SANTOS et al., 2012; REIS, 2015).

2.7.1 Palma forrageira

A palma doce ou forrageira (*Nopalea cochenillifera*) é uma cactácea de origem mexicana, largamente cultivada na região semiárida nordestina, com enorme potencial produtivo, sendo bastante utilizada na alimentação humana e animal. Apresenta uma quantidade elevada de nutrientes digestíveis totais, com altos níveis de carboidratos solúveis, vitaminas, nitrogênio e cinzas. Destacando-se os altos teores de cálcio (3%); fósforo (0,15%) e potássio (2,5%), bem como os níveis matéria seca (11%), proteína bruta (4,8%), fibra em detergente neutro (26,8%) e fibra em detergente ácido (18%) (CHACCHIO et al., 2006).

Devido a sua composição, a palma forrageira (Figura 6) pode ser utilizada como matéria prima em bioprocessos, apresentando potencial para a produção de compostos de interesse industrial, como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, medicamentos, entre outros (SOCCOL et al., 2010). O aproveitamento de biomassa vegetal regional é importante para reduzir os custos de produção de biocompostos e por ser rica em macro e micro nutrientes, a palma forrageira pode ser considerada um importante recurso para a produção de enzimas, servindo de suporte na fermentação em estado sólido (FES) (SANTOS et al., 2012).

Alguns estudos já comprovaram a viabilidade da produção de enzimas a partir da FES utilizando a palma forrageira como substrato e o fungo *Aspergillus niger* como micro-organismo. Citando-se como exemplo, a produção de CMCase e FPase (SANTOS et al., 2012), CMCase, FPase, xilanase, lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase

(CARVALHO et al., 2012; REIS, 2015; SANTOS et al., 2011(a); 2016) e amiloglucosidase (SANTANA et al. 2012).

Estes autores comprovam que o coquetel enzimático produzido neste processo fermentativo, apresenta enzimas celulolíticas para realizar a degradação da parede celular vegetal e contribuir com a liberação do óleo essencial, possibilitando assim, aumentar o rendimento no processo de extração destes óleos.



Figura 6. Palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*). (Fonte: COSTA, M. A. R. 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos trabalhos

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), vinculado ao Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada (NUPESQ), e no Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Campus de Itapetinga, Bahia.

3.2 Obtenção do Extrato enzimático

3.2.1 Preparação e caracterização do farelo de palma forrageira

A palma forrageira foi coletada no campo Agrostológico da UESB – Campus de Itapetinga. Posteriormente, o substrato foi higienizado em água corrente, cortado em tiras e seco em estufa de circulação de ar (SOLAB - Mod. SL 102) a 70°C por 36 horas. Em seguida, a palma seca foi triturada em moinho de facas (SOLAB), a uma granulometria aproximada de 2 mm. A matéria seca (MS) do farelo de palma forrageira foi obtida levando-se em consideração a quantidade de umidade medida através de determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200).

A análise físico-química do resíduo foi realizada no Laboratório de Forragicultura da UESB, sendo determinados os valores de proteína bruta (PB), celulose (CL), cinzas (CZ), hemicelulose (HC), lignina (LG), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), seguindo a metodologia descrita por Van Soest et al. (1991) e Silva & Queiroz (2002).

3.2.2 Preparo do inóculo do fungo

O micro-organismo utilizado foi o fungo filamentosso *Aspergillus niger* (ATCC 1004), pertencentes ao Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA – UESB), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

O preparo do inóculo foi realizado através do repique do fungo em meio de cultura de PDA (Potato Dextrose Agar – HIMEDIA) e Ágar-Ágar, sendo incubado por 7 dias a 30°C, em estufa bacteriológica (SOLAB – Mod. SL 101). Os esporos formados foram extraídos em solução de Tween 80 (VETEC), a 0,01%, com auxílio de pérolas de vidro estéril. O número de esporos em suspensão foi quantificado em câmara de Neubauer e observado em microscópio binocular (BIOVAL L1000). A concentração de esporos utilizada em todos os testes foi de 10^7 esporos por grama de meio sólido (REIS, 2015).

3.2.3 Processo de fermentação em estado sólido (FES)

Foram utilizados erlenmeyers de 125 mL como biorreatores para o processo fermentativo, tendo como substrato 10 g do farelo de palma forrageira. Os biorreatores contendo o farelo da palma forrageira foram previamente autoclavados a 121°C e 1,0 atm, por 15 min. Após o resfriamento, inoculou-se a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos por grama de substrato seco. A umidade foi ajustada em 60%, o que equivale à atividade de água de $0,972 \pm 0,002$. O volume de água adicionado foi calculado em relação ao conteúdo de matéria seca da biomassa vegetal e a umidade final determinada por medidor de infravermelho (MARTE ID200). Posteriormente, as fermentações foram conduzidas em estufa bacteriológica a 30°C durante 96 horas. As condições do processo fermentativo com umidade de 60%, temperatura de 30°C e tempo de 96 horas foram descritas por Carvalho et al. (2012) e Santos et al. (2012; 2016).

3.2.4 Obtenção do extrato multienzimático

Após o processo fermentativo do farelo de palma forrageira, realizou-se a obtenção do extrato enzimático. Em cada biorreator foi adicionado 50 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). Em seguida, os erlenmeyers permaneceram sob agitação em *shaker* (SOLAB Mod. SL-180) a 170 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, a biomassa fermentada foi prensada mecanicamente e filtrada em compressa de gaze, para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos (Centribio Mod. CT-600R) para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (SANTOS et al., 2012).

3.3 Determinação da atividade enzimática do extrato

3.3.1 Preparo do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método descrito por Miller (1959). O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ocorrendo também, a oxidação do grupo aldeídico ou cetônico a grupos carboxílicos, favorecendo o desenvolvimento de cor laranja-marrom intensa.

O reagente DNS foi preparado utilizando-se duas soluções. A primeira solução (Solução A) foi preparada com 5 gramas de ácido 3,5-dinitrosalicílico previamente diluídos em 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio (2 M) recém-preparada. A segunda solução (Solução B) foi preparada com 150 gramas de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle), em 250 mL de água deionizada. Após o preparo, as duas soluções foram misturadas sob aquecimento (50°C) e agitação constante, até a dissolução completa do DNS. Após resfriamento, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi aferido com água deionizada. A solução de DNS foi armazenada em frasco de vidro âmbar, etiquetado e datado (VASCONCELOS et al., 2013).

3.3.2 Atividade de CMCase (endoglucanase)

A atividade da enzima CMCase (endoglucanase) foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores produzidos na hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) a 2% p/v, diluída previamente em solução de citrato de sódio a 50 mM com o pH 4,8, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

As reações foram conduzidas em tubos de ensaio contendo 250 µL de extrato enzimático e 250 µL da solução de CMC (2%). Para o controle da reação foram adicionados 250 µL da solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM) e 250 µL de extrato enzimático. Para a preparação do branco da reação foram adicionados 250 µL da solução de CMC e 250 µL da solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria (Cientec CT-266), a 50°C durante 10 minutos. Para interromper a reação foram adicionados 500 µL da solução de DNS, seguida da submersão dos tubos em banho-maria com água fervente (SOLAB Mod. SL 150), por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo e, em seguida, foram adicionados 5,0 mL de água deionizada. Os ensaios foram realizados em triplicata e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS 2000 UV) (GHOSE, 1987).

3.3.3 Atividade de Celulases totais – FPase (endoglucanase e exoglucanase)

A atividade de celulases totais (FPase) abrange uma mistura de endoglucanases e exoglucanases e a quantificação da atividade enzimática é determinada através da dosagem dos açúcares redutores pela degradação de uma tira de papel filtro Whatman nº1 (1,0 cm x 6,0 cm), sendo caracterizada pelo método de DNS (MILLER, 1959), conforme a metodologia descrita por Ghose (1987), com modificações.

Nos tubos reacionais foram adicionados 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático. No controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, e no branco 1,5 mL de solução tampão. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 5 minutos, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima até uma temperatura ideal de hidrólise. Posteriormente, foi adicionada uma tira de papel filtro Whatman nº1 (1,0 cm x 6,0 cm) nos tubos reacionais e no tubo em branco da análise, mantendo-os por 60 minutos em banho-maria a 50°C. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução de DNS, seguida da submersão dos tubos em banho-maria com água fervente, por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo e, em seguida, foram adicionados 20 mL de água deionizada. Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor da absorbância foi medido no comprimento de onda de 540 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS 2000 UV) (GHOSE, 1987).

3.3.4 Atividade de Poligalacturonase

A atividade da enzima poligalacturonase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores produzidos pela ação do extrato enzimático bruto, utilizando ácido poligalacturônico (1%) (diluído em solução tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8) como substrato, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), adaptado por Miller (1959).

As reações foram conduzidas em tubos de ensaio contendo 250 µL de extrato enzimático e 250 µL da solução de ácido poligalacturônico (1%). Para o branco da reação foram adicionados 250 µL de extrato enzimático e 250 µL da solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). Todas as amostras foram incubadas em banho-maria, a 50°C durante 15 minutos. Para interromper a reação foram adicionados 500 µL da solução de DNS, seguida da submersão dos tubos em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo e, em seguida, foram adicionados 5,0 mL de água deionizada. Os

ensaios foram realizados em triplicata e o valor da absorbância foi medido na faixa de 540 nm em espectrofotômetro UV-VIS (BEL PHOTONICS 2000 UV). Metodologia adaptada de Souza et al. (2010).

3.3.5 Cálculo das atividades enzimáticas

A curva de regressão linear padrão para a quantificação das enzimas endoglucanase (CMCase) e poligalacturonase foi constituída a partir das leituras das absorbâncias das soluções de glicose nas concentrações de 0,18; 0,36; 0,54; 0,72; 0,9; 1,08; 1,26; 1,44 e 1,62 mg/mL, pelo método do DNS (MILLER, 1959), enquanto a curva para as celulases totais (FPase) foi construída com soluções de glicose nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg/mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmoL de açúcar redutor por minuto em condições pré-definidas (GHOSE, 1987).

A atividade enzimática para CMCase e poligalacturonase foi calculada seguindo a equação (1):

$$\text{Atividade enzimática(U/mL)} = \frac{X}{T * V_a * V_s} \quad (1)$$

Onde:

X = Concentração de açúcares redutores;

T = Tempo de reação;

V_a = Volume de amostra;

V_s = Volume de substrato.

3.4 Otimização do processo de extração de óleos essenciais das folhas *C. argyrophyllus*

3.4.1 Coleta do material vegetal e identificação botânica

As folhas de *C. argyrophyllus* foram coletadas no período matutino, no mês novembro de 2017, na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá, situada no município de Contendas do Sincorá – BA. O material vegetal foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) da UESB, sendo que parte das folhas frescas foram colocadas em sacos de polietileno (60 g de folhas) e armazenadas em *Freezer* a $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A outra parte do material coletado foi pesada e, em seguida, seco em estufa de circulação de ar (SOLAB - Mod. SL 102), a 40°C por um período de 18 horas.

Exsicatas do material vegetal foram encaminhadas para o Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, onde foram analisadas, identificadas e registradas, sob número HUEFS 4662 (Coordenadas geográficas: S13°55.25' W041°06.88').

3.4.2 Extração do óleo essencial das folhas secas de *C. argyrophyllus*

O óleo essencial das folhas secas de *C. argyrophyllus* foi obtido através do processo de extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Cerca de 60 gramas de folhas secas (trituras manualmente) e 1,0 litro de água deionizada foram colocadas em balão de fundo redondo com boca esmerilhada e capacidade de 2,0 litros. Os processos de extração foram conduzidos em triplicada e realizados em diferentes intervalos de tempo (60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min e 210 min), a temperatura aproximada de 100°C. O hidrolato foi extraído com éter etílico (C₄H₁₀O), a fração etérea posteriormente seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada. O óleo essencial foi pesado em balança analítica e armazenado sob refrigeração a temperatura de -4°C ± 1°C, até a realização das análises posteriores.

O rendimento do óleo essencial foi calculado de acordo com a seguinte equação (2):

$$\text{Teor\%} = \text{massa de óleo (g)} / \text{massa de biomassa foliar (g)} \times 100 \quad (2)$$

3.4.3 Aplicação do extrato multienzimático nas folhas frescas de *C. argyrophyllus*

As folhas frescas de *Croton argyrophyllus* (inicialmente armazenadas em freezer), foram submetidas a um pré-tratamento antes da extração do óleo essencial por hidrodestilação. Este pré-tratamento consistiu na aplicação do extrato multienzimático (obtido conforme descrito no item 3.2), nas folhas frescas de *C. argyrophyllus*. Este pré-tratamento enzimático foi realizado nas seguintes condições: 60 gramas do material vegetal fresco foram cortadas com auxílio de uma tesoura e colocados em balão de fundo redondo de junta esmerilhada com capacidade de 2,0 litros, sendo adicionados diferentes volumes do extrato enzimático (60 mL, 120 mL e 180 mL), completando-se o volume com água deionizada até atingir 500 mL. Posteriormente, os balões foram aquecidos em banho termostático, onde foram estudadas cinco faixas de temperaturas (25°C, 32,5°C, 40°C, 47,5°C e 55°C). O tempo para a realização deste pré-tratamento foi inicialmente fixado em 3h. Foram desenvolvidos tratamentos controle em todas as etapas do processo, que consistiram na submersão das folhas em 500 mL de água deionizada (sem a utilização de enzimas) nas faixas de temperaturas e tempo avaliado.

Foi utilizado planejamento estatístico Doehlert para otimizar as variáveis experimentais aplicadas no pré-tratamento enzimático das folhas frescas de *C. argyrophyllus*: temperatura e volume de extrato enzimático (Tabela 1). Segundo a matriz experimental Doehlert, a combinação das variáveis estudadas originou sete condições experimentais diferentes, sendo que o ponto central (40°C e 120 mL de enzima) foi realizado em triplicata, para possibilitar uma estimativa do erro, totalizando assim 09 ensaios. A análise dos dados foi realizada no software *Statistica 10*.

Tabela 1. Planejamento estatístico Doehlert utilizado para a extração do óleo essencial de *C. argyrophyllus*, com os valores reais e codificados (entre parênteses)

Ensaio	Temperatura (°C)	Volume (mL)
1	40 (0)	120 (0)
2	40 (0)	120 (0)
3	40 (0)	120 (0)
4	55 (1)	120 (0)
5	47,5 (0,5)	180 (0,866)
6	25 (-1)	120 (0)
7	32,5 (-0,5)	60 (-0,866)
8	47,5 (0,5)	60 (-0,866)
9	32,5 (-0,5)	180 (0,866)

Fonte: BEZERRA et al. (2008).

3.4.4 Extração do óleo essencial após o pré-tratamento enzimático

Após a realização do pré-tratamento estabelecido em cada condição experimental foram realizadas as extrações do óleo essencial pelo processo de hidrodestilação. Inicialmente, foram adicionados mais 500 mL de água deionizada nos balões utilizados no pré-tratamento enzimático e nas suas respectivas amostras controles, completando assim o volume para 1,0 litro. Posteriormente os balões foram acoplados em aparelho de Clevenger, sendo que a extração e o cálculo do rendimento do óleo essencial foram realizados conforme descrito no item 3.4.2. O tempo do processo de extração dos óleos essenciais foi fixado em 2 horas.

3.4.5 Avaliação do tempo de pré-tratamento enzimático

Após a otimização das variáveis temperatura e volume de extrato enzimático realizado no pré-tratamento descrito no item 3.4.3, realizou-se a avaliação do tempo de contato deste pré-tratamento, objetivando avaliar o melhor tempo de reação das enzimas, visando aumentar

o rendimento da extração do óleo essencial. Inicialmente, o material vegetal (folhas frescas) foi processado conforme descrito no item 3.4.3. Em seguida, foram avaliados sete faixas de tempo de pré-tratamento enzimático (60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 min), nas condições previamente otimizadas de temperatura de contato e volume de extrato enzimático. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo também desenvolvidos testes controles nas mesmas condições de tempo avaliados, sem a presença de enzimas, conforme descrito no item 3.4.3. Ao término do pré-tratamento estabelecido em cada condição, a extração dos óleos essenciais foi conduzida pelo processo de hidrodestilação, conforme descrito no item 3.4.4.

Com a otimização das variáveis temperatura, volume de extrato enzimático e tempo de contato, realizou-se a validação do processo a partir da aplicação das condições ótimas obtidas no pré-tratamento das folhas frescas de *C. argyrophyllus* e, em seguida, realizando a extração do óleo conforme descrito no item 3.4.4. As condições ótimas encontradas no pré-tratamento enzimático, também foram aplicadas nas folhas que passaram pelo processo de secagem em estufa.

3.4.6 Análises cromatográficas

A composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, com e sem a presença dos extratos enzimáticos, bem como do óleo essencial obtido das folhas secas foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), em parceria com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com o objetivo de identificar e comparar os constituintes químicos majoritários das amostras. O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu (GC-17A/QP2010 Plus), equipado com coluna capilar *Factor Four*-VF-5ms (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme), utilizando hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL.min⁻¹ e pressão de 12 psi. A programação da temperatura do forno foi de 60°C a 260°C (3°C/min), depois 10°C/min até 290°C, com temperatura do injetor a 220°C, interface a 310°C e fonte de íons a 250°C. Injetou-se 1 µL de solução da amostra em diclorometano a uma razão de fluxo (*split*) 1:30. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de varredura de 40-500 u.m.a com energia de impacto de elétrons de 70 eV. As análises quantitativas foram feitas utilizando um cromatógrafo de fase gasosa (HP 5890 Series II) equipado com um detector de ionização de chamas (DIC), nas mesmas condições experimentais e temperatura do detector de 250°C.

Para realizar a identificação das substâncias do óleo essencial foram calculados os índices de retenção (IR) para cada constituinte através da injeção de uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C₈-C₂₀) nas mesmas condições da amostra. Posteriormente, os dados foram comparados com o valor tabelado por Adams (2007), bem como através da comparação com o banco de dados da biblioteca (Nist08).

3.4.7 Avaliação micromorfológica

A análise micromorfológica da superfície foliar de *C. argyrophyllus* foi realizada utilizando-se microscópio eletrônico de varredura (Phenom Pure - Mod. 800-07332). As folhas foram levemente desidratadas para evitar que a umidade danificasse o equipamento. Esta desidratação foi realizada colocando as folhas em bancada e expondo a temperatura ambiente por até 3 dias, sendo, em seguida, armazenadas sob refrigeração a temperatura de $-4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises. Para a obtenção das imagens, pequenos fragmentos da folha foram fixados em fita de carbono dupla-face, e colocadas em um suporte “Stub”. Posteriormente, a face abaxial e adaxial da folha de *C. argyrophyllus* foram fotografadas com aumento de 500 a 2500X. As imagens foram obtidas das folhas, sem nenhum tipo de tratamento ou passadas pelo processo de extração, e nas folhas que passaram pelo tratamento enzimático e a sua respectiva amostra controle (submersa apenas em água deionizada).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do farelo de palma forrageira

Os resultados obtidos na caracterização físico-química do farelo da palma forrageira estão descritos na Tabela 2, podendo ser observados os valores para proteína bruta (PB), material mineral (MM), cinzas (CZ), lignina (LG), celulose (CL), hemicelulose (HC), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e matéria seca (MS). De acordo com os dados, pode-se considerar que o farelo de palma forrageira apresenta nutrientes (proteína bruta) que favorecem a produção de enzimas através do processo fermentativo em estado sólido.

Tabela 2. Caracterização físico-química do farelo de palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*)

Componentes	Concentração (% ± DP)
Proteína Bruta	12,67 ± 0,54
Fibra em Detergente Neutro	25,13 ± 1,84
Fibra em Detergente Ácido	14,94 ± 0,44
Cinzas	0,7 ± 0,21
Lignina	8,49 ± 0,50
Celulose	6,45 ± 0,06
Hemicelulose	10,19 ± 1,40
Matéria Seca	94,2 ± 0,10

DP (desvio padrão).

A porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose não se mostraram elevadas e provavelmente, o micro-organismo *Aspergillus niger*, encontrou baixa resistência para alcançar o substrato e iniciar o processo fermentativo. A composição do substrato influencia significativamente na atividade enzimática, e a celulose, a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo micro-organismo agente da fermentação (REIS, 2015).

Chiacchio (2006), obteve na caracterização físico-química da palma forrageira valores de proteína bruta ($4,81 \pm 1,16\%$) inferior ao obtido no presente trabalho, enquanto que para FDN ($26,79 \pm 5,07\%$) e FDA ($18,85 \pm 3,17\%$), os resultados encontrados foram semelhantes aos dados apresentados neste estudo, conforme observado na Tabela 2. Este autor também relata que a palma forrageira apresenta carboidratos solúveis, vitaminas e ferro, destacando-se ainda os teores de cálcio (3%), potássio (2,5%) e fósforo (0,15%), que são necessários ao crescimento do micro-organismo, atribuindo ao farelo da palma forrageira, potencial para ser utilizado como substrato na fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas.

4.2 Processo fermentativo

O fungo *Aspergillus niger* apresentou um bom crescimento no processo fermentativo com o farelo da palma forrageira, nas condições de incubação estabelecidas (30°C; 96 horas e 60% de umidade), sendo possível produzir diferentes enzimas. Na Tabela 3 estão descritos os valores experimentais obtidos para as atividades das enzimas CMCase (endoglucanase), FPase (endoglucanase + exoglucanase) e poligalacturonase.

Tabela 3. Atividade enzimática obtida no processo fermentativo da palma forrageira com o fungo *Aspergillus niger*

Enzima	Atividade enzimática (U/mL)	Intervalo de Confiança (U/mL)
CMCase	10,75	10,44 – 11,06
FPase	19,40	18,44 – 20,35
Poligalacturonase	28,74	28,26 – 29,23

Intervalo de confiança ao nível de 95% de significância

Os resultados indicam que a produção enzimática pode ter sido favorecida pela composição da palma forrageira, que é rica em nutrientes, fornecendo condições adequadas para o crescimento do fungo *Aspergillus niger*. O valor obtido no presente trabalho para a enzima CMCase (carboximetilcelulase) foi de 10,75 U/mL, sendo superior ao descrito por Santos et al. (2012), que obtiveram uma atividade máxima de 7,47 U/mL para CMCase em 72 horas de incubação com 0,949 de atividade de água, na otimização e produção por *Aspergillus niger*, usando farelo de palma forrageira como substrato. Carvalho et al. (2012), também produziram enzimas celulolíticas utilizando o mesmo processo fermentativo com a palma forrageira e o mesmo fungo filamentosos, relatando valores máximos de CMCase de 4,66 U/mL, em 92 horas de fermentação.

A produção de enzimas celulolíticas é relatada em muitos trabalhos na literatura, onde são utilizados diferentes tipos de substratos, incluindo resíduos agroindustriais. Por exemplo, Jang e Chen (2003), reportaram valores de 40,3 U/mL para endoglucanase em 1% de CMC e três dias de fermentação, utilizando meio de cultura rico em nutrientes, com a estirpe mutante *Streptomyces*, a T3-1. Santos et al. (2011b), utilizou o resíduo proveniente do beneficiamento da seriguela como substrato para a espécie fúngica *Rhizopus* sp., e relataram uma maior atividade para a CMCase de 11,06 U/g, em 72 horas de fermentação, com 0,971 de atividade de água. Esta diversificação no meio de cultura e as diferenças das condições operacionais utilizadas limitam a comparação dos resultados.

Para as celulasas totais (FPase), a atividade enzimática obtida foi de 19,40 U/mL. Valor próximo ao encontrado por Carvalho et al. (2012), de 19,71 U/mL, em 96 horas de fermentação com 85% de teor de água. Reis (2015), utilizou as mesmas condições de incubação deste trabalho (30°C; 96 horas e 60% de umidade), encontrando uma atividade máxima de FPase de 17,32 U/mL. No entanto, os dados aqui apresentados são superiores aos valores máximos de FPase obtidos por Santos et al. (2012), que encontraram valores otimizados de 9,42 U/mL, com o tempo de fermentação de 64 horas e 0,986 de atividade de água. Todos os autores acima utilizaram a palma forrageira como meio de cultivo e o fungo *Aspergillus niger*.

Durante a hidrólise da celulose, as endoglucanases, decompõem os polissacarídeos, produzindo terminais para as exoglucanases atuarem e, portanto, as celulasas totais são capazes de atuar tanto nas regiões cristalinas como nas regiões amorfas da celulose (OGEDA & PETRI, 2010). Deste modo, a atividade enzimática de celulasas totais (FPase) representa um fator importante para a escolha das melhores condições de produção do extrato enzimático bruto. Vale salientar, também, que a maioria dos micro-organismos celulolíticos apresentam atividade de endoglucanase, mas nem sempre apresentam de exo e por conseguinte, a atividade de FPase é um diferencial (FRANCO, 2009).

Em relação à enzima poligalacturonase (PGs), a atividade enzimática obtida foi de 28,74 U/mL. Os fungos são os principais micro-organismos responsáveis pela produção de pectinases, sendo que o fungo filamentosso *Aspergillus niger* é um dos mais utilizados na indústria de alimentos para produção de enzimas pectinolíticas, destacando-se a poligalacturonase. As poligalacturonases representam um das classes de enzimas com função hidrolítica, podendo apresentar ação endoglucanase (hidrólise randômica) ou exoglucanase (hidrólise sequencial) do ácido pécico (JAYANI et al., 2005; UENOJO & PASTORE, 2007).

Bueno et al. (2005), investigaram a síntese de poligalacturonases a partir de três fungos da linhagem *Aspergillus* sp., testando diferentes proporções de meio de cultura (mistura de galactose com pectina cítrica), e observaram uma máxima atividade de 14,9 U/mL, em 48 horas de fermentação, concluindo que a produção de poligalacturonases está diretamente ligada à natureza e concentração da fonte de carbono do meio de cultura e da linhagem de fungo. Menezes et al. (2006), estudando a produção de poligalacturonases por meio da fermentação semi-sólida do resíduo de maracujá misturado com farelo de trigo por *Aspergillus niger* mutante, observaram uma atividade igual a 12,01 U/mL, com adição de fonte de nitrogênio, em 64 horas de fermentação. Resultados superiores foram encontrados neste trabalho, com 96 horas de fermentação, porém, sem a adição de fontes de nitrogênio.

A indústria de alimentos vem utilizando as enzimas pectinolíticas na extração de óleos vegetais, em alguns casos, em associação com outras enzimas como as celulases e hemicelulases. A aplicação destas enzimas tem por finalidade realizar a degradação da parede celular vegetal, melhorar o processo de extração e a qualidade do óleo vegetal (UENOJO & PASTORE, 2007).

Além das enzimas que foram detectadas neste trabalho, no processo fermentativo da palma forrageira por *Aspergillus niger* também é possível produzir: xilanases, lacases, lignina peroxidase e manganês (Mn) peroxidase, que são enzimas importantes para degradar a parede celular vegetal. Em estudo realizado por Reis (2015) foi observado à produção de xilanases com atividade de 35,23 U/mL em 96 horas de fermentação e 60% de teor de água, condições fermentativas semelhantes ao utilizado neste trabalho. Enquanto Carvalho et al. (2012) relataram uma produção de 19,71 U/mL com o mesmo tempo de incubação e utilizando 85% de teor de água. As xilanases representam as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, que é um dos principais polissacarídeos constituinte das hemiceluloses (GÍRIO et al., 2010).

Esta diferença nos valores da atividade enzimática de xilanases observada pelos dois autores pode ser explicada pela variação nos valores de umidade utilizados durante a incubação. O controle da umidade é um fator crítico e essencial em processos de fermentação em estado sólido, sendo que a extrapolação do nível de água ideal pode ocasionar a inibição do fungo e influenciar na produção da enzima (SANTANA et al. 2012).

Reis (2015), também relataram a atividade máxima para lacase, que foi quantificada em 1,17 U/mL, lignina peroxidase de 2,34 U/mL e Mn Peroxidase de 1,13 U/mL, com 96 horas de período fermentativo. Tais enzimas são importantes no processo de degradação de polissacarídeos estruturais, e a presença de enzimas ligninolíticas e xilanolíticas no complexo

enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento das fibras (GÍRIO et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

Os resultados experimentais confirmam que a palma forrageira proporcionou o desenvolvimento do fungo filamentosso *Aspergillus niger* no processo de fermentação em estado sólido, possibilitando a produção de extratos multienzimáticos com índices consideráveis de atividade enzimática. O coquetel enzimático produzido apresenta enzimas importantes para realizar a degradação da parede celular vegetal e facilitar a remoção do óleo essencial no processo de extração. Vale salientar que os fungos foram capazes de sintetizar as enzimas tendo como indutor ou substrato apenas a palma forrageira e a água, sem a necessidade de adição de qualquer outro nutriente.

4.3 Obtenção do óleo essencial de *C. argyrophyllus*

4.3.1 Extração do óleo essencial

Os valores médios de massa (g) de óleo essencial e o rendimento obtido a partir da extração por hidrodestilação de 60 g de folhas secas de *Croton argyrophyllus*, em diferentes intervalos de tempo e sem a realização do pré-tratamento enzimático estão apresentados na Tabela 4. O rendimento máximo de óleo essencial obtido foi de 0,37% com 3 horas e meia de extração, sendo que em todos os ensaios o rendimento é crescente ao longo do tempo.

Tabela 4. Rendimento do óleo essencial obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus* em diferentes tempos de extração e sem a realização de tratamento enzimático

Tempo de extração (h)	Massa (g)	Intervalo de Confiança (g)	Rendimento (%)	Intervalo de Confiança (%)
1	0,0726	0,0721 – 0,0732	0,12	0,11 – 0,12
1,5	0,1093	0,1061 – 0,1125	0,18	0,18 – 0,19
2	0,1443	0,1395 – 0,1492	0,24	0,23 – 0,25
2,5	0,1758	0,1613 – 0,1903	0,29	0,27 – 0,31
3	0,2006	0,1950 – 0,2050	0,33	0,32 – 0,34
3,5	0,2194	0,2091 – 0,2299	0,37	0,35 – 0,38

Intervalo de confiança ao nível de 95% de significância

Em estudos realizados com a espécie *C. argyrophyllus*, Cruz et al. (2017) relataram um teor de óleo essencial equivalente a 0,48% a partir de 100 gramas de folhas secas, com 3 h de extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, valor superior ao encontrado neste trabalho. No entanto, o rendimento do óleo essencial encontrado por Araújo et al. (2014), foi de 0,33% com 3 horas de extração para as folhas frescas de *C. argyrophyllus*, valor semelhante ao determinado neste estudo. Já Ramos et al. (2013), relataram o rendimento de óleo essencial das folhas frescas de *C. argyrophyllus* de 0,76% com 2 horas de extração.

A variação no rendimento do óleo essencial pode ser explicada pela influência de fatores abióticos, como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como, pela idade e estágio de desenvolvimento da espécie e pelas técnicas de colheita e pós-colheita empregadas. Tais fatores também podem influenciar significativamente na composição química do óleo essencial, ocasionando alterações ou redução nos componentes majoritários (MORAIS, 2009).

As espécies do gênero *Croton* produzem óleos essenciais com rendimentos variados, mas não muito superior a 3%, demonstrando assim a necessidade de buscar técnicas mais eficientes para proporcionar o aumento do rendimento de extração destes óleos. Em trabalho realizado por Chaves et al. (2006), o óleo essencial das folhas secas de *C. cajucara* de dois morfotipos, o branco e o vermelho, foram obtidos com rendimentos de 0,97% e 0,65%, respectivamente, após 4 horas de extração. Carvalho et al. (2016), estudando as folhas secas de *C. tetradenius*, obtiveram o óleo essencial com rendimento de 2,73%, após 3 horas de extração. Costa et al. (2008), obtiveram o óleo essencial das folhas secas de *C. zehntneri* com rendimento de 1,56%, após 2 horas de extração.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados em massa e porcentagem do óleo essencial obtido das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, com e sem o tratamento enzimático, bem como o respectivo aumento de massa de óleo extraído em todas as condições avaliadas pelo planejamento experimental desenvolvido com a matriz Doehlert. A realização do pré-tratamento enzimático nas folhas frescas de *C. argyrophyllus* proporcionou aumento da massa de óleo essencial em todas as condições testadas, ou seja, qualquer condição adotada na matriz Doehlert irá proporcionar maior rendimento no processo de extração do óleo essencial. Destacando-se os ensaios 1 e 3 que apresentaram o aumento da massa de óleo extraído de 9,48% e 9,81%, respectivamente. Estes resultados confirmam a eficiência do uso dos extratos multienzimáticos obtidos do farelo de palma forrageira na extração de óleos essenciais.

Tabela 5. Matriz Doehlert com os valores reais para as variáveis independentes aplicadas no pré-tratamento das folhas frescas de *C. argyrophyllus* (temperatura e volume de extrato enzimático), e a variável resposta do aumento do teor de óleo essencial, após 2h de extração

Ensaio	T (°C)	V (mL)	MCE (g)	TCE (%)	MSE (g)	TSE (%)	AOE (%)
1	40	120	0,0808	0,135	0,0738	0,123	9,49
2	40	120	0,0779	0,130	0,0719	0,120	8,34
3	40	120	0,0795	0,133	0,0724	0,121	9,81
4	55	120	0,0753	0,126	0,0732	0,122	2,87
5	47,5	180	0,0746	0,124	0,0698	0,116	6,87
6	25	120	0,0708	0,118	0,0702	0,117	0,85
7	32,5	60	0,0788	0,131	0,0761	0,127	3,55
8	47,5	60	0,0756	0,126	0,0725	0,121	4,28
9	32,5	180	0,0833	0,139	0,0796	0,133	4,65

T= temperatura / V= volume / MCE= Massa de óleo extraído com enzimas / MSE= Massa de óleo extraído sem enzimas / TCE= Teor de óleo obtido com auxílio de enzimas / TSE= teor de óleo obtido sem enzimas / AOE = Aumento da massa do óleo extraído (%). Tempo de contato para o pré-tratamento fixado em 3 horas.

As folhas da espécie em estudo apresentam o teor de umidade de 61,63%, indicando que a maior parte do peso da amostra (folhas frescas) consiste em água. O que pode justificar a diferença no rendimento do óleo essencial em massa (g) obtido das folhas que passaram pelo processo de secagem (Tabela 4), com as folhas frescas que foram submetidas ao pré-tratamento enzimático (Tabela 5), após 2 horas de extração.

Na Tabela 6 são apresentados os dados obtidos da análise de variância (ANOVA), demonstrando que a falta de ajuste não foi significativo, com os dados se adequando ao modelo proposto.

Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos e interações das variáveis estudadas no aumento de teor de óleo essencial

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
(1) Temperatura (L)	4,06574	1	4,06574	6,8911	0,119627
Temperatura (Q)*	64,83406	1	64,83406	109,8887	0,008978
(2) Vol. Enzima (L)	3,42454	1	3,42454	5,8043	0,137601
Vol. Enzima (Q)*	13,73498	1	13,73498	23,2797	0,040372
1L por 2L	0,56303	1	0,56303	0,9543	0,431654
Falta de Ajuste	0,14799	1	0,14799	0,2508	0,666176
Erro Puro	1,18000	2	0,59000		
Total SS	78,79021	8			
R ²	0,98315				
R ² ajustado	0,95505				

*Estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância; GL= Graus de Liberdade; SQ= Soma dos Quadrados; QM= Quadrado Médio; F= Teste de Fisher; p= Probabilidade; R²= Coeficiente de Determinação.

O modelo ajustado para explicar o aumento da massa do óleo essencial é estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,98315$ e $R^2_{aj.} = 0,95505$ explica 95,5% da variação das respostas encontradas. Os termos estatisticamente considerados significativos para explicar o aumento de massa de óleo essencial foram os termos quadráticos: temperatura e volume de enzima. Conforme observado na Tabela 6 e no Gráfico de Pareto da Figura 7.

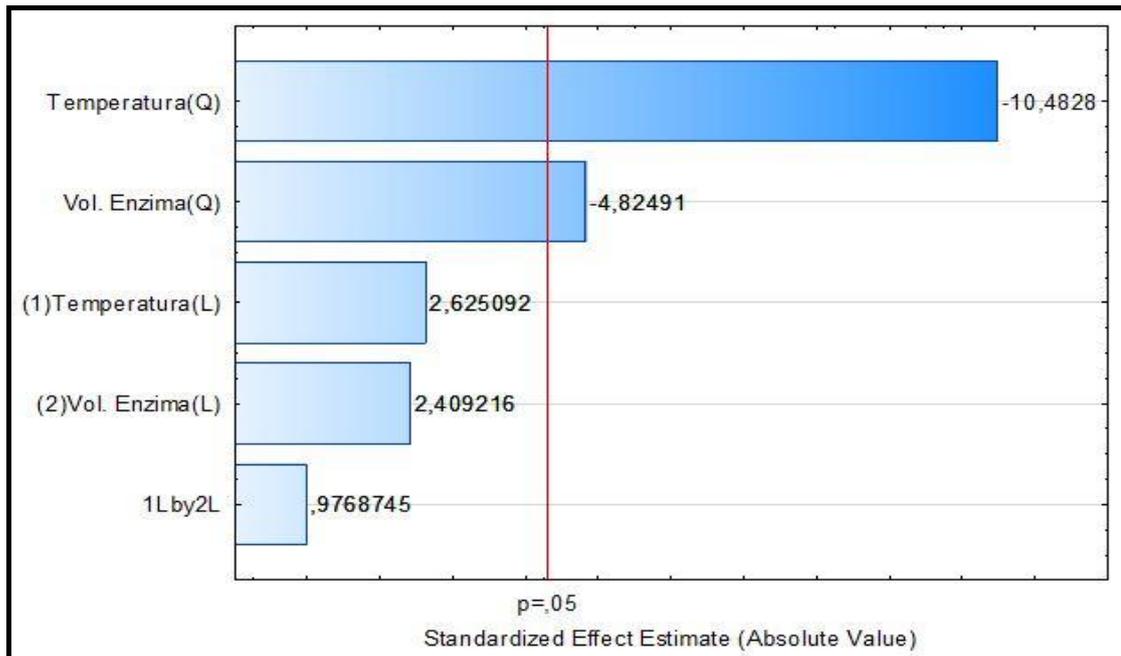


Figura 7. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos da temperatura e volume de enzima no aumento de massa do óleo essencial extraído das folhas frescas de *C. argyrophyllus*.

O modelo pode ser descrito pela equação (3), que corresponde à relação entre as duas variáveis e a resposta, em termos de valores não codificados:

$$AOE\% = 9,2122 + 0,58x - 1,8376x^2 + 0,92527y - 2,53737y^2 + 0,37517x.y \quad (3)$$

Onde:

AOE% = Aumento de massa de óleo;

x= Temperatura;

y = Volume de extrato enzimático.

A superfície de resposta mostrada na Figura 8 apresenta os resultados para o aumento de massa de óleo extraído (AOE%) das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, em função da variação da temperatura e do volume de extrato enzimático. A região central da curva mostra os maiores valores do aumento de massa de óleo extraído (>8,0%), evidenciando que as condições das variáveis estudadas para proporcionar este aumento na extração de óleo essencial foram bem otimizadas.

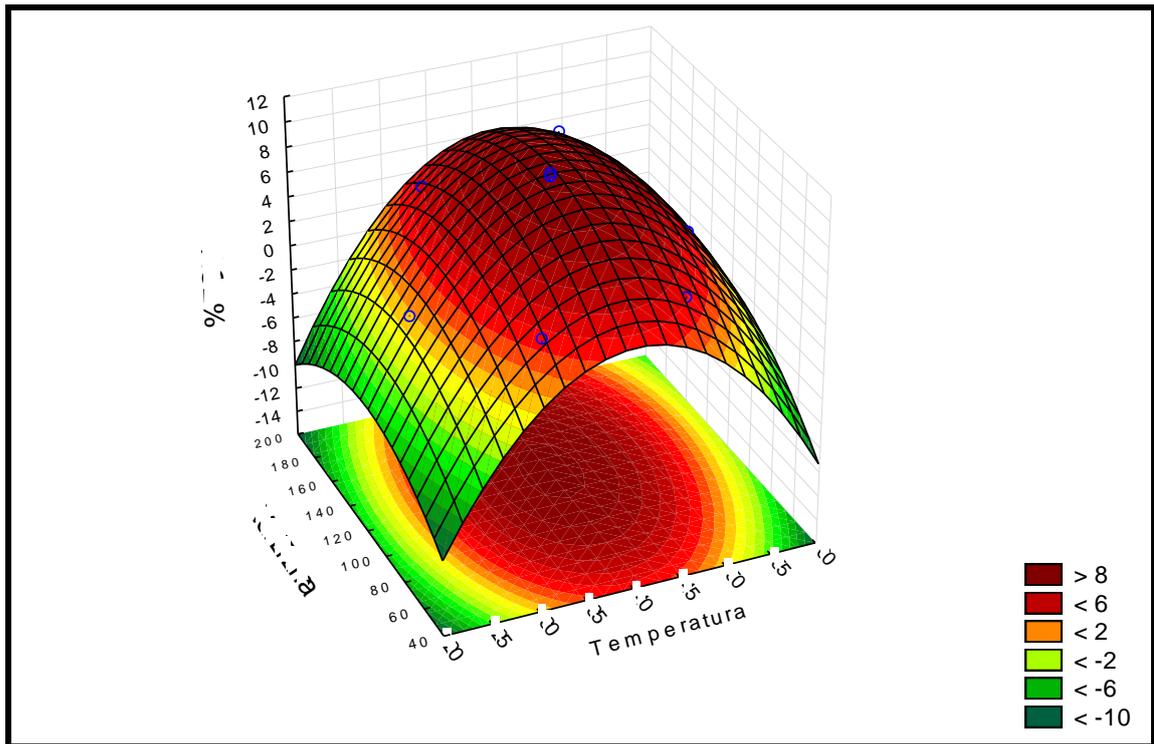


Figura 8. Gráfico de superfície de resposta para o aumento de massa de óleo em função do volume de enzima e da temperatura de contato.

A Tabela 7 descreve os valores mínimos e máximos das variáveis independentes utilizadas neste planejamento experimental, bem como dos resultados obtidos, através do software *Statistica 10*, para as condições ótimas de aumento no rendimento da extração do óleo essencial da espécie em estudo. Verifica-se que os valores ótimos encontrados para a temperatura foi de 41,34°C, o volume de extrato enzimático de 130,73 mL e o valor máximo previsto para o aumento no rendimento de extração do óleo essencial foi de 9,35%. Os valores ótimos encontrados para as variáveis temperatura e volume de extrato enzimático ficaram dentro do domínio experimental, corroborando com o que foi observado no gráfico de superfície de resposta.

Tabela 7. Valores mínimos e máximos utilizados no planejamento experimental e valores ótimos obtidos através da análise estatística

Variáveis	Valores Mínimos	Valores Ótimos	Valores Máximos
Temperatura (°C)	25,00	41,34	55,00
Volume de Enzima (mL)	60,00	130,73	180,00
Rendimento máximo (%)	-	9,35	-

O máximo aumento de massa de óleo essencial alcançado a partir da aplicação destes valores otimizados na etapa de pré-tratamento com o tempo de contato de 3 horas (180 min), foi de 9,66% (Tabela 8), próximo do que foi previsto pela modelo estatístico de 9,35%, validando assim o modelo.

Após a otimização das variáveis temperatura e volume de extrato enzimático, foi feito a avaliação do tempo de contato no pré-tratamento, com a finalidade de determinar o melhor tempo de reação das enzimas, para que ocorresse o aumento no rendimento de extração do óleo essencial. Na Tabela 8 e na Figura 9 é possível observar os resultados obtidos para o aumento de massa de óleo obtida com a variação do tempo de pré-tratamento enzimático, nas condições ótimas definidas de temperatura (41,3°C) e volume de extrato enzimático (130,73 mL).

Tabela 8. Aumento no teor de óleo essencial das folhas frescas de *C. argyrophyllus* a partir da variação do tempo de pré-tratamento enzimático com as condições ótimas pré-definidas (temperatura e volume de enzima)

Ensaio	Tempo (min)	MCE (g)	TCE (%)	MSE (g)	TSE (%)	AOE (%)	Intervalo de Confiança (%)*
1	60	0,0681	0,113	0,0648	0,108	5,08	4,37 – 5,79
2	80	0,0697	0,116	0,0657	0,109	6,19	5,79 – 6,60
3	100	0,0685	0,114	0,0637	0,106	7,43	7,14 – 7,71
4	120	0,0714	0,119	0,0660	0,110	8,12	7,73 – 8,51
5	140	0,0691	0,115	0,0634	0,106	9,06	8,63 – 9,49
6	160	0,0743	0,124	0,0679	0,113	9,38	8,93 – 9,84
7	180	0,0704	0,117	0,0642	0,107	9,66	9,22 – 10,09

*Intervalo de confiança ao nível de 95% de significância; MCE= Massa de óleo extraído com enzimas / MSE= Massa de óleo extraído sem enzimas / TCE= Teor de óleo obtido com auxílio de enzimas / TSE= teor de óleo obtido sem enzimas / AOE = Aumento da massa do óleo extraído (%).

Analisando os resultados, observa-se que a partir do tempo de 140 minutos, o aumento de massa de óleo essencial obtida na extração começa a estabilizar, não sendo observadas diferenças significativas após este período, visto que os intervalos de confiança, neste caso, se sobrepõem. Desta forma, pode-se concluir que com 140 minutos de pré-tratamento enzimático

foi possível atingir o maior aumento na extração do óleo (9,06%), conforme apresentado na Tabela 8 e na Figura 9.

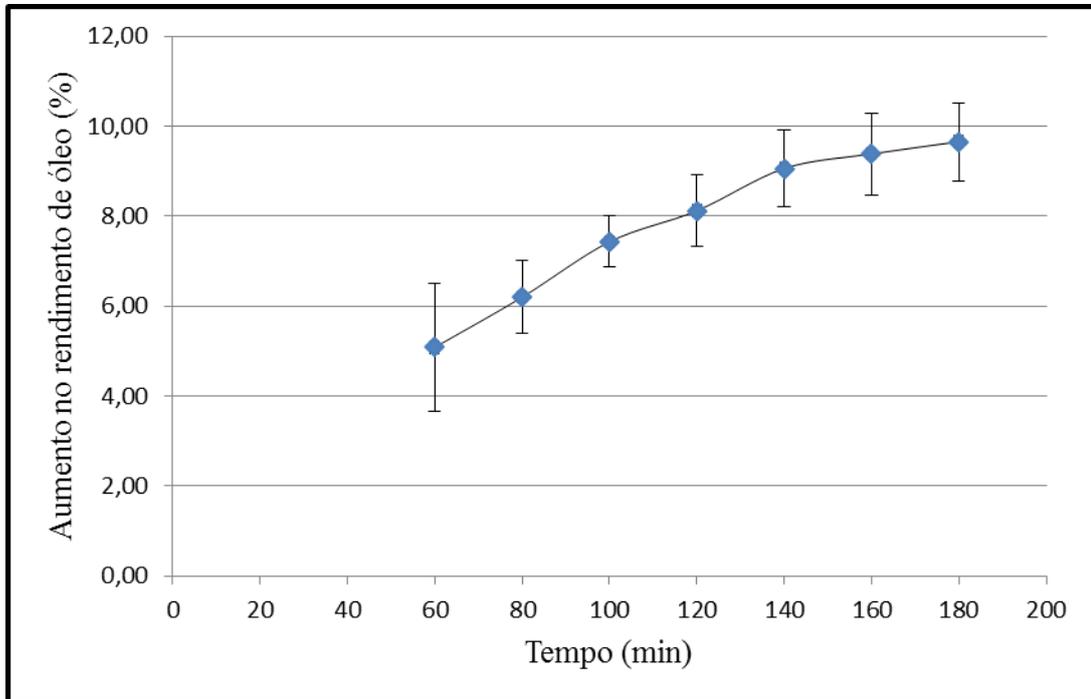


Figura 9. Aumento no rendimento de extração do óleo essencial de *C. argyrophyllus* em função do tempo de contato, com as condições ótimas de temperatura e volume de enzima.

A partir das variáveis otimizadas, temperatura (41,3°C), volume de extrato enzimático (130,73 mL) e tempo de contato (140 min), obteve-se um aumento no rendimento da extração do óleo das folhas frescas da espécie em estudo de 9,06% (Tabela 8), validando o modelo estatístico que previa um aumento máximo no rendimento de óleo de 9,35% (Tabela 7). As condições otimizadas do pré-tratamento enzimático também foram aplicadas nas folhas que passaram pelo processo de secagem em estufa, obtendo-se um aumento no rendimento de extração do óleo essencial de 6,77% (intervalo de confiança: 5,75 – 7,79%), resultado abaixo do que foi obtido com as folhas frescas.

O aumento no rendimento da extração do óleo essencial está diretamente relacionado às interações das variáveis durante a etapa de pré-tratamento enzimático, como temperatura, volume de extrato enzimático e tempo de contato, pois as enzimas precisam trabalhar nas condições ótimas de reação para romper a parede celular vegetal e proporcionar uma maior extração de óleo essencial. Desta forma, estudos sobre a otimização destas variáveis tornam-se essenciais, principalmente para espécies vegetais que já possuem propriedades

farmacológicas comprovadas, como o *C. argyrophyllus*, tendo em vista que o rendimento do óleo essencial de uma espécie vegetal é um fator importante para a sua aplicação em escala industrial.

Dentre as metodologias utilizadas na otimização de processos, o planejamento Doehlert vem se mostrando uma alternativa prática e econômica em relação a outras metodologias de superfície de resposta mais usados, como o composto central e Box-Behnken, principalmente por exigir poucos pontos experimentais para sua aplicação, apresentando uma alta eficiência e facilidade na otimização de variáveis (BEZERRA et al., 2008).

Utilizando uma matriz Doehlert com três variáveis, Reis (2015), aplicou o extrato enzimático bruto obtido da fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger*, como pré-tratamento nas folhas de *Mentha arvensis*, obtendo um aumento máximo da massa do óleo extraído de 194%. A otimização do pré-tratamento enzimático foi definida nas condições de 36°C, com o tempo de contato de 126 minutos e a concentração enzimática de 55 mL, em 1 hora de extração por hidrodestilação. Tempo de contato e temperatura próximos aos valores otimizados neste estudo com as folhas frescas de *C. argyrophyllus*, mais com o volume de extrato enzimático e tempo de extração superior ao determinado por Reis (2015).

Estudando o efeito do pré-tratamento enzimático na extração do óleo essencial das folhas frescas de *Croton grewoides*, Tavares (2012), obteve um aumento no rendimento de extração, variando de 6,24% a 14,14%, em pré-tratamento enzimático realizado a 50°C, durante 1 hora e utilizando de 150 a 550 mL de extrato enzimático bruto, obtido da fermentação em estado sólido do resíduo da acerola por *Aspergillus niger*. O mesmo autor também estudou a utilização do extrato enzimático bruto obtido do resíduo do caju por *Aspergillus niger*, sendo observado o aumento na extração de óleo essencial de 2,88% a 10,1%, com as mesmas condições de pré-tratamento, em 1 hora de extração.

A utilização de extratos enzimáticos obtidos a partir do aproveitamento da biomassa agroindustrial, bem como da biomassa de espécies regionais, como por exemplo, o farelo de palma forrageira, tem se mostrado uma alternativa de alta eficiência no processo de extração de óleos essenciais. Isso porque as enzimas são biomoléculas capazes de catalisar reações com especificidade, promovendo a degradação das paredes celulares vegetais, facilitando a extração dos óleos essenciais (PINELO et al., 2006). Entretanto, ainda existem poucos estudos na literatura sobre a aplicação destes extratos enzimáticos na extração de óleos essenciais.

Hosni et al. (2013) avaliaram a extração de óleos essenciais das folhas de tomilho e alecrim a partir do pré-tratamento enzimático com celulasas e hemicelulasas, associado ao

processo de hidrodestilação por duas horas. A aplicação destas enzimas comerciais proporcionou um aumento máximo de 109% no teor de óleo obtido das folhas de tomilho, enquanto que nas folhas de alecrim, o tratamento enzimático promoveu a elevação máxima do rendimento em 50%. Baby & Ranganathan (2016), também utilizaram enzimas comerciais para avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático na extração de óleos essenciais obtidos das sementes de cardamomo. O processo de extração foi realizado por destilação por arraste de vapor durante quatro horas, sendo observado o aumento máximo no teor de óleo de 16%, com um pré-tratamento enzimático de 90 minutos.

As enzimas comerciais são mais pesquisadas e utilizadas na extração de óleos essenciais, sendo aplicadas principalmente em oleaginosas de interesse comercial, pela indústria de alimentos. No entanto, a utilização em maior escala de enzimas comerciais, principalmente enzimas purificadas, que apresentam um alto custo, limita o uso desta tecnologia, sendo que o custo de uma enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo e a sua utilização (ALTUN & CETINUS, 2007).

4.3.2 Análise cromatográfica do óleo essencial

A composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. argyrophyllus* foi determinada por Cromatografia Gasosa (CG) acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM), com a finalidade de verificar possíveis alterações nos constituintes química do óleo essencial extraído com e sem a utilização do extrato enzimático, bem como do óleo obtido das folhas secas.

A análise da composição química do óleo essencial extraído sem a enzima (OEC), amostra controle, revelou a presença de 72 compostos, sendo identificados 64. Na amostra de óleo extraído com a presença do extrato enzimático (OEE) foram encontradas 55 compostos e identificados 51. Enquanto o óleo extraído das folhas secas (OEFS), sem nenhum tipo de tratamento, revelou a presença de 59 compostos e identificados 49. A maioria dos compostos identificados nas três amostras de óleo pertence à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, apresentando, também, outros tipos de constituintes de classes diferentes em menor proporção, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Composição química do óleo essencial obtido de folhas frescas com e sem o tratamento enzimático e do óleo obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus*

Constituinte	IRL ¹	IK ²	<i>C. argyrophyllus</i> (%) ³		
			OEC (controle)	OEE (enzima)	OEFS (F.secas)
Monoterpenos hidrocarbonados					
α -Tujeno	848-930	926	0,41	0,39	0,82
α -Pinoeno	927-939	939	5,84	5,34	7,64
Canfeno	937-953	954	0,37	0,36	0,51
Sabineno	950-976	975	1,43	1,21	2,00
β -Pinoeno	974-980	979	1,40	1,16	1,64
Mirceno	977-992	990	0,96	0,96	1,01
ρ -2-Careno	998	1002	0,05	----	----
α -Felandreno	989-1006	1002	0,43	0,43	0,90
ρ -3-Careno	1008-1012	1011	0,27	0,29	----
α -Terpineno	1002-1019	1017	0,33	0,43	0,45
ρ -Cimeno	1016-1028	1026	0,70	0,71	1,06
Silvestreno	1025-1033	1030	1,37	1,4	0,73
(E)- β -Ocimeno	1033-1051	1050	1,48	1,48	1,29
γ -Terpineno	1048-1062	1059	1,19	1,34	1,03
Terpinoleno	1067-1090	1088	0,33	0,46	0,33
Monoterpenos oxigenados					
1,8 Cineol	1030-1036	1031	1,15	0,73	1,41
Cis-Hidrato de sabineno	1059-1070	1070	0,67	0,42	0,34
Trans-Hidrato de sabineno	1097	1098	0,35	----	----
Linalol	1087-1100	1096	0,74	1,24	1,14
Cis-p-Mentha-2-en-1-ol	1097-1124	1121	0,19	0,23	0,16
α -Canfolenal	1125	1126	0,09	----	----
Trans-Pinocarveol	1121-1143	1139	0,24	0,31	0,23
Trans-Verbenol	1140-1149	1144	0,19	0,15	0,11
Pinocarvone	1162	1164	0,08	----	----
Borneol	1146-1170	1169	0,82	0,93	0,76
Terpineno-4-ol	1167-1181	1177	2,01	2,51	1,72
α -Terpineol	1178-1193	1188	0,72	1,07	0,66
Mirtenol	1194	1195	0,10	----	----
Trans-Piperitol	1207	1208	0,11	----	----
Sesquiterpenos hidrocarbonados					
γ -Elemeno	1285-1341	1436	0,26	0,27	0,23
α -Copaeno	1338-1380	1376	0,46	0,47	0,91
β -Bourboneno	1377-1389	1388	0,65	0,74	0,74
β -Elemeno	1386-1396	1390	3,22	3,42	3,51
β -Cariofileno	1393-1429	1419	12,66	13,22	15,57
β -Copaeno	1427-1435	1432	----	0,28	0,44
Aromadendreno	1432-1445	1441	0,64	0,73	0,80
α -Humuleno	1457-1461	1454	3,59	3,79	4,30
9-epi- β -Cariofileno	1463-1467	1466	1,1	1,05	1,25

Germacreno-D	1485-1489	1485	6,83	7,10	7,12
β -Selileno	1488-1492	1490	0,92	0,75	0,92
Biciclogermacreno	1502-1506	1500	13,64	12,93	12,98
Germacreno-A	1508-1513	1509	3,04	3,07	2,74
γ -Cadineno	1525-1529	1523	1,07	1,38	1,58
Cis-Calameno	1535	1529	0,26	----	----
α -Cadineno	1539	1538	0,23	----	----
Germacreno-B	1560	1561	0,73	----	----
Sesquiterpenos oxigenados					
10-epi-Cubebol	1518	1535	1,15	----	1,2
Oxido de Cariofileno	1552	1583	0,58	----	----
Maaliol	1567	1567	0,42	----	----
β -Nerolidol	1570	1563	0,25	----	----
Espatuleno	1587-1591	1578	6,16	7,42	5,66
Viridiflorol	1596-1600	1592	1,34	1,92	1,14
Guaiol	1600	1600	0,5	----	----
Ledol	1607-1611	1602	1,69	1,98	1,71
Epóxido de Humuleno II	1613-1618	1608	0,95	1,57	0,86
1-epi-Cubenol	1632	1628	----	----	0,42
α -Muurolo	1650-1654	1646	1,26	1,07	0,71
β -Eudesmol	1656	1650	----	----	0,21
α -Cadinol	1659-1664	1654	2,19	2,51	1,64
(Z)- α -Santalol	1676-1679	1675	2,04	2,06	1,6
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1691-1694	1686	1,39	1,17	0,38
Outros constituintes					
Diacetona (cetona)	835-840	839	0,55	0,54	0,52
(2E)-Hexenal (aldeído)	847-852	855	0,34	0,14	----
(4Z)-Hexenol (álcool)	850-855	877	0,08	0,55	----
(2E)-Hexenol (álcool)	864	862	----	0,42	----
n-Nonanal (aldeído)	1104	1100	----	0,22	----
Criptona (cetona)	1184	1185	0,08	----	----
α -Acetato de Fenchil (éster)	1219	1220	0,12	----	----
Acetato de Bornila (éster)	1190-1288	1288	0,24	0,25	0,22
Total identificado			94,65	94,57	95,3
Monoterpenos hidrocarbonados			16,56	15,96	19,41
Monoterpenos oxigenados			7,46	7,59	6,53
Sesquiterpenos hidrocarbonados			49,3	49,2	53,09
Sesquiterpenos oxigenados			19,92	19,7	15,53
Outros constituintes			1,41	2,12	0,74

¹Índices de retenção com coluna capilar Factor Four/VF-5ms. ²Índices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007). ³Substâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar Factor Four/VF-5ms. OEC = Óleo extraído sem enzima – controle; OEE = Óleo extraído com enzima; OEFS = Óleo extraído das folhas secas.

A classe de compostos mais representativa foram os sesquiterpenos hidrocarbonados, com aproximadamente 50% do percentual do óleo essencial de *C. argyrophyllus*, seguida dos sesquiterpenos oxigenados (15,53% a 19,92%), monoterpenos hidrocarbonados (15,96% a 19,41%) e monoterpenos oxigenados (6,53 a 7,59%). Observa-se que os percentuais destas classes de compostos estão próximos entre as três amostras de óleo essencial analisados e mesmo que o óleo essencial obtido sem a enzima (OEC) tenha apresentando maiores quantidades de constituintes, a proporção entre as classes de monoterpenos e sesquiterpenos se manteve como as demais amostras, principalmente quando comparado com o óleo extraído com a enzima (OEE).

Comparando a amostra de óleo obtida sem a enzima (OEC) com a amostra de óleo obtida com a aplicação dos extratos enzimáticos (OEE), verifica-se que, os percentuais de cada constituinte identificado para ambas as amostras foram semelhantes, ocorrendo poucas alterações, conforme observado nos percentuais dos constituintes majoritários encontrados para os dois óleos (OEC - OEE): biciclogermacreno (13,64% - 12,93%), β -cariofileno (12,66% - 13,22%), germacreno-D (6,83% - 7,10%), espatulenol (6,16% - 7,42%), α -pineno (5,84% - 5,34%), α -humuleno (3,59% - 3,79%), β -elemeno (3,22% - 3,42%) e germacreno-A (3,04% - 3,07%), respectivamente.

Observa-se também a presença de 19 compostos minoritários que são diferentes entre as duas amostras de óleo (OEC e OEE), com variações de 0,05% a 1,15%, sendo que a amostra OEC apresentou uma maior quantidade de constituintes diferentes em relação à amostra OEE. Esta variação na quantidade dos compostos pode estar relacionada à aplicação das enzimas no pré-tratamento, ou podem ter ocorrido a volatilização e/ou reações de degradação, tendo em vista que os óleos essenciais, em geral, podem ser alterados na presença da luz, calor, ar e umidade, o que dificulta a sua conservação (GUIMARÃES et al. 2008).

A semelhança no percentual dos constituintes identificados para as duas amostras (OEC e OEE), tanto os majoritários como para os minoritários, indicam que a utilização dos extratos enzimáticos com objetivo de aumentar a extração do óleo essencial não ocasionou alterações significativas na composição química dos óleos extraídos, demonstrando assim a viabilidade de aplicação destes extratos. Entretanto, novos testes devem ser realizados com a finalidade de comprovar com mais segurança se as enzimas podem provocar alguma alteração neste óleo, ou se realmente ocorreu alguma reação de degradação que explique a diferença na quantidade de constituintes entre as duas amostras de óleo.

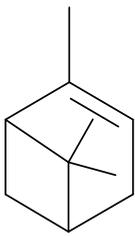
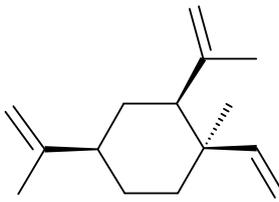
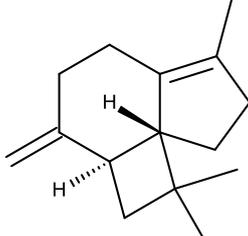
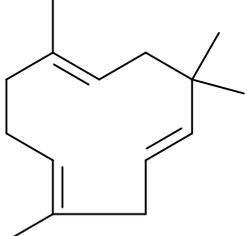
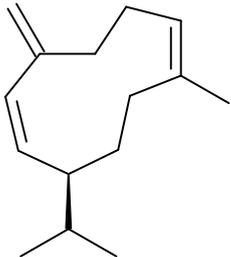
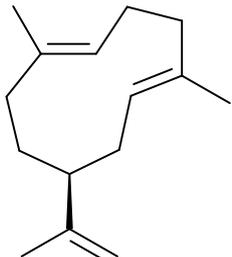
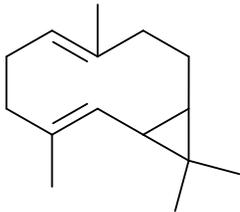
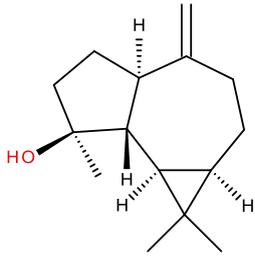
Com relação à análise da composição química do óleo essencial extraído das folhas secas (OEFS), verifica-se que houve uma semelhança nos compostos encontrados,

principalmente em comparação com a amostra OEE. Indicando que a aplicação do pré-tratamento enzimático nas folhas frescas de *C. argyrophyllus*, pode substituir a etapa de secagem e proporcionar economia de energia no processo de extração dos óleos essenciais, contribuindo também com o aumento do rendimento obtido nestes óleos.

No entanto, ocorreu uma diferença maior no percentual dos constituintes presentes no óleo obtido das folhas secas, quando comparado com as duas amostras de óleo obtidas das folhas frescas (OEC e OEE). Os componentes majoritários se mantiveram, sendo o β -cariofileno (15,57%) e o biciclogermacreno (12,98%), seguidos do α -pineno (7,64%), germacreno-D (7,12%), espatulenol (5,66%), α -humuleno (4,30%), β -elemeno (3,51%) e o germacreno-A (2,74%). As estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados no óleo essencial estão descritas na Tabela 10.

As variações nos constituintes do óleo essencial obtido das folhas secas em comparação com o óleo obtido das folhas frescas podem estar relacionadas ao processo de secagem. A secagem do material vegetal tem por finalidade facilitar o acesso do vapor de água às glândulas armazenadoras dos óleos essenciais. Entretanto, por se tratar de substâncias químicas voláteis, o processo de secagem pode ser crítico para qualquer espécie aromática, podendo ocasionar a redução do teor do óleo essencial, favorecendo a volatilização ou a degradação das substâncias presentes no óleo (BORSATO et al., 2008; MACHADO et al., 2013).

Tabela 10. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG/EM nos óleos essenciais das folhas de *C. argyrophyllus*

			
α-pineno	β-elemeno	β-cariofileno	α-humuleno
			
Germacreno-D	Germacreno-A	Biciclogermacreno	(-)-Espatulenol

Diversos trabalhos apresentam dados compatíveis com os encontrados neste estudo, onde as espécies do gênero *Croton* produzem óleos essenciais que são caracterizados pela predominância de monoterpenos e sesquiterpenos. Estas substâncias voláteis proporcionam o aroma dessas plantas e exibem uma enorme variedade estrutural, e podem ser utilizadas como fonte de novas moléculas biologicamente ativas e menos tóxicas, que poderão ser utilizadas na formulação de novos fármacos, coadjuvantes e inseticidas (FERNANDES, 2016).

Costa et al. (2008), identificaram 7 constituintes químicos no óleo essencial obtido das folhas secas de *C. zehntneri*, sendo classificados em mono e sesquiterpenos, demonstrando também que o óleo apresenta potencial biológico contra bactérias patogênicas. Carvalho et al. (2016), comprovaram a atividade tóxica sobre o *Ae. aegypti* do óleo essencial de *C. tetradenius*, sendo identificados 25 constituintes, divididos principalmente em monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados, seguindo em menor proporção por sesquiterpenos.

Morais et al. (2006) avaliaram a composição química do óleo essencial de três espécies de *Croton* da região nordeste (*C. zehntneri*, *C. argyrophyllodes* e *C. nepetaefolius*), e confirmaram a presença de diferentes monoterpenoides, sesquiterpenoides e arilpropanoides, destacando-se o α -copaeno, α -pineno, β -pineno, β -felandreno, metileugenol, trans-cariofileno e o anetol. Estas substâncias foram consideradas pelos autores como as principais responsáveis pela atividade larvicida sobre *Ae. Aegypti*.

Alguns estudos já foram realizados com o óleo essencial de *C. argyrophyllus* e tiveram seus constituintes analisados, sendo que boa parte dos constituintes foram semelhantes aos encontrados neste trabalho. Em estudos realizado por Cruz et al. (2017), foram identificados 45 compostos no óleo obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus*, apresentando os seguintes compostos majoritários: o espatulenol (22,80%), β -cariofileno (15,41%), α -pineno (14,07%), biciclogermacreno (10,43%), Germacreno-D (5,69%) e o 1,8-Cineol (5,18%). Os referidos autores constataram que este óleo essencial apresenta uma boa margem de segurança para uso como inseticida botânico para o controle do vetor *Ae. aegypti*.

Segundo Araujo et al. (2014), o óleo essencial obtido das folhas frescas dessa mesma espécie, apresenta uma significativa atividade citotóxica em macrófagos murinos J774 e na sua composição química foram identificaram 24 constituintes, sendo os compostos majoritários o biciclogermacreno (27,78%), seguido por δ -elemeno (8,67%), β -elemeno (8,50%), prenopsan-8-ol (8,50%), β -cariofileno (6,27%) e espatulenol (4,83%).

Ramos et al. (2013), constataram que o óleo essencial obtido das folhas frescas de *C. argyrophyllus* apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante, e que a sua atividade

biológica pode ser atribuída a alta concentração de biciclogermacreno (14,60%) e espatulenol (8,27%). Os autores identificaram 42 compostos, e encontraram como demais constituintes majoritários o β -cariofileno (6,79%), β -elemeno (6,19%), β -felandreno (5,75%), mirceno (4,81%) e óxido de cariofileno (3,68%).

No trabalho mais atual de Ramos et al. (2016), foram identificados 31 constituintes do óleo essencial das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, tendo como compostos majoritários o biciclogermacreno (14,80%), β -cariofileno (8,0%), espatulenol (7,9%), β -felandreno (6,5%), mirceno (5,9%), germacreno B (4,9%), β -elemeno (4,9%), α -pineno (4,6%) e δ -elemeno (4,4%). A atividade antinociceptiva estudada pelos autores foi atribuída aos compostos majoritários biciclogermacreno, β -cariofileno e o espatulenol.

Existe uma diferença marcante na quantidade de constituintes e no percentual dos compostos majoritários identificados do óleo essencial de *C. argyrophyllus* nos estudos citados e no que foi observado neste trabalho (Tabela 9). Estas diferenças na composição dos óleos essenciais podem estar relacionadas com a influência de fatores abióticos, como o local, época e horário de coleta, radiação, temperatura, precipitação, as condições do solo, pela idade e estágio de desenvolvimento da espécie no período de coleta e pelas técnicas de colheita e pós-colheita empregadas, bem como a utilização do processo de secagem e acondicionamento do material vegetal (MORAIS, 2009). Estes fatores podem exercer variações na composição química e no rendimento dos óleos essenciais estudados nos diferentes trabalhos.

Morais et al. (2006), estudando algumas espécies do gênero *Croton*, verificaram que a composição do óleo essencial apresenta variação ao longo do dia. Para o *C. argyrophylloides*, os principais componentes identificados às 6:00 h foram α -pineno (14,2%), espatulenol (9,8%) e 1,8-cineol (8,2%) e às 13:00 h foram o espatulenol (14,3%), β -cariofileno (10,3%) e felandreno (7,4%). Já para o *C. nepetaefolius* os principais compostos identificados às 6:00 h foram metil-eugenol (39,62%), α -copaeno (19,05%) e biciclogermacreno (5,03%), enquanto que as 13:00 h foram os mesmos compostos majoritários identificados, mais em concentrações diferente, metil-eugenol (27,8%), α -copaeno (18,92%) e biciclogermacreno (7,9%). Estes resultados demonstram que a variação de um fator (horário de coleta) já traz diferenças significativas na composição química dos óleos essenciais.

Geralmente, os constituintes majoritários são responsáveis pelas atividades biológicas presentes nos óleos essenciais extraídos de diferentes espécies aromáticas (RIELLA et al. 2012; RAMOS et al. 2017). Neste contexto, as ações biológicas do óleo essencial de *C.*

argyrophyllus, relatadas pelos diferentes autores poderiam ser atribuídas às altas concentrações de biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e α -pineno, por serem os constituintes mais representativos destacados nestes estudos e no presente trabalho. No entanto, as substâncias em menores concentrações também podem estar contribuindo com tais atividades biológicas, possivelmente através de um efeito sinérgico (RAMOS et al., 2017).

Substâncias minoritárias encontradas neste óleo, como o α -copaeno, α -pineno, β -pineno, e linalol têm sido considerados bons agentes larvicidas, corroborando com os estudos realizados por Cruz et al. (2017). Estes constituintes também já foram encontrados em outras espécies de *Croton*, apresentando também toxicidade sobre o *Ae. aegypti* (MORAIS et al. 2006; NICULAU et al. 2013; CARVALHO et al. 2016).

O biciclogermacreno, um sesquiterpeno normalmente encontrado em óleos essenciais de diversas espécies vegetais, pode servir como intermediário chave na formação de diferentes sesquiterpenóides como o viridiflorol, o ledeno e o espatulenol. Desta forma, a presença de espatulenol no óleo essencial de *C. argyrophyllus* pode ser um subproduto, pelo menos em parte, formado a partir da auto oxidação do biciclogermacreno (TRAN e CRAMER, 2014; RAMOS et al. 2017).

A espécie de *C. argyrophyllus* vem apresentando uma rica diversidade de constituintes químicos presentes no seu óleo essencial, oferecendo componentes ativos promissores para o desenvolvimento de fármacos e inseticidas botânicos. Alguns estudos já comprovaram este potencial farmacológico da espécie, mas o baixo rendimento obtido na extração dos óleos essenciais pelas técnicas convencionais pode inviabilizar a sua aplicação em escala industrial. Assim sendo, torna-se essencial a busca por novas metodologias que favoreçam o aumento no rendimento de extração destes óleos, sendo que a aplicação de extratos enzimáticos na etapa de pré-tratamento, demonstrou ser uma alternativa promissora para proporcionar este aumento na extração dos óleos essenciais para a espécie de *C. argyrophyllus*.

4.3.3 Análise micromorfológica

A análise das folhas de *C. argyrophyllus* por microscópica eletrônica de varredura revelou a presença de tricomas estrelados em abundância, estando presentes em maior quantidade na face abaxial da folha, ocorrendo na face adaxial em menor densidade, conforme pode ser observado nas Figuras 10 e 11. As imagens na Figura 10 foram realizadas nas folhas frescas após a coleta, sem sofrer nenhum tipo de tratamento com o extrato enzimático e nem terem sido submetidas ao processo de extração.

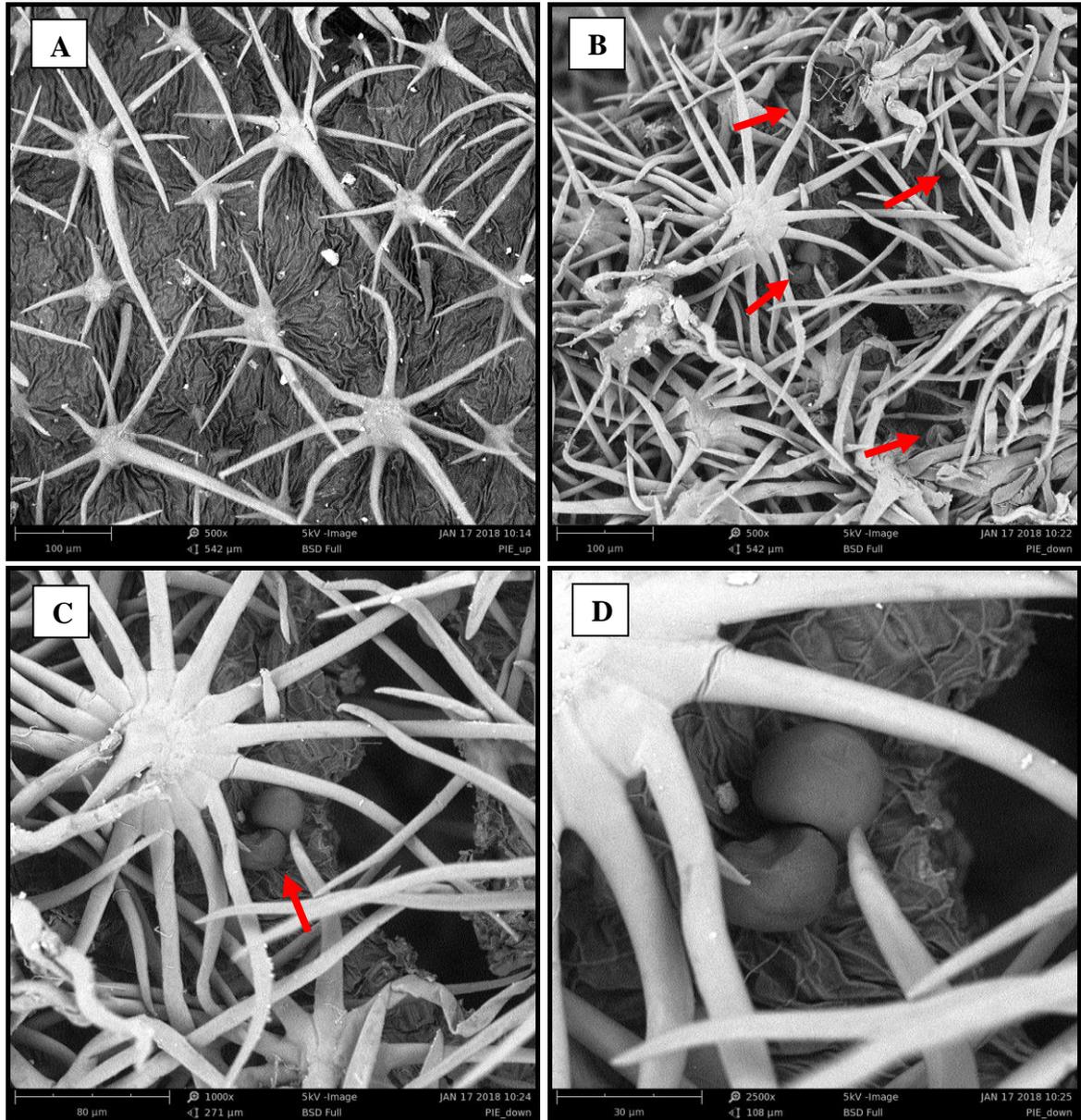


Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura das folhas de *C. argyrophyllus*: Face adaxial (A) e face abaxial (B, C e D).

Também foram observadas algumas estruturas semelhantes à tricomas glandulares na face abaxial da folha, conforme observado na imagem B, C e D da Figura 10. Já na face adaxial da folha (A), não foram observados tricomas glandulares. Os tricomas glandulares são os responsáveis pela maior produção e armazenamento de óleo essencial em espécies vegetais aromáticas e, normalmente, a maior quantidade destes tricomas são encontrados na face abaxial (REIS, 2015), confirmando o que foi observado pelas imagens.

Na Figura 11, são observadas as eletromicrografias das folhas submetidas ao tratamento enzimático nas condições otimizadas (Temperatura de 41,3°C, volume de enzima 130,73 mL e tempo de contato 140 min) e das folhas da amostra controle, submersas apenas em água.

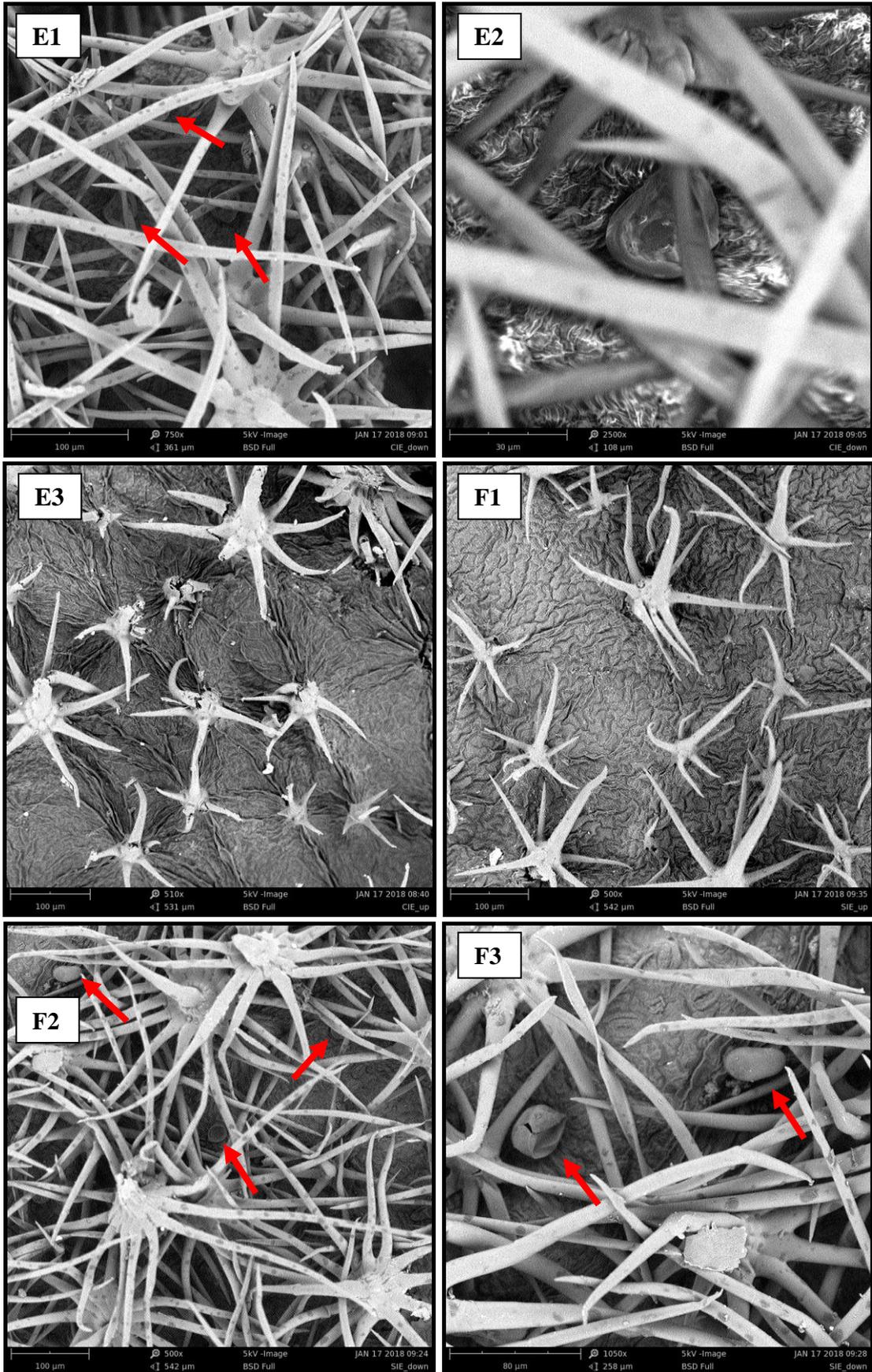


Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura das folhas frescas após tratamento enzimático faces adaxial (E3) e abaxial (E1 e E2) / Controle - Faces adaxial (F1) e abaxial (F2 e F3).

Visualizando as eletromicrografias apresentadas na Figura 11 é possível verificar que ocorreu um maior rompimento dos tricomas glandulares com a utilização dos extratos enzimático na etapa de pré-tratamento (E1 e E2), quando comparados com as folhas submersas apenas em água (amostra controle), onde foram encontrados tricomas intactos (F2 e F3). Confirmando assim a eficiência da aplicação dos extratos enzimáticos na etapa de pré-tratamento visando o aumento na extração do óleo essencial sobre as folhas frescas (9,06%). Entretanto, não foi possível quantificar adequadamente o rompimento destes tricomas glandulares, pelo fato das folhas apresentarem uma grande quantidade de tricomas estrelados na face abaxial, dificultando assim, a visualização dos tricomas glandulares.

Os tricomas exercem papel importante na defesa de espécies vegetais e a produção destas estruturas foliares pelas plantas geralmente está associado à pressão de herbivoria. Os tricomas glandulares, por exemplo, produzem substâncias repelentes ou que provocam irritação. Outras estruturas apresentam função de reduzir a perda de água, diminuir a incidência luminosa e formarem uma densa cobertura que pode servir como barreira mecânica (BARBOSA et al., 2010).

Estas características de proteção foliar podem explicar a grande quantidade de tricomas estrelados que foram observados na folha da espécie em estudo. Entretanto, tais tricomas não são específicos para armazenar óleo essencial, possuindo uma função mais específica na defesa física da espécie (BARBOSA et al., 2010).

A face adaxial das folhas da espécie em estudo não apresentam tricomas glandulares (Figura 10 (A); Figura 11 (E3 e F1)), apresentando poucas quantidades apenas na face abaxial. Estes tricomas são os principais responsáveis por armazenar e sintetizar a maior quantidade de óleo, e pelas eletromicrografias é possível observar poucas destas estruturas, o que pode justificar o baixo rendimento de óleo obtido para a espécie de *C. argyrophyllus*, mesmo com a aplicação de pré-tratamentos enzimáticos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais confirmam a viabilidade na utilização da palma forrageira como substrato para a produção de extratos multienzimáticos pelo fungo *Aspergillus niger*. Através da fermentação em estado sólido realizada no presente estudo foram produzidas diferentes enzimas hidrolíticas (celulases totais, endoglucanases e poligalacturonase), que apresentaram significativa atividade enzimática.

Os óleos essenciais das folhas secas de *C. argyrophyllus* foram obtidos com rendimento médio de 0,37% pelo processo convencional de extração por hidrodestilação sem aplicação de extratos enzimáticos, sendo considerado um baixo rendimento quando comparado com outras espécies do mesmo gênero.

Os valores ótimos de temperatura, volume de extrato enzimático e tempo de contato para realizar o pré-tratamento das folhas frescas de *C. argyrophyllus* foram bem otimizados, onde o efeito sinérgico destas enzimas, associado à técnica de hidrodestilação, possibilitou a extração do óleo essencial das folhas frescas com elevação do rendimento em até 9,81%. Enquanto que o pré-tratamento enzimático aplicado nas folhas secas, com os valores otimizados para as folhas frescas, proporcionou o aumento no rendimento de óleo essencial em 6,77%, demonstrando a eficiência do pré-tratamento enzimático associado à técnica de hidrodestilação.

A composição química dos óleos essenciais não sofreu alterações marcantes pela aplicação do extrato enzimático no processo. Entretanto, o processo de secagem das folhas provocou algumas alterações em relação ao óleo obtido das folhas frescas. Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. argyrophyllus* foram o β -cariofileno e o biciclogermacreno.

Foi observada uma correlação entre o rendimento do óleo essencial obtido das folhas de *C. argyrophyllus* e a quantidade de estruturas especializadas para a síntese e armazenamento do óleo essencial na planta (tricomas).

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4a ed. Allured publishing corporation, Illions, 2007, pp 362
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.
- ALTUN, G.D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food chemistry**, v. 100, n. 3, p. 964-971, 2007.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, 2009.
- AMORIM, G. M.; SANTOS, T. C.; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 24-27, 2012.
- ARAÚJO, S. S.; SANTOS, M. I. S.; DIAS, A. S.; FERRO, R. N.; LIMA, E. O.; BARRETO, C. B.; et al. Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* kunth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 6, p. 446-451, 2014.
- BABY, K. C.; RANGANATHAN, T. V. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum* maton.) volatile oil. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 200-206, 2016.
- BARBOSA, J. M.; GOEDERT, D.; SANTOS, M. B.; LOIOLA, M.; MARTINS, T. K. Tricomas glandulares conferem defesa contra herbivoria em *Clidemia* sp.(Melastomataceae). **Livro do curso de campo “Ecologia da Mata Atlântica”(G. Machado & PIKL Prado, eds.)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B.; PINTO, F. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V. Flavonoids and terpenoids from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 656-669, 2016.

- BERRY P. E.; KENNETH, H. W. J.; VAN, B. E. E.; RIINA R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trn-F* sequence data. **American Journal of Botany**. Estados Unidos, p. 1520-1534, 2 maio, 2005.
- BEZERRA, M. A; SANTELLI, R. E; OLIVEIRA, E. P; VILLAR, L. S; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BORSATO, A. V; DONI-FILHO, L.; PAGLIA, E. C. Tricomas glandulares e teores de água e do óleo essencial de Camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) sob secagem em camada fixa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 50-55, ago., 2008.
- BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. CAATINGA: Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite, Relatório técnico, Brasília. 2011.
- BUENO, M. C.; PERES, M. D. F. S.; GATTAS, E. A. L. Produção de poligalacturonase por três linhagens de *Aspergillus* isolados do solo. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara-SP, v. 16, n. 3, p. 253-257, 2005.
- BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O. S; COSTA JÚNIOR, E. F. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.
- CARNEIRO-TORRES, D. S.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A. M.; BERRY, P. E.; RIINA, R. Three new species of *Croton* (Euphobiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. **Brittonia**, v. 63, n. 1, p. 122-132, 2011.
- CARVALHO, T.; ABREU FILHO, G.; PACHECO, C. S. V.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 14, n. 3, p. 48-57, 2012.
- CARVALHO, K. S.; SILVA, S. L. C.; SOUZA, I. A.; GUALBERTO, S. A.; CRUZ, R. C. D.; SANTOS, F. R.; et al. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology research**, v. 115, n. 9, p. 3441-3448, 2016.
- CASCIATORI, F. P; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114-123, 2015.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHANG, M. C. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 677-684, 2007.
- CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ANGELO, P. C. S.; XAVIER, J. J. B. N.; SÁ SOBRINHO, A. F. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 117-119, 2006.

- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- COELHO, P. L. C.; FREITAS, S. R. V. B.; PITANGA, B. P. S.; SILVA, V. D. A.; OLIVEIRA, M. N.; GRANGEIRO, M. S.; et al. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 34-43, 2016.
- COLMANETTI, M. A. A.; BARBOSA, L. M.; SHIRASUNA, R. T.; COUTO, H. T. Z. D. Phytosociology and structural characterization of woody regeneration from a reforestation with native species in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2016.
- CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3 supl I, p. 685-692, 2014.
- CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANG, K. F.; PRADO, P. R.; FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ, F. R.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of ethnopharmacology**, v. 183, p. 128-135, 2016.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 583-586, 2008.
- COSTA, M. A. R.; SANTOS, R. R. C.; GUALBERTO, S. A.; SILVA, S. L. C. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**. v. 14, n. 25, p. 687-701, 2017.
- CRUZ, R. C.; SILVA, S. L. C. E.; SOUZA, I. A.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; SANTOS, F. R.; et al. Toxicological Evaluation of Essential Oil From the Leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of medical entomology**, p. 1-9, 2017.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-125, 2003.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.
- FERNANDES, D. N. M. **Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill (Euphorbiaceae)**. 2016. 74 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento), UESB, Itapetinga-BA, 2015.
- FRANCISCO-JÚNIOR., F. E.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; et al. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 469-477, 2014.

- FRANCO, M. N. **Produção de celulases por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol.** 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). UFRJ. Rio de Janeiro, 2009.
- GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. (Org.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro,** 2010.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GIULIETTI, A. M.; BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma da caatinga. In: **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** Brasília: MMA-UFPE, 2004. p. 47-90, 2004.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, v.31, p.1476-1480, 2008.
- HALCHAR, F. Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARALS, M. F.; et al. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environ. Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 625-634, 2007.
- HOSNI, K., HASSEN, I., CHAABANE, H., JEMLI, M., DALLALI, S., SEBEI, H.; et al. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. **Industrial crops and products**, v. 47, p. 291-299, 2013.
- JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R.; Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.
- LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga: Uma Introdução ao Desafio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). **Ecologia e Conservação da Caatinga.** Editora UFPE, 2003.
- LI, L.; ZHU, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; CHEN, W. Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritime* on metal-chelate Eupergit C 250L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 278 – 285, 2007.
- LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropical**, Campinas. v. 8, n. 2, p. 177-231, 2008.

LOPES, E. L.; ANDRADE NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoids and sesquiterpenes of *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACHADO, M. P.; BERGO, C. L.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H. R.; BIASI, L. A. Efeito da secagem natural e artificial da biomassa foliar de *Piper hispidinervum* na composição química do óleo essencial. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 265-270, 2013.

MEIRELES, D. R.; FERNANDES, H. M.; ROLIM, T. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOUSA, T. K.; et al. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 751-758, 2016.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C. L.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista da Universidade Rural**, v. 25, n. 1, p. 15-27, 2006.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de carboximetilcelulose utilizando fungo *Pleurotus*: produção de oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis para a indústria de etanol. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 19, n. 2, p. 1303-1307, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MMA. **Ministério do Meio Ambiente (BRASIL)**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 19 de jul. 2017.

MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of essential oil steam distillation by microwave pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 8, p. 4667-4671, 2011.

NICULAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGEIRA, P. C.; MORAES, V. R. S.; MATOS, A. P.; BERNARDO, A. R.; et al. Insecticidal activity of essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Herit and *Lippia alba* (Mill) NE Brown against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Química Nova**, 36: 1391-1394, 2013.

NORRIS, E. J.; GROSS, A. D.; DUNPHY, B. M.; BESSETE, S.; BARTHOLOMY, L.; COATS, J. R. Comparison of the insecticidal characteristics of commercially available plant essential oils against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 993-1002, 2015.

- NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**, v. 12, n. 2, 2010.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, R. A.; ALMEIDA, J. S.; MELO, W. F.; ANDRADE, A. B. A.; MELLO, W. F. Análise geoespacial do processo de desmatamento da Caatinga no município de Catolé do Rocha–PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 239-244, 2015.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p.149-161, 1999.
- PELIEZER H. L.; PONTIERI H. M.; MORAES O. I. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management e Innovation**, v. 2, 2007.
- PEREIRA-JÚNIOR, L. R.; ANDRADE, A. P.; ARAÚJO, K. D., BARBOSA, A. S.; BARBOSA, F. M. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Flores e Ambiente**, 2014.
- PETRONILHO, S.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. A critical review on extraction techniques and gas chromatography based determination of grapevine derived sesquiterpenes. **Analytica chimica acta**, v. 846, p. 8-35, 2014.
- PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- POLLITO, P.A.Z.; TOMAZELLO, M.; TAKASHIBA, H.E. Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. **Natureza e Conservação**, v. 2, n. 1, p. 42-55, 2004.
- PRADE, R. A.; ZHANG, D.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, n. 1, p.361-392, 1999.
- PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. **Ecologia e conservação da Caatinga**, v. 2, p. 3-74, 2003.
- QIU, M.; CAO, D.; GAO, Y.; LI, S.; ZHU, J.; YANG, B.; et al. New clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. **Fitoterapia**, v. 108, p. 81-86, 2016.
- RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; et al. Impact of *Croton argyrophyllus* essential oil on behavioural models of nociception. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 1, p. 40-45, 2016.

RAVANELLI, N.; SANTOS, K. P.; MOTTA, L. B.; LAGO, J. H. G.; FURLAN, C. M. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV potential. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 153-156, 2016.

REIS, N.S. **Aplicação de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis***. 2015. 65 p. (Dissertação: Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos – Área de Concentração em Ciência dos Alimentos) UESB, Itapetinga-BA, 2015.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATO, D. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137, 2010.

SADAT-HOSSEINI, M.; FARAJPOUR, M.; BORROOMAND, N.; SOLAIMANI-SARDOU, F. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants in the south of Kerman, Iran. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 194-204, 2017.

SAHA, S.; ROY, R. N.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of cellulose producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 4, p. 380-388, 2006.

SANTANA, M. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. 2010. 65 p. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana-Ba, 2010.

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, 2012.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, 2014.

SANTOS, E. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. 2008. 127p. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2008.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011a.

- SANTOS, T. C.; AMORIM, G. M.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica *Rhizopus* sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpúrea* L.). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13 n.3, p.145-9, 2011b.
- SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. H.; FONSECA, S. F.; FRANCO, M. Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 270-276, 2012.
- SANTOS, T. C.; REIS, N. S.; SILVA, T. P.; MACHADO, F. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Prickly palm cactus husk as a raw material for production of ligninolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 205-211, 2016.
- SARAIVA, M. E.; ULISSES, A. V. R. A.; RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; SOUZA, F. F. S.; et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.
- SERAFINI, L. A.; SANTOS, A. C. A.; TOUGUINHA, L. A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. **Caxias do Sul: EDUCS**, 2002.
- SILVA, J. D.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002 235 p.
- SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. D.; LINS, L. V. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. **Ministério do Meio Ambiente, Brasília**, 2003.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.
- SILVA-FILHO, F. A.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; Structure elucidation of casbane diterpenes from *Croton argyrophyllus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 370–373, 2011.
- SILVA, S. O.; FERREIRA, R. L. C., SILVA, J. A. A. ; LIRA, M. A.; ALVES JÚNIOR, F. T.; CANO, M. O. O.; et al. Regeneração natural em um remanescente de caatinga com diferentes históricos de uso no agreste pernambucano. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 441-450, 2012.
- SILVA, S. L. C.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.
- SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção *flavi*: uma revisão. **Revista Ifes Ciência- ISSN 2359-4799**, v. 1, n. 1, 2015.
- SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JÚNIOR., E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. ed. 6, Porto Alegre, ED. UFRGS p. 1102, 2007.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOUZA L. A. R.; OLIVEIRA S. C. L.; SILVAS L. H. F.; AMORIM C. B. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.14, n.9, p.987-992, 2010.

TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em estado sólido por *Aspergillus Níger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides***. 67p. 2012. (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de processos de Alimentos, UESB, Itapetinga-BA, 2012.

TRAN, D. N.; CRAMER, N. Biomimetic Synthesis of (+)-Ledene, (+)-Viridiflorol, (-)-Palustrol, (+)-Spathulenol, and Psiguadial A, C, and D via the Platform Terpene (+)-Bicyclogermacrene. **Chemistry-A European Journal**, v. 20, n. 34, p. 10654-10660, 2014.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGAO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013.

WU, H.; PEI, J.; WU, G.; SHAO, W. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritime* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 3, p. 230 - 234, 2008.

YAGI, S.; BABIKER, R.; TZANOVA, T.; SCHOHN, H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 8, p. 763-770, 2016.

ZHANG, Z.; LI, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. **Microchemical journal**, v. 95, n. 2, p. 127-139, 2010.