



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS JUVINO OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS
BRUTOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO, A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA
EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL**

IASNAIA MARIA DE CARVALHO TAVARES

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2012**

IASNAIA MARIA DE CARVALHO TAVARES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS
BRUTOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO, A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA
EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL**

**Dissertação apresentada à Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte integrante
das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em
Engenharia de processos de Alimentos, para obtenção
do título de “Mestre”.**

Orientador:

Prof. *D.Sc.* Marcelo Franco

Co-orientadores:

Prof. *D.Sc.* Baraquízio Braga do Nascimento Júnior

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL**

2012

661.806 T23p	<p>Tavares, Iasnaia Maria de Carvalho.</p> <p>Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial. / Iasnaia Maria de Carvalho Tavares. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. 67 fl..</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Senso</i>” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco e co-orientador Prof. D. Sc. Baraquízio Braga do Nascimento Júnior.</p> <p>1. Óleos essenciais – Extração – Extratos enzimáticos. 2. Extratos enzimáticos – Produção e aplicação – Resíduos agroindustriais. 3. Enzimas – Usos – Extração de óleos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Nascimento Júnior, Baraquízio Braga do. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 661.806</p>
-----------------	--

Catalogação na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Óleos essenciais : Extração
2. Extratos enzimáticos : Produção e aplicação
3. Enzimas : Usos : Extração de óleos



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTOS PRODUZIDOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *ASPERGILUS NIGER* A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CROTON GREIVOIDES."

Autor: IASNAIA MARIA DE CARVALHO TAVARES

Orientadora: MARCELO FRANCO, *DSc.*, UESB

Co-orientadora: BARAQUIZIO BRAGA DO NASCIMENTO, *DSc.*, UESB

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Marcelo Franco, *DSc.*, UESB

Profª Drª. Andréa Miura da Costa, *DSc.*, UESB

Profª. Drª. Julliana Izabelle Simionato, *DSc.*, UESB

Data da Realização: 29 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Pedro e Cláudia, pela fé e confiança em mim depositada, aos meus irmãos Goia e João, pelo carinho e compreensão durante esta jornada, e todos os meus familiares que se demonstram orgulhosos por este trabalho realizado;

Aos orientadores Marcelo Franco e Baraquízio, pela ajuda, esforço, por confiarem na minha capacidade e estarem sempre presentes;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo Programa de Pós Graduação; e à FAPESB, pela bolsa concedida;

Aos membros da banca, Juliana e Andéa, pelas valorosas sugestões;

A todos os colegas do LABRA, pelo companheirismo e pela ajuda na realização dos trabalhos, em especial, á Gau, Thiago, Alê, Ane, Tamires e Jobson, que estavam presentes nos primeiros passos, errando e aprendendo juntos;

À Julia, amiga, irmã mais nova, companheira de todas as horas, que junto a Tiago Fontes ajudou diretamente para que este trabalho fosse realizado;

Em especial, a Rúbner e Luciene, os melhores amigos que toda pessoa sonha em ter, que me ajudaram, incentivaram e com quem caminhei junto por esta etapa de minha vida e agora ficarão em meu coração por onde eu for;

Às agregadas de minha casa, Milene e Neura, amigas muito queridas e especiais, pelas quais brindarei todas as taças de vinho que vir a tomar por toda minha vida;

Aos eternos amigos, os melhores colegas de faculdade e parceiros de estudo, Vanessa e Galego, que sempre pude e poderei contar;

Aos amigos inestimáveis, que conquistei aqui em Itapetinga: Suzi, Pit, Elaine, Alan, Rafa, Stenio, Diego e ao casal Lucas e Ju, que sempre participaram e se fizeram presentes em minha vida, cada um de uma forma muito especial;

Ao pessoal que sempre se reunia no almoço (maior parte do povo filão do LEP), pela amizade e pelos bons momentos juntos;

Ao pessoal do mestrado de química em Jequié, que me acompanharam e auxiliaram na primeira etapa do projeto;

Ao professor Metil e à professora Vanderlúcia, pela ajuda inestimável;

Ao Sr. Zé do posto Dantas, por ter feito a coleta de minhas plantas, tantas vezes, em baixo de sol e chuva;

À Liz, Luana, Fabricia, Wiliana, Alice e à Renatinha, pela acolhida em suas casas e suas vidas. A todos os amigos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos;

Por último e mais importante, a Deus, em quem confio, que me guiou até aqui e que sempre reservou coisas boas em meu caminho.

*“Nem os olhos viram, nem os ouvidos ouviram
e o coração do homem não percebeu,
o que Deus preparou para aqueles que o amam”*

1 Coríntios 2:9

RESUMO

TAVARES, Iasnaia Maria de Carvalho, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Fevereiro de 2012. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido, a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial:** Prof. D.Sc. Marcelo Franco. Co-orientador Prof. D.Sc. Baraúzio Braga do Nascimento Junior.

A utilização de enzimas na extração de óleos está sendo muito estudada atualmente, porém é pouco aplicada industrialmente, uma vez que o processo é encarecido pelo preço de enzimas purificadas, mas a utilização de extratos enzimáticos brutos com altas concentrações de enzimas específicas pode ser um modo de minimizar este problema. Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi testar a utilização de extratos enzimáticos brutos produzidos a partir de resíduos agroindustriais de caju (*Anacardium occidentale L.*) e de acerola (*Malpighia emarginata D.C.*) por fermentação em estado sólido na extração de óleos essenciais provenientes de plantas aromáticas nativas da espécie *Croton grewoides* da região do sudoeste da Bahia. Em uma primeira etapa, foi utilizado o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, incubado a uma temperatura de 30°C para fermentação em estado sólido dos resíduos, analisando o efeito da variação da umidade (30, 40 e 50%, para o resíduo de caju, e de 50, 60 e 70%, para o de acerola) e tempo (24, 48, 72 e 96 horas) sobre a produção das enzimas CMCase (endoglucanase), FPases (exo e endoglucanases) e Xilanases. Na segunda etapa, o extrato enzimático foi utilizado no pré-tratamento no material vegetal, a uma temperatura de 50° C por 60 minutos, seguido da extração do óleo pela técnica da hidrodestilação, com um aparelho de Clevenger. Foi estudada a variação quantitativa e qualitativa de óleo obtido durante os tempos de 1 a 4 horas de extração e também na presença de concentrações crescentes de extrato enzimático bruto. Em paralelo, foi realizado o teste controle, no qual a mesma quantidade de material vegetal foi submetida ao tratamento nas mesmas condições, porém, apenas com tampão citrato. Os constituintes químicos destes óleos foram analisados e identificados em cromatógrafo gasoso. O microrganismo selecionado obteve rápido crescimento em todas as umidades testadas nos dois resíduos, produzindo, assim, valores de atividade considerável de todas as enzimas analisadas em tempo reduzido. Pode ser destacado ainda que o fungo sintetizou a enzima, utilizando como único indutor o resíduo agroindustrial e adicionado somente de água, em concentrações diferentes. As condições de fermentação selecionadas para a produção de extrato enzimático bruto para aplicação na extração de óleo essencial foi de 48 horas e 50% de umidade para ambos os resíduos. Estas foram escolhidas por serem consideradas as condições de produção mais eficientes, por atingirem valores de atividades enzimáticas mais próximas dos máximos. Foi comprovada a eficácia da utilização dos extratos enzimáticos brutos para o aumento do rendimento da extração do óleo de *Croton*. Obteve-se um aumento da massa de óleo máximo médio de 14,14 e 10,01% para acerola e caju, respectivamente. Estes óleos extraídos não sofreram nenhuma alteração química ou incorporação de nenhuma substância volátil, seja pela variação do tempo de extração ou pelo aumento da concentração de extrato enzimático. O Extrato enzimático bruto, produzido a partir de resíduo de acerola, foi considerado mais eficiente para a extração de óleos essenciais.

Palavra-chave: *Aspergillus niger*, *Croton grewoides*, rendimento, hidrodestilação.

ABSTRACT

TAVARES, Iasnaia Maria de Carvalho, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Fevereiro de 2012. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido, a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Croton grewoides***: Prof. D.Sc. Marcelo Franco. Co-orientador Prof. D.Sc. Baraquízio Braga do Nascimento Junior.

The use of enzymes in the extraction of oil is currently being widely studied, however little is applied industrially, since the process becomes more expensive the price of purified enzyme, but use the crude enzyme extract with high concentrations of specific enzymes may be a way of minimizing this problem. Within this perspective, the objective of this study was to test the use of crude enzyme extract produced from agroindustrial waste of cashew (*Anacardium occidentale L.*) and acerola fruit (*Malpighia emarginata DC*) by solid state fermentation to extract essential oils from herbs native species of *Croton grewoides* the southwest region of Bahia. In the first step was used for the filamentous fungus *Aspergillus niger* incubated at a temperature of 30 ° C for solid state fermentation of waste examined the effect of varying moisture (30, 40 to 50% residue of cashew and 50, 60 and 70% of acerola fruit) and time (24, 48, 72 and 96 hours) of enzyme CMCase (endoglucanase) FPases (endoglucanases and exo) and xylanases. In the second step, the enzyme extract was used in the pretreatment in the plant material at a temperature of 50 ° C for 60 minutes, followed by extraction of the oil by steam distillation technique, with a device Clevenger. We studied the quantitative and qualitative variation of the oil obtained during the time 1-4 hours of extraction, and also in the presence of increasing concentrations of crude enzyme extrac. In parallel, control test was performed in which the same amount of plant material was treated under the same conditions, but only with citrate buffer. The chemical constituents of these oils were analyzed and identified by gas chromatography. The microorganism selected achieved rapid growth in all humidities tested in two residues, thereby producing significant amounts of activity of all enzymes analyzed in a short time. It may be noted also that the fungus synthesizing enzyme, using a single inductor agroindustrial residue and water added only in different concentrations. The fermentation conditions selected for the production of crude enzyme extract for application to the extraction of essential oil was 48 hours and 50% RH for both residues. These were chosen because they are considered the conditions of production more efficient, by reaching values of enzymatic activities closer to the maximum. The efficacy of the use of crude enzyme extract to increase the efficiency of extraction of oil from *Croton*. Was obtained increases the mass of oil and maximum average of 14.14 to 10.01% and cashew acerola, respectively. These oils extracted experienced no chemical modification or addition of any volatile substance, either by varying the time of extraction or by increasing the concentration of enzyme extract The crude enzyme extract, produced from the residue of acerola was considered more efficient for the extraction of essential oils.

Keyword: *Aspergillus niger*, *Croton grewoides*, income, hydrodistillation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Umidade e a_w dos meios esterilizados, obtidos para cada volume de água adicionado a 10g de resíduo de acerola..	30
Tabela 2: Umidade e a_w do resíduo de caju esterilizado, obtido para cada volume de água, adicionado a 10g de resíduo de caju.....	31
Tabela 3: Massa do óleo essencial, obtido com e sem pré-tratamento com EEB, produzido a partir de resíduo de caju e acerola recolhido após diferentes tempos de extração e seu rendimento.....	43
Tabela 4: Aumento da massa de óleo essencial de <i>Croton grewoides</i> , após 1 hora de extração, utilizando extrato enzimático bruto obtido a partir de resíduo de caju.....	45
Tabela 5: Aumento da massa de óleo essencial de <i>Croton grewoides</i> , após 1 hora de extração, utilizando extrato enzimático bruto obtido a partir de resíduo de acerola.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias presentes na parede celular vegetal.	18
Figura 2: Estrutura da parede celular vegetal..	18
Figura 3: Mecanismo de ação das celulases através do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidades ou celobioses.	20
Figura 4: Esporos de <i>A. Níger</i>	21
Figura 5: <i>Croton grewioides</i>	24
Figura 6: Estrutura química do metilchavicol.....	25
Figura 7: Extrator de Clevenger modificado..	26
Figura 8: Fluxograma das etapas realizadas durante a parte experimental	28
Figura 9: Resíduo de acerola e caju, secos a 70°C, por 24 horas, e triturados, granulometria final de 20 mesh	29
Figura 10: <i>Aspergillus niger</i> propagados em PDA por 7 dias a 30°C..	29
Figura 11: Biorreatores contendo resíduos de caju e acerola	30
Figura 12: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de endoglucanase (CMCase) por <i>Aspergillus niger</i>	36
Figura 13: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre a produção de endoglucanase (CMCase) por <i>Aspergillus niger</i>	37
Figura 14: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de endo e exoglucanase (FPase) por <i>Aspergillus niger</i>	39
Figura 15: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre a produção de endo e exoglucanase (FPase) por <i>Aspergillus niger</i>	39
Figura 16: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de xilanase por <i>Aspergillus niger</i>	40
Figura 17: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre a produção de xilanase por <i>Aspergillus niger</i>	41
Figura 18: Cromatograma referente ao OC após 4 horas de extração	44
Figura 19: Cromatograma referente ao OA após 4 horas de extração	44
Figura 20: Cromatograma referente ao OS após 4 horas de extração	44
Figura 21: Aumento da massa de óleo essencial extraída pelo volume de EEB, produzido a partir de resíduo de caju	47
Figura 22: Aumento da massa de óleo essencial extraída pelo volume de EEB, produzido a partir de resíduo de acerola	47
Figura 6 : Cromatograma referente ao OC.....	49
Figura 7 : Cromatograma referente ao OA.....	49
Figura 8 : Cromatograma referente ao OC.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EEB- Extrato Enzimático Bruto

FES- Fermentação em Estado Sólido

FS- Fermentação Submersa

ISO- International Standardization Organization

GC-FID- Gas Chromatography in Flame Ionization Detector

CG- Cromatografia Gasosa

AW- Atividade de Água

EE- Extrato Enzimático

OC- Óleo essencial extraído com o auxílio de EEB produzido a partir de resíduo de caju

OA- Óleo essencial extraído com o auxílio de EEB produzido a partir de resíduo de acerola

OS- Óleo essencial extraído sem o auxílio de EEB

SÚMARIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Resíduos agroindustriais.....	16
3.2 Parede celular vegetal.....	17
3.3 Enzimas degradadoras da parede celular.....	19
3.3.1 Celulases.....	19
3.3.2 Hemicelulases.....	20
3.4 Microrganismo utilizado.....	21
3.5 Produção de enzimas por FES.....	22
3.6 Óleos essenciais.....	23
3.7 Gênero <i>Croton</i>	23
3.7.1 Metilchavicol.....	25
3.4 Métodos físicos e químicos de extração de óleo essencial.....	25
3.8 Utilização de enzimas na extração de óleos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Otimização do processo de fermentação em estado sólido para obtenção do extrato enzimático bruto.....	28
4.1.1 Obtenção e preparação do resíduo.....	28
4.1.2 Obtenção do Inócuo.....	29
4.1.2.1 Preparo e obtenção de suspensão de esporos.....	29
4.1.3 Obtenção do Extrato enzimático bruto.....	30
4.1.3.1 Fermentação em estado sólido.....	30
4.1.3.2 Extração do fermentado.....	31
4.1.4 Análise da Atividade Enzimática.....	31

4.1.4.1	Atividade deCMCase (endogluconase).....	31
4.1.4.2	Atividade de FPase (celulase total).....	32
4.1.4.3	Atividade de xilanase.....	32
4.2	Extração de óleo essencial.....	33
4.2.1	Preparo dos Substratos.....	33
4.2.1.1	Coleta do Material Botânico para Herborização e Identificação da Espécie.....	33
4.2.1.2	Coleta do Material Vegetal para Obtenção dos Óleos Essenciais.....	33
4.2.2	Aplicação das enzimas na extração dos óleos essenciais.....	33
4.2.3	Avaliação do tempo de extração de óleo essencial.....	34
4.2.4	Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos.....	34
4.2.5	Análises cromatográficas.....	34
4.2.6	Análises estatísticas.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.2.1	Avaliação do tempo de extração.....	42
5.2.2	Determinação da concentração enzimática.....	45
6	CONCLUSÕES.....	50
7	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	51
8	REFERENCIAS.....	52
	APÊNDICE.....	61

|

1 INTRODUÇÃO

O uso de óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções de realeza e à busca de bem estar físico, através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, flores, folhas e sementes. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação introduzido pelos cientistas mulçumanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (SIANI et al., 2000).

Para a remoção destes óleos essenciais, tem-se utilizado outros processos físicos e/ou mecânico, além da hidrodestilação, como a retirada por solventes ou prensagem, no intuito de romper as células, facilitando a saída destes óleos. Uma alternativa para otimizar o processo de extração é o emprego de enzimas celulolíticas, que degradam a parede celular.

A utilização destas enzimas para aumentar o rendimento da extração de óleos tem sido muito estudada (HANMOUNGJAI et al., 2001; SHANKAR et al., 1997). Nesse processo, há a ruptura da parede celular, nesse caso, pelo uso de enzimas específicas, facilitando o processo de extração, ocasionando um aumento na velocidade de extração e no rendimento, e ainda tornando possível o uso de métodos de extração mais econômicos e menos nocivos ao meio ambiente (SANTOS, 2008). A extração enzimática de óleos vegetais, principalmente para aumentar o rendimento de obtenção de óleo, fornece resultados promissores, quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos (SANTOS e FERRARI, 2005). Por exemplo, elimina o consumo de solvente, resultando em uma diminuição no consumo de energia e, conseqüentemente, no custo da extração (BARRIOS et al., 1990).

A partir das observações feitas sobre a acumulação do óleo nos espaços intracelulares em células vegetais, os pesquisadores têm estudado substâncias capazes de afetar a estrutura das células com objetivo de melhorar a extração de óleo, mas a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso (SOSULSKI, 1962).

A seleção das enzimas requer o conhecimento da composição do tecido vegetal da oleaginosa a ser processada. Considerando que a parede celular é composta de diferentes grupos de polissacarídeos, o extrato enzimático deve conter diferentes enzimas com atividades de celulasas, hemicelulasas, pectinases, amilases e proteases (FREITAS et al., 1996).

A desvantagem da utilização de enzimas na extração de óleos está associada à quantidade de enzimas usadas durante a hidrólise, superior a 1% em relação ao peso da matéria-prima, o que, devido ao alto custo das enzimas comerciais, limita o uso desta tecnologia (FREITAS, et al., 1996). O custo de produção de uma enzima depende de múltiplos fatores, como a quantidade e o processo de produção e recuperação, assim como o estado de pureza em que esta é vendida. Quanto mais purificada uma enzima estiver, mais cara ela será (SAID e

PIETRO, 2004). A utilização de enzimas não purificadas, ou seja, na forma de extrato enzimático bruto (EEB), pode ser uma alternativa economicamente viável quanto às aplicações de enzimas.

Os custos da aplicação de técnicas que utilizam enzimas ainda podem ser minimizados, reduzindo os custos da etapa de produção, com a utilização de substratos de baixo custo como os resíduos agroindustriais. O uso destes materiais agroindustriais deve-se ao fato de apresentarem várias características, tais como: são recursos renováveis; sua produção depende de outra atividade produtiva, muitas vezes, é um subproduto ou produto secundário; são produzidos em grande quantidade e, normalmente, constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (GUTIERREZ e TORRES, 1992).

A utilização de resíduos agroindustriais na produção de enzimas celulolíticas, aliada à aplicação das mesmas em forma de EEB, possibilita uma nova estratégia para a ampliação da aplicação da tecnologia em processos e produtos, como na extração de óleos essenciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Utilizar extratos enzimáticos brutos (EEB), provenientes de fermentação em estado sólido (FES) de resíduos agroindustriais de acerola (*Malpighia emarginata*) e de caju (*Anacardium occidentale L.*), na extração de óleo essencial das folhas do *Croton grewioides*, planta nativa da região do sudoeste da Bahia.

2.2 Objetivos específicos

- Produção de EEB através da variação do tempo fermentação, e atividade de água sobre a fermentação dos resíduos de acerola e de caju;
- Verificação das atividades enzimáticas específicas das diferentes enzimas celulolíticas produzidas por FES, a partir dos resíduos agroindustriais;
- Avaliar o rendimento da extração do óleo essencial do *Croton grewioides* e possível alteração química, com e sem a aplicação de extrato enzimático na etapa de pré-tratamento, em diferentes tempos de extração;
- Avaliar efeito quantitativo e qualitativo da extração de óleo essencial extraído com a aplicação de concentrações crescentes dos extratos enzimático bruto na etapa de pré-tratamento;
- Identificar e quantificar os principais constituintes aromáticos do óleo essencial obtidos com e sem a aplicação dos EEB;
- Comparar os constituintes aromáticos do óleo essencial da espécie vegetal com e sem presença dos extratos enzimáticos, obtido por fermentação dos resíduos por microrganismos;
- Estabelecer uma nova aplicação de extratos enzimáticos produzidos a partir de resíduos agroindustriais, diminuindo, assim, a ação poluidora dos resíduos gerados na produção e industrialização de alimentos e diminuindo o custo de produção das mesmas;
- Buscar alternativa para a utilização do EEB em substituição às enzimas purificadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resíduos agroindustriais

O setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade de resíduos. Dentre os resíduos sólidos de agroindústrias estão àqueles provenientes das indústrias processadoras de frutas e hortaliças (bagaços, tortas, refugo e restos). Estes são provenientes de cascas e sementes não aproveitados durante o processamento que, frequentemente, são os maiores componentes de vários frutos e, geralmente, não recebem a devida atenção. Nesse sentido, não ocorre o reaproveitamento ou a reciclagem desse material, possivelmente, em decorrência da falta de valor comercial (SILVA et al., 2005; SOONG e BARLOW, 2004; MATOS, 2005).

O aumento na produção desses resíduos vem provocando impactos ambientais, pois sua taxa de geração é muito maior que sua taxa de degradação; dessa forma, é cada vez mais premente, a necessidade de reduzir, reciclar, ou reaproveitar os resíduos gerados pelo homem, com o objetivo de recuperar matéria e energia, de preservar os recursos naturais e evitar a degradação do meio ambiente (STRAUS e MENEZES, 1993).

Esses resíduos gerados podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano. A utilização dos resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para fermentação, também ajuda na diminuição dos problemas de poluição. Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju etc (PANDEY et al., 1999; PANDEY, 2002).

3.1.1 Caju

O caju é uma fruta tropical, cuja produção, no Brasil, está concentrada no Nordeste, sendo de grande importância social e econômica para a região. A agroindústria do caju no Nordeste produz cerca de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pseudofruto, a parte carnosa e suculenta do caju, por ano (OLIVEIRA e ANDRADE, 2011). Apesar da potencialidade do pseudofruto como matéria-prima para diversos produtos, cerca de 90% da sua produção é descartada todos os anos, em função da sua alta perecibilidade e pelo fato do principal negócio do caju ser a comercialização da amêndoa (PAIVA et al., 2000). Entretanto, por serem ricas em vitamina C e compostos fenólicos, substâncias com alto potencial antioxidante têm despertado o interesse de diferentes grupos de pesquisa (COURI et al., 2003; MARX et al., 2003).

A agroindústria do caju no Nordeste brasileiro gera mão-de-obra para 1,5 milhões de pessoas (IBGE, 2011). O aproveitamento efetivo desta produção, através do processamento da polpa de caju, depende do desenvolvimento de novas tecnologias, como a utilização industrial do pedúnculo de caju direcionada para o mercado interno com a produção de sucos e doces (MAIA et al., 2001). Estas indústrias geram resíduos conhecidos popularmente como bagaço de caju, que, em geral, pequena parte é reaproveitada, como por exemplo, para enriquecimento da ração animal ou então são descartados (FERREIRA et al., 2004)

3.1.2 Acerola

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), pelo seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C e sua grande capacidade de aproveitamento industrial, tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (NOGUEIRA et al., 2002). O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo (CARVALHO, 2000). Existem plantios comerciais em praticamente todos os estados brasileiros (ALVES, 1996). Contudo, é na região nordestina, por suas condições de solo e clima, onde a acerola melhor se adapta (PAIVA et al., 1999).

A acerola é um fruto tropical de grande potencial econômico e nutricional, devido, principalmente, ao seu alto conteúdo de vitamina C que, associada com os carotenoides e antocianinas presentes, destacam este fruto no campo dos alimentos funcionais. Além disso, pode-se destacar, ainda, o seu fácil cultivo, o sabor e aroma agradáveis e a grande capacidade de aproveitamento industrial, que viabiliza a elaboração de vários produtos ao mesmo tempo em que promove a geração de empregos. No entanto, há carências quanto a dados de produção (áreas plantada e colhida) de acerola e comercialização do fruto in natura e de seus produtos (FREITAS et al., 2006).

Aliado ao aspecto nutricional e funcional do fruto, a acerola apresenta uma elevada produção e um forte potencial para industrialização, gerando resíduo agroindustrial que, geralmente, resulta em acúmulo de lixo e impacto ambiental (CAETANO et al, 2009).

3.2 Parede celular vegetal

De acordo com Capek et al. (1995), a parede celular de plantas compreende um complexo de polímeros tais como polissacarídeos, proteínas e lignina mutuamente conectados em uma estrutura rígida. A arquitetura é descrita como um esqueleto de celulose e hemiceluloses em ligações cruzadas, imersas em uma matriz de substâncias pécticas e reforçadas com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (Figura 1) (ALBERSHEIM et al., 1996).

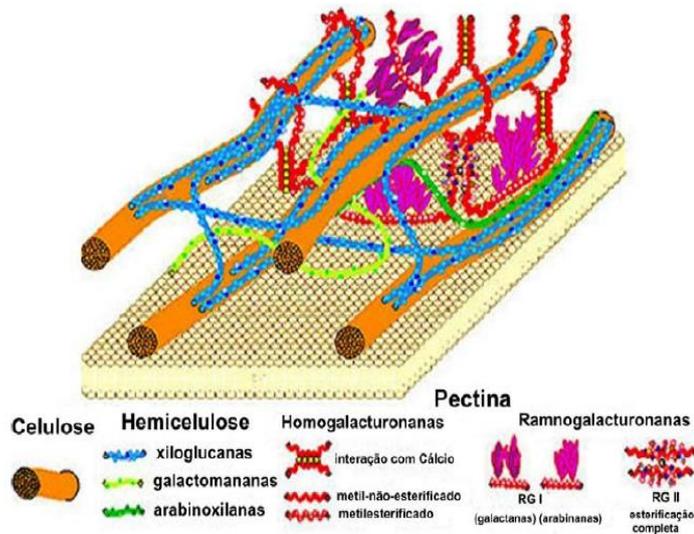


Figura 1: Substâncias presentes na parede celular vegetal. Fonte: (bmb.msu.edu).

As paredes primárias e secundárias e a lamela média são níveis estruturais encontrados em paredes celulares vegetais (Figura 2). A lamela média preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose. As camadas primárias e secundárias contêm quantidades variáveis de celuloses, hemiceluloses e pectinas. A parede secundária, embora não esteja presente em todas as células, fornece um suporte estrutural à célula, apresentando também lignina (PRADE *et al.*, 1999).

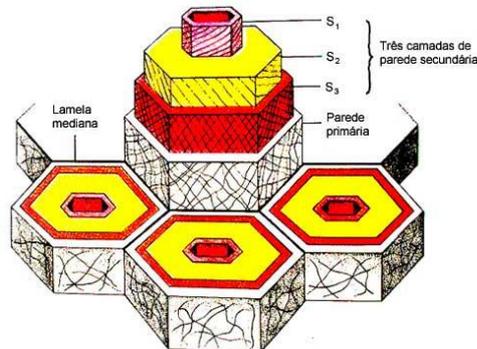


Figura 2: Estrutura da parede celular vegetal. Fonte: (RAVEN et al, 2001).

Os polímeros encontrados nas paredes celulares vegetais podem ser agrupados como celulose (glicana β -D-1,4), substâncias pécicas (galacturonanas e ramnogalacturonanas; arabinanas; galactanas e arabinogalactanas I), hemiceluloses (xilanas – incluindo arabinoxilanas e [4-O-metil] glicoronoxilanas – glicomananas e galactoglicomanas, xiloglucanas e glicanas β -D-1,3 e β -D-1,4), outros polissacarídeos (calose, arabinogalactanas II e glicoronomananas) e glicoproteínas. As arabinogalactanas do tipo I apresentam cadeias lineares β -D-1,4 galactana, enquanto as do tipo II apresentam cadeias internas altamente ramificadas com ligações intergalactose 1,3 e 1,6 (ASPINALL, 1980).

A celulose forma o material estrutural básico em todas as plantas superiores terrestres. A celulose é um polissacarídeo composto de unidades β -D-glicopiranosil, ligados por pontes glicosídicas β -1,4, formando um polímero linear. Cada unidade glicose é rotacionada 180° em relação a sua vizinha e o comprimento da cadeia linear pode ser de 2 a 10 mil resíduos de glicose. As regiões cristalinas da celulose são impermeáveis à água e são resistentes à degradação química e biológica. Devido às similaridades estruturais entre celulose, xilanas e glicomananas (todas glicanas com ligação β -1,4), pode haver a adsorção física destes polissacarídeos na superfície da celulose (SANTOS, 2008).

As xilanas são os polissacarídeos mais comuns entre as hemiceluloses, compostos de unidades D-xilopiranosil com ligações β -(1,4) e são componentes principalmente das paredes celulares secundárias, apresentando baixo grau de ramificação (ASPINALL, 1980).

3.3 Enzimas degradadoras da parede celular

Enzimas, coletivamente denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, celulasas, xilanasas e proteases. Estas enzimas podem apresentar ação tanto sinérgica como sequencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas superiores é constituída de até 90% de carboidratos e 10% de proteínas. Como descrito, as paredes celulares apresentam celulose, hemiceluloses, substâncias pécnicas, proteínas e lignina. Entretanto, a proporção e a distribuição destes componentes são variáveis de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002).

As celulasas destacaram-se como o mais importante grupo de enzimas necessárias para a degradação de paredes celulares de plantas vasculares (SAHA et al., 2006).

3.3.1 Celulasas

Nos ambientes naturais, a celulose é degradada exclusivamente por microrganismos, distribuídos entre o grupo das eubactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é realizada através da atuação de um complexo enzimático, as celulasas (Figura 3). Essas enzimas fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações α -1,4 entre as moléculas de glicose (HAICHAR et al., 2007). O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4- α -D-glucanglucanohidrolase), exoglucanases (exo 1,4- α -D-glucan-celobiohidrolase) e α -Dglucosidases ou celobiasas (JUHÁSZ et al., 2005).

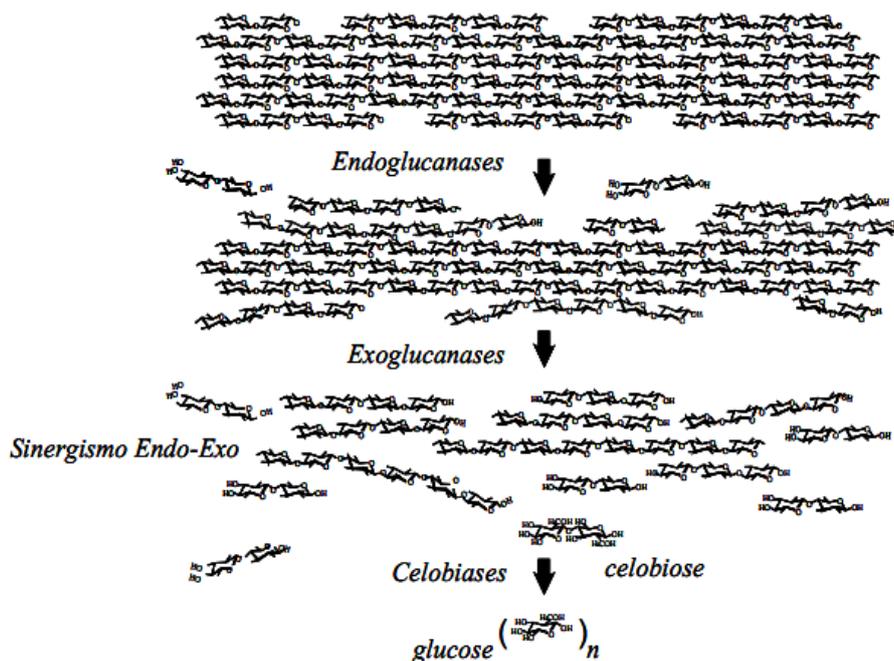


Figura 3: Mecanismo de ação das celulases através do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases ou celobiasas. Fonte: (MARTINS, 2005).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações α -1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO e TAN, 2002).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002). As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso, é de grande importância na atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as α -glucosidases (BON et al., 2008). As α -glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, a glicose, reduzindo, assim, a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002).

3.3.2 Hemicelulases

Devido à sua complexa estrutura, a degradação completa da xilana requer a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As endoxilanases β -1,4 (EC 3.2.1.8) clivam a estrutura principal da xilana, e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) clivam Xilose das extremidades não redutoras de oligômeros de xilose. A remoção dos grupos laterais é catalisada por α -

glicuronidasas (EC 3.2.1.134), α -L-arabinosidasas (EC 3.2.1.155) e acetilesterases (EC 3.1.1.72). No caso da manana, outro tipo de hemicelulose, a parte central da molécula é hidrolisada por β -1,4-endomananases, produzindo manobiose e oligossacarídeos, os quais são clivados por β -manosidasas para liberar manose (BRAITHWAITE et al., 1995).

3.4 Microrganismo utilizado

Aspergillus niger, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com UCSF (2000), citado por Prado (2002), o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 μ m e tornam-se rugosos ao atingir a maturação (Figura 4). O *A. niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000).

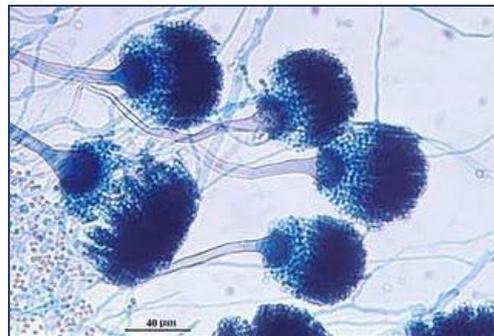


Figura 4: Esporos de *A. Níger*. Fonte: (<http://biomedicinaunic.blogspot.com/2010/09/fungos.html>)

Conforme Wainwright (1995), existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Pandey et al (1999) relataram que o *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase e protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação. Outros autores também descrevem produtos do *A. niger* como: α -amilase (BRUCHMANN, 1980; SMITH, 1991); amiloglucosidase ou glucoamilase (REED, 1975; BRUCHMANN, 1980; KNORR, 1987; WARD, 1989; SMITH, 1991; PANDEY e RADHAKRISHNAN, 1992; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996); pectinases, hemicelulases, poligalacturonase (WARD, 1989); ácido cítrico (WAINWRIGHT, 1995; PRADO, 2002) pectinases, proteases, celulases, invertase, lactase, hemicelulase, glucose oxidase, catalase, ácido glucônico (SMITH, 1991; FELLOWS, 1994; WAINWRIGHT, 1995); pectina esterase, pectina liase (SMITH, 1991).

3.5 Produção de enzimas por FES

Estudos tem sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies de microrganismos através de métodos de engenharia genética (JORGENSEN et al., 2005; KANG et al., 2004).

A FES é um processo de cultivo de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, em substratos sólidos umedecidos, mas com ausência de água livre entre as partículas do material sólido. Este tipo de material é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial, no entanto, os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados - 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL, 1992).

O ambiente fornecido ao microrganismo neste sistema é bem diferente daquele fornecido por outras técnicas de fermentação, como por exemplo, a fermentação submersa (FS), que ocorre em meio líquido. A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de algumas enzimas específicas, que não seriam produzidas pelo mesmo organismo na fermentação submersa. Em alguns casos, onde as enzimas podem ser produzidas por FES ou FS, a FES pode apresentar algumas vantagens como maior produtividade volumétrica e maior rendimento (MOO-YOUNG *et al.*, 1983) (MITCHELL e LONSANE 1992) (SATO e SUDO, 1999), quando comparados com o processo de fermentação submersa.

Por outro lado, as enzimas de interesse biotecnológico têm sido tradicionalmente produzidas por fermentação submersa (FS), devido à maior facilidade de controle e de operação do processo. Lonsane e Ghildyal (1992), em uma extensiva revisão sobre a produção de enzimas por FES, relatam a produção em escala industrial de alguns tipos de enzima, entre as quais pectinases, α -amilases e glucoamilases. Já os relatos de produção em escala de laboratório são muitos e incluem além das já citadas, as proteases, celulasas, lipases, catalases e xilanases.

Além disso, este método de fermentação apresenta outras vantagens sobre a fermentação submersa, tais como a obtenção de extratos concentrados de enzimas, facilitando o processo de purificação, e a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, diminuindo os custos de produção relacionados ao meio de cultivo (MITCHELL et al., 2003; MITCHELL et al., 2000; LONSANE e GHILDYAL, 1992; LONSANE e KRIAHNAIAH, 1992).

3.6 Óleos essenciais

O termo óleo essencial é utilizado para designar os líquidos oleosos voláteis dotados de forte aroma, extraídos principalmente de plantas, geralmente, por arraste a vapor, podendo também ser empregados na extração de outros processos físicos. A ISO (International Standardization Organization) define óleos essenciais, ou óleos voláteis, como produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água (SIMÕES e SPITZER, 2000).

Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços (SIMÕES et al., 2003).

Os óleos essenciais e os extratos das plantas possuem um interesse crescente para a indústria e para a pesquisa científica devido às atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiviral e antiparasitária, o que os torna úteis como um aditivo natural para as indústrias de alimentos, de fármacos e de cosméticos (BAKKALI et al., 2008; KAMEL et al., 2007; MABBERLEY et al., 1997).

A aplicação destes óleos essenciais pelo homem vem de tempos Antes de Cristo. Civilizações japonesas, chinesas e egípcias usavam como incenso para mortos, embalsamamento e como matéria prima para perfumes (CINIGLIO, 1993). Os óleos essenciais, sejam de origem artificial ou natural, possuem aplicação em diversas áreas, sendo constituinte primário ou secundário da indústria de perfumes, medicamentos, indústria química, de alimentos, como combustíveis, conservantes, inseticida, entre outros (ROMANI, 1972).

Segundo Bizzo et al. (2009), o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais juntamente com a Índia, China e Indonésia, apontando os quatro grandes produtores mundiais. Os óleos essenciais de plantas aromáticas são produtos de larga aplicação nas indústrias de química fina, perfumaria e de medicamentos. Sua principal característica é o alto valor agregado que possuem.

3.7 Gênero *Croton*

No Brasil são registradas aproximadamente 300 espécies de *Croton* que crescem em matas, campos e cerrados de Norte a Sul do país (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). A maioria das espécies deste gênero produtoras de óleos essenciais é encontrada no Nordeste, na

região de caatinga, onde são popularmente conhecidas como “velame” ou “marmeleiro” e são usadas para os mais diversos propósitos, principalmente, medicinais (SILVA et al., 2008; DOURADO e SILVEIRA, 2005).

A região de Jequié, no Sudoeste da Bahia, situa-se na zona limítrofe entre a Caatinga e a Zona da Mata. Cercada de montanhas, a cidade tem um clima quente durante quase todo o ano. Nesta região ocorre uma grande diversidade em plantas do gênero *Croton*, endêmicas, e produtoras de óleos essenciais, incluindo do *Croton grewioides* (Figura 5), que foi utilizado neste estudo.



Figura 5: *Croton grewioides*. Fonte: (O autor).

Nesta região, o gênero *Croton*, devido à alta incidência e distribuição de espécies, possui, sem dúvida, o maior número de plantas produtoras de óleos essenciais, entretanto, até o momento, poucas espécies tiveram os seus constituintes voláteis estudados (MORENO *et al.*, 2009), dentre essas, destacam-se: *C. sonderianus* (DOURADO e SILVEIRA, 2005), *C. zenhtneri* (COSTA et al., 2008; FONTENELLE et al., 2008), *C. nepetaefolius*, *C. argyrophyloides* (FONTENELLE et al., 2008), *C. regelianus* (TORRES et al., 2008), *C. grewioides* (SILVA et al., 2008) e *C. heterocalyx* (MORENO et al., 2009). Dentre as espécies mencionadas, *C. grewioides* e *C. zenhtneri* apresentaram óleos essenciais constituídos principalmente por fenilpropanoides, enquanto as demais apresentaram óleos ricos em terpenos.

Fenilpropanoides são amplamente usados na indústria de alimentos como material de partida para a síntese de vários produtos com aplicações como conservantes e flavorizantes de alimentos (XU et al., 2007).

Apesar da ampla ocorrência de espécies do gênero *Croton* no semiárido baiano, e da utilização de várias destas espécies para fins medicinais, não existe qualquer relato na literatura sobre a utilização destes óleos como aromatizantes, nem mesmo daquelas espécies, cujo óleo essencial é rico em fenilpropanoides, como por exemplo, *C. grewioides* e *C. zenhtneri*, cujas

folhas tem aroma característico de uma mistura de erva-doce e cravo-da-Índia. Entretanto, esse aroma mostra-se variável entre exemplares desta planta, coletados em diferentes localidades do Nordeste (COSTA et al., 2008). Isso se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais (CRAVEIRO et al., 1978).

Muitas vezes, esta constituição química pode variar significativamente em uma mesma espécie, em função de uma série de fatores, tais como condições geográficas, climáticas e sazonais, horário de coleta, técnica de extração e estocagem do material (LAHLOU, 2004).

3.7.1 Metilchavicol

O metilchavicol, também chamado de estragol, é um ingrediente natural aromático presente em diversos vegetais. É formado por um chavicol de metila e um éter terpenoide (Figura 6), relativamente não tóxico, volátil, é um dos principais componentes do óleo essencial de muitas plantas, como *Pimpinella anisum* (erva-doce), *Ravensaraanisata* (ravensara), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Foeniculum vulgare* (funcho), *Artemisia dracunculus* (estragão), *Croton zehntneri* ("canela da Cunha", no Nordeste do Brasil) e *Croton grewoides* (velame ou marmeleiro), que são muito utilizadas na medicina popular e na aromaterapia (COELHO et al., 2003) (CRAVEIRO 1981; SILVA et al., 2008).

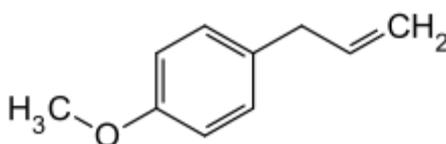


Figura 6: Estrutura química do metilchavicol. Fonte: (VICENZI et al., 2000).

Sua mais ampla aplicação é na indústria de alimentos como agente flavorizante, como por exemplo, em bebidas alcoólicas, peixe enlatado, conservas, gorduras e óleos (Conselho da Europa, 2001).

3.4 Métodos físicos e químicos de extração de óleo essencial

A hidrodestilação de Clevenger (Figura 7) é um processo simples e amplamente utilizado para a extração de óleos essenciais de matrizes vegetais em escala laboratorial. Essa técnica de extração é baseada na imersão em água da matriz a ser tratada e o aquecimento, até a fervura, provocando a formação de vapor, o qual arrasta os compostos mais voláteis; após condensação, estes compostos separam-se da água por decantação (DAMIANI, 2006). Outros processos de extração também são muito empregados, que variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade de utilização do mesmo.

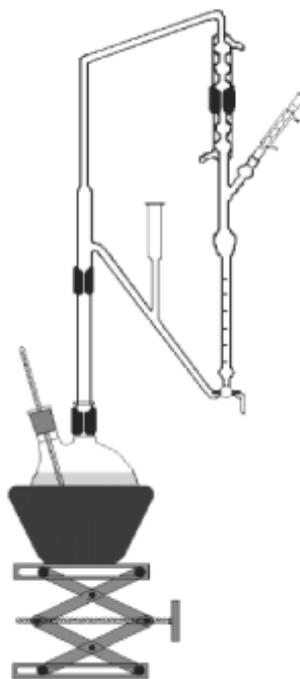


Figura 7: Extrator de Clevenger modificado. Fonte: (SILVA et al., 2003).

Dentre os métodos de extração mais utilizados destacam-se: a enfloração, que é empregado apenas por indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial, como na extração de óleo essencial de pétalas de flores; a prensagem, que é empregado na extração de óleo essencial de frutos cítricos (BRUNETON, 1991); a extração com solventes orgânicos, na qual a extração se dá, preferencialmente, com solventes orgânicos (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros componentes lipolíticos, além do óleo essencial, por isso, os produtos obtidos raramente possuem valor comercial, além de ser praticamente impossível remover todo o solvente residual sem um grande dispêndio de energia e custos (BRUNETON, 1991; MAUL et al., 1996); a extração por fluido supercrítico permite recuperar de modo eficiente não somente os aromas de óleos essenciais como vários outros tipos, sendo um dos principais métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais (SIMÕES, 2000).

As principais desvantagens da extração pelo método de Clevenger residem no fato de que a hidrodestilação requer uma quantidade relativamente grande de amostra e de que alguns componentes voláteis são perdidos devido à alta temperatura de extração (BELO, 2009).

Porém, esses efeitos negativos podem ser minimizados utilizando alternativas nas quais reduza o tempo de extração e aumente o rendimento do óleo extraído. Para se realizar a extração do óleo, que se encontra nos vacúolos intracelulares, há necessidade de se romper paredes e membranas celulares. Os tratamentos mecânico e/ou térmico causam a ruptura das estruturas celulares, porém, não são suficientes, já que parte do óleo permanece na célula, sem ser extraído. Através da hidrólise, rompe-se a parede celular e há maior liberação de óleo,

ocorrendo também o rompimento do complexo molecular lipoproteína e lipopolissacarídeo em moléculas simples, liberando óleo extra que, por outro método, não seria extraído (SHANKAR, 1997).

3.8 Utilização de enzimas na extração de óleos

O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente na última década e foi aplicado para todas as oleaginosas de interesse comercial, como mostrado nos trabalhos de revisão publicados por Dominguez et al. (1994) e por Freitas et al. (1996). A aplicação dessa tecnologia em escala comercial está restrita, entretanto, à obtenção de óleo de oliva. Este óleo tem longa tradição na alimentação humana e a aplicação de enzimas em escala industrial representou uma contribuição da tecnologia para aumentar a quantidade e estabilidade do óleo extra-virgem, obtido na primeira prensagem do fruto (CHRISTENSEN, 1991).

A aplicação da tecnologia enzimática na indústria de óleos pode ser feita de duas formas: extração aquosa e extração combinada.

Na extração aquosa, a matéria-prima é submetida a um pré-processamento que, em geral, consiste na diluição e trituração a quente da polpa para inativação das enzimas naturais e preparo de uma emulsão homogênea. A seguir, a mistura é transferida para um reator com controle de temperatura e agitação. A enzima é adicionada nesta etapa e o substrato é mantido sob incubação. A diluição, o tempo e a concentração do preparado enzimático são parâmetros relevantes e devem ser otimizados durante o desenvolvimento do processo. A temperatura deve ser fixada em função da atividade máxima da enzima, de preferência no pH natural da emulsão (FREITAS, et al., 1996).

O alto rendimento alcançado até então, com a maioria das oleaginosas, está associado à aplicação de uma quantidade significativa de enzima, da ordem de 1%, inviabilizando seu uso em escala industrial, devido ao alto preço das enzimas comerciais (SANTOS, 2008).

Em estudo realizado por Santos (2008), foi utilizada a extração combinada utilizando um complexo de enzimas precipitadas na extração de óleos essenciais de interesse farmacêutico, apresentando resultados satisfatórios, aumentando em média 60% o rendimento da extração, permitindo, assim, futuros estudos para sua implantação em escala industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 8 descreve, de maneira geral, as etapas realizadas neste trabalho:

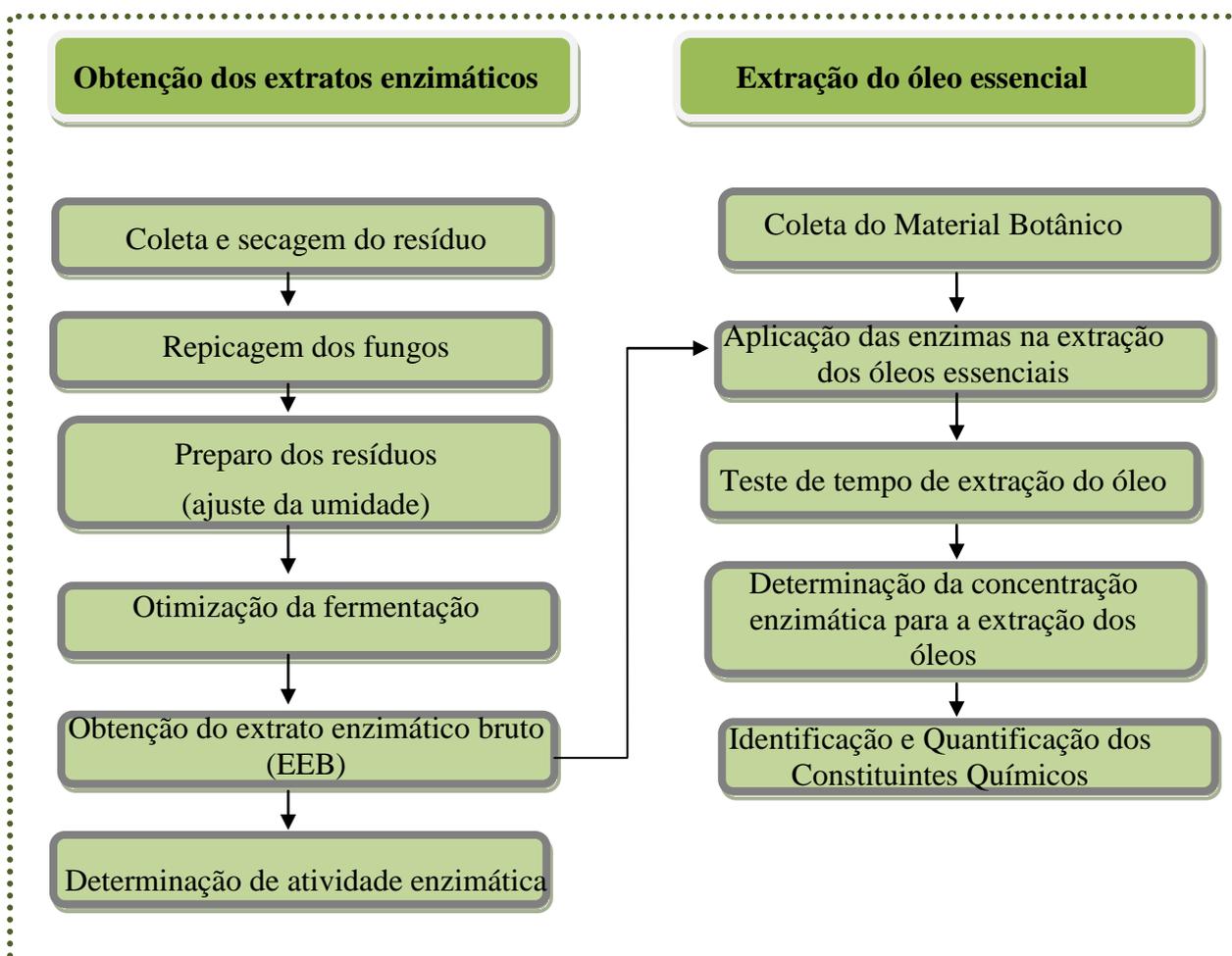


Figura 8: Fluxograma das etapas realizadas durante a parte experimental.

4.1 Otimização do processo de fermentação em estado sólido para obtenção do extrato enzimático bruto

4.1.1 Obtenção e preparação do resíduo

Os resíduos de acerola (*Malpighia emarginata D.C.*) e de caju (*Anacardium occidentale L.*) (Figura 9) foram cedidos por uma agroindústria de beneficiamento de polpa de frutas, localizada na região sudoeste da Bahia; esse material foi seco em estufa de secagem e esterilização SOLAB a 70°C, por 24 horas. Posteriormente, o resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Wiley (ACB LABOR) com granulometria 20 mesh.



Figura 9: Resíduo de acerola e caju, secos a 70°C, por 24 horas, e triturados, granulometria final de 20 mesh. Fonte: (O autor).

4.1.2 Obtenção do Inóculo

4.1.2.1 Preparo e obtenção de suspensão de esporos

O microrganismo (*Aspergillus niger*) foi obtido através de uma cepa pertencente ao Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA da UESB, campus de Itapetinga.

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação das culturas esporuladas de *Aspergillus niger* em PDA (Potato Dextrose Agar), HIMEDIA acidificado (Figura 10), propagadas a 30 °C, por 7 dias, em estufa bacteriológica (modelo SL 101 SOLAB). Após a propagação, os esporos foram recuperados em solução de água destilada estéril contendo Tween 80 (VETEC) a 2%. O número de esporos em suspensão foi quantificado em câmara de Neubauer duplamente espelhada com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000), conforme o método de Freire (1996), descrito por Amorim (2011).

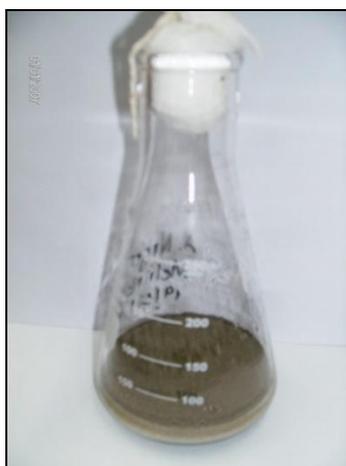


Figura 10: *Aspergillus niger* propagados em PDA por 7 dias a 30 °C. Fonte: (O autor).

4.1.3 Obtenção do Extrato enzimático bruto

4.1.3.1 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas empregando erlenmeyers de 125 ml como biorreatores, contendo 10 g de resíduo (Figura 11), previamente autoclavados a 121°C, por 15 minutos, em autoclave Pismapec. Após resfriamento, a cada erlenmeyer foi adicionada quantidades crescentes de água até a padronização de sua consistência, de forma que os substratos sólidos ficassem umedecidos, mas com ausência de água livre entre as partículas do material sólido.

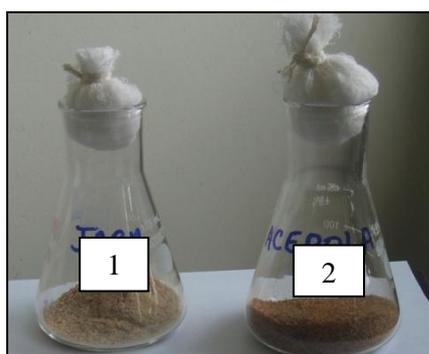


Figura 11: Biorreatores contendo resíduos de caju (1) e acerola (2). (Fonte: O autor).

Em virtude das características particulares de cada substrato, como natureza granular ou fibrosa, que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade, composição química, estrutura, entre outras, foram ajustados em faixas diferentes de umidade em cada resíduo, obtendo, assim, valores diferentes de atividade de água entre os resíduos, sendo a umidade ajustada em 30, 40 e 50% para o resíduo de caju (Tabela 1), que equivale a atividade de água (a_w) de 0,927, 0,938 e 0,960, respectivamente, e foi ajustada a umidade em 50, 60 e 70% para o resíduo de acerola (Tabela 2), que equivale a atividade de água de 0,967, 0,98 e 0,99%, respectivamente. As atividades de água foram determinadas por meio de um higrômetro (Aqualab).

Tabela 1: Umidade e a_w dos meios esterilizados, obtidos para cada volume de água, adicionado a 10 g de resíduo de acerola.

Umidade (%)	Resíduo de acerola	
	Volume de água adicionado a 10g de resíduo (mL)	a_w
50%	9,42	0,967
60%	14,42	0,981
70%	21,98	0,990

Tabela 2: Umidade e aw do resíduo de caju esterilizados, obtidos para cada volume de água, adicionado a 10 g de resíduo de caju.

Umidade (%)	Resíduo de caju	
	Volume de água adicionado a 10g de resíduo (mL)	
		aw
30%	4,16	0,927
40%	6,48	0,938
50%	9,72	0,969

Posteriormente à umidificação, foi adicionada a cada erlenmeyer uma suspensão contendo 10^7 esporos por grama de substrato seco. Os cultivos foram realizados a 30°C , sendo interrompidos a cada 24 horas para análise da atividade enzimática até atingir o tempo de 96 horas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

4.1.3.2 Extração do fermentado

Para a obtenção do EEB produzido, a cada erlenmeyer foi adicionado 50 mL de solução tampão de citrato de sódio (VETEC) pH 4,8 a 50 mM. Essa suspensão foi agitada com auxílio de um bastão de vidro e o extrato enzimático foi extraído através da prensagem manual. A solução obtida foi centrifugada a 1000 rpm por 10 min em centrífuga (CETRIBIO modelo 80-2B) para remoção de sólidos mais finos, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (SANTOS et al., 2011(a)).

4.1.4 Análise da Atividade Enzimática

4.1.4.1 Atividade deCMCase (endogluconase)

A atividade da enzima CMCase (endogluconase) foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação da carboximetilcelulose ou “CMC” (CROMOLINE) a 2% p/v, diluído previamente em solução de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) formado por: hidróxido de sódio (Fmaia); ácido L(+) tartarico P.A. (VETEC); ácido 3,5 Dinitrosalicílico (VETEC) (MILLER, 1959).

Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 50 mM, adicionado de 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de CMC (2% p/v). Em outro tubo, foi efetuado o controle da reação, sendo adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O branco da

análise continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em estufa (QUIMIS) a 50°C, durante 10 minutos. A interrupção da reação foi realizada com a adição de 0,5 mL DNS, seguida pela submersão dos tubos em água fervente por 5 minutos e posterior adição de 6,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto.

4.1.4.2 Atividade de FPase (celulase total)

Para a dosagem de celulases totais, utilizou-se uma tira de papel filtro (1x6 cm no1 Whatman) submersa em 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático dentro de tubos de ensaio. No controle da reação, foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto o controle do substrato foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro. As amostras foram incubadas em estufa a 50°C por 1 hora. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS. Todos os tubos foram submetidos a água fervente por 5 minutos, logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorbância a 540 nm, realizada em espectrofotômetro BEL PHOTONICS 2000 UV (GHOSE, 1987). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto.

4.1.4.3 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4-β-xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 1,0 mL de extrato enzimático, 1,0 mL de solução de 1% de xilana (Sigma) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0 em tubo de ensaio, incubada 50° C, por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. No controle da reação, foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 1,0 mL de extrato enzimático, enquanto o controle do substrato foi adicionado 1,0 mL de solução de 1% de xilana, também incubados a mesma temperatura pelo mesmo período de tempo. Após o período de incubação, a reação foi interrompida adicionando-se 2,0 mL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos, logo, o volume dos tubos foi completado até 10 mL com água destilada. Os tubos contendo as reações foram lidos em espectrofotômetro em 550nm. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto.

4.2 Extração de óleo essencial

4.2.1 Preparo dos Substratos

Os substratos utilizados neste projeto foram das folhas da espécie vegetal do Gênero *Croton grewioide*, que ocorrem no semiárido baiano, na região do sudoeste da Bahia, dos quais foram extraídos os óleos essenciais.

4.2.1.1 Coleta do Material Botânico para Herborização e Identificação da Espécie

A planta em estudo foi identificada pelo Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela botânica Daniela Carneiro, especialista do gênero. As exsicatas foram depositadas no acervo do Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB), localizado no Campus de Jequié-BA.

4.2.1.2 Coleta do Material Vegetal para Obtenção dos Óleos Essenciais

Foram coletadas as partes aéreas (galhos e folhas) do *Croton grewioide*, no distrito do município de Jequié-BA, Posto Dantas. Após a coleta do material vegetal, estas foram levadas imediatamente ao laboratório de Produtos Naturais, onde foram retiradas as partes de interesse (folhas), sendo imediatamente colocadas em sacos de polietileno. Cada saco continha cerca de 300g de folha e foram armazenadas em *Freezer*. O material foi posteriormente utilizado no estudo de extração de óleo essencial através do método de hidrodestilação, utilizando o aparelho do tipo Clevenger.

4.2.2 Aplicação das enzimas na extração dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais, foi utilizada a técnica da hidrodestilação com um aparelho de Clevenger. Antes da extração, 36 gramas do material vegetal foram submetidas a um pré-tratamento com o EEB, contendo as enzimas produzidas em condições determinadas, após estabelecimento dos parâmetros estudados. O tratamento com as enzimas se deu por uma hora, a uma temperatura de 50°C. Em paralelo, foi realizado o teste controle, no qual a mesma quantidade de material vegetal foi submetida ao tratamento nas mesmas condições, porém, apenas com tampão citrato, de acordo com a metodologia descrita por Sousa (2008). Após o pré-tratamento, os balões foram acoplados ao aparelho de Clevenger, realizando a extração do óleo essencial.

4.2.3 Avaliação do tempo de extração de óleo essencial

Foi testada a aplicação dos EEBs na etapa de pré-tratamento testando tempos de extração de 1, 2, 3 e 4 horas, no intuito de comparar o rendimento obtido com e sem os extratos enzimáticos ao longo do tempo de extração e verificar sua influencia na composição química do óleo extraído. Os testes foram realizados conforme descrito no item anterior, com quantidades iguais de EEB de caju e acerola, 350 mL. Foram recolhidas, com ajuda de hexano, alíquotas do óleo essencial extraído a cada hora, sendo este procedimento realizado em triplicata. O óleo obtido neste processo, após evaporação do solvente, foi seco com 0,2 g sulfato de sódio anidro, pesado e armazenado em *freezer* para as análises e procedimentos posteriores. A variação quantitativa foi verificada pelas massas obtidas através da pesagem dos óleos extraídos após o pré-tratamento com e sem EEB, enquanto que a qualitativa foi verificada através de análises cromatográficas.

4.2.4 Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos

Foram testadas quantidades crescentes de EEB dos dois resíduos, adicionados na etapa de pré-tratamento. Analisou-se a variação da massa e constituição química de óleo extraído em relação ao aumento da concentração enzimática. Os testes foram realizados de acordo com o item 4.2.2. Após a hidrodestilação, o óleo foi recolhido, seco com 0,2 g sulfato de sódio anidro, pesado e armazenado em *freezer* para as análises e procedimentos posteriores. A variação quantitativa foi verificada também pelas massas obtidas através da pesagem dos óleos extraídos após o pré-tratamento com e sem EEB, enquanto que a qualitativa também foi verificada através de análises cromatográficas.

4.2.5 Análises cromatográficas

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa em um CG-FID (cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama) Varian, modelo 3800 para identificação e análise de possível alteração dos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais. As condições cromatográficas foram: Coluna DB5 (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m); Temperatura inicial de 50°C; Tempo inicial de 2 minutos; Tempo final de 70 minutos; Temperatura final de 240°C; Temperatura do injetor de 240°C; Temperatura do detector de 280°C; Gás de arraste nitrogênio; Programação de temperatura: 50°C até 280°C com rampa de aquecimento de 20°C/min. Modo de injeção com divisão de fluxo de 1:50.

Para serem injetadas no CG, todas as amostras de óleo foram diluídas em diclorometano, para serem injetadas na coluna, em uma proporção de 10 μ L de óleo para 1 mL de (1:100) diclorometano. Além de diclorometano e óleo, as amostras injetadas também

continham uma terceira substância que foi utilizada como padrão interno, o anizol, em concentração idêntica ao do óleo (1 μ L). Através da razão entre o óleo e o anizol, foi possível saber se houve alteração quantitativa dos constituintes do óleo em função dos tratamentos e a variação na concentração destes constituintes.

4.2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico Statistical Analysis System® versão 9.0, procedimentos GLM e REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado o teste F para as Análises de Variância (ANOVA) a 5% de probabilidade.

Aos dados experimentais foram ajustados modelos lineares, observando o coeficiente de determinação e a concordância com o fenômeno estudado. Os modelos foram avaliados e os respectivos gráficos construídos, utilizando o software SigmaPlot® 11.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de fermentação em estado sólido

Durante o processo de FES, o fungo degrada a biomassa vegetal através da produção de enzimas extracelulares (SANTOS et al., 2011 (b)). Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados neste processo não só como fonte de carbono como também como suporte sólido (PANDEY et al., 2000). O microrganismo *Aspergillus Níger*, utilizado neste trabalho para o cultivo dos resíduos de caju e acerola, produziu quantidades diferentes CMCase, FPase e Xilanase para cada resíduo, durante os ensaios, com base em três repetições experimentais.

Na fermentação, utilizando o resíduo de caju e acerola como substrato, o *Aspergillus niger* apresentou pico de atividade da enzima CMCase em 48 horas e 50% de umidade para os dois resíduos, apresentando um pico de atividade enzimática de 6,79 U/mL para o resíduo de caju (Figura 12), e de 11,7 U/mL para o resíduo de acerola (Figura 13).

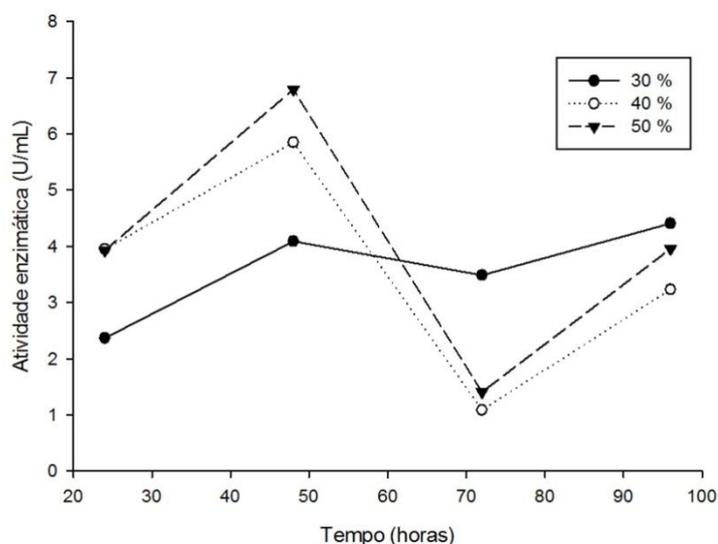


Figura 121: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de endoglucanase (CMCase) por *Aspergillus niger*.

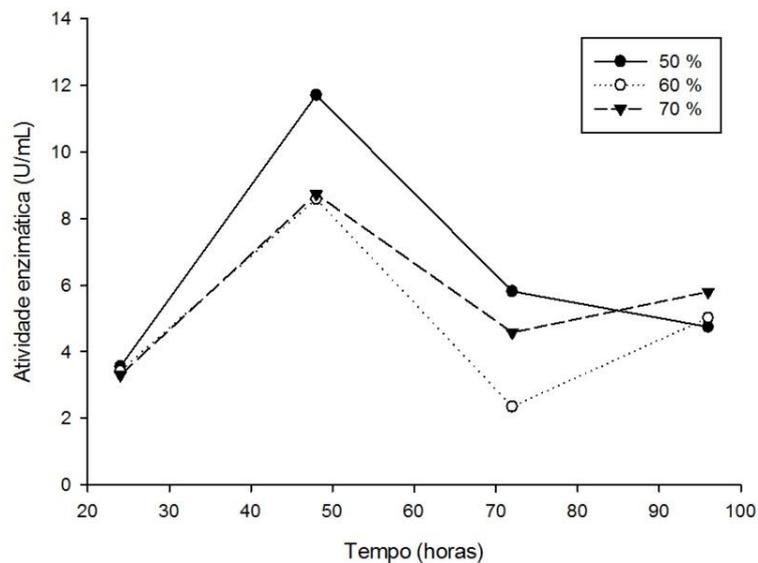


Figura 13: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre produção de endoglucanase (CMCase) por *Aspergillus niger*.

Com estes resultados, foi possível verificar que os substratos de baixo custo testados favoreceram a produção de endoglucanases, assim como demonstrado no estudo realizado por Ferreira et al. (2011), que produziu estas enzimas também por FES com *Aspergillus niger* a partir de resíduo de cajá, obtendo valores máximos de atividade enzimática de 3 U/g em 72 horas com 50% de umidade, e por Santos et al. (2011(c)), que também produziu estas enzimas utilizando o mesmo método de fermentação e mesmo fungo, cultivado em resíduo de manga e obteve pico de 8,7 U/g em 72 horas com 0,92 de atividade de água. Santos et al. (2011(b)) utilizou outro tipo de substrato de baixo custo, a palma miúda (*Nopalea cochenillifera*), também sem a adição de qualquer substância enriquecedora, cultivada por *Rhizopus sp.*, e obteve na produção de CMCase (endoglucanase), de 5,7 U/mL a 0,949 de atividade de água em 96 horas de fermentação. Pode-se observar também que o tempo de fermentação para obtenção do pico de produção de enzimas deste trabalho foi inferior ao encontrado na literatura.

Outros trabalhos são citados na literatura, mostrando a produção de endoglucanases, utilizando variados substratos. Utilizando ainda resíduos agroindustriais como substrato, porém acrescidos de fontes de nutrientes, foram encontrados maior produção de CMCase de 552,0 U/L, em farelo de trigo, e de 327,7 U/L, em bagaço de cana de açúcar, ambas quando cultivada por *Streptomyces sp.* M23 acrescida de milhocina como fonte de nitrogênio (FRANCO, 2009). Outra estirpe de *Streptomyces*, a T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, ureia e peptona (JANG e CHEN, 2003), porém, a estirpe era transformante e os nutrientes utilizados não eram substratos de baixo custo. *Streptomyces sp.* isolada de solo do Canadá foi cultivada em uma solução de sais de Mandel contendo peptona, tween 80 em 1,0%

de celulose cristalina e produziu 11,8 U/mL de CMCase (ALANI et al., 2008), enquanto *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico (GEORGE et al., 2001), quando cultivado em meio contendo celulose de papel em pó, extrato de levedura e Tween 80, apresentou um pico de atividade de 23 U/mL, enquanto que, quando cultivada em farelo de trigo, a atividade foi de 8,5 U/mL.

A atividade da FPase também constitui um fator importante na avaliação para a escolha da melhor condição de produção do EEB, quando esta está presente, a celulase vai apresentar uma atividade de endo e outra de exo celulase e, portanto, é capaz de atuar tanto nas regiões cristalinas como nas regiões amorfas da celulose. É bem sabido que a maioria dos microrganismos celulolíticos apresenta atividade de endoglucanase (BHAT e BHAT, 1997), mas nem sempre apresentam de exo e, por conseguinte, a atividade de FPase é um diferencial (FRANCO, 2009). Através da FES, obteve-se neste trabalho valores de atividade desta enzima que variaram entre 0,66 a 4,09 U/mL para o cultivo em resíduo de caju e de 0,56 a 4,8 para o cultivo em resíduo de acerola.

As maiores atividades de FPase, obtidas por extração da enzima do resíduo sólido fermentado de caju e acerola, verificadas neste experimento, foram de 4,09 (Figura 14) e 4,80 U/mL (Figura 15), respectivamente, no tempo de 48 horas, e umidade de 50% (atividade de água de 0,969) para o resíduo de caju, no tempo de 72 horas, e umidade de 60% (atividade de água de 0,981) para o resíduo de acerola. Valores próximos ao encontrado em cultivo de mesmo fungo, utilizando resíduo de manga, foi obtido pico de atividade de 3,36 U/g em um tempo maior, após 98 horas de fermentação, em aproximadamente 0,92 de atividade de água (SANTOS et al., 2011(c)). Em outro trabalho realizado por Santos et al. (2011(b)), utilizando a palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) como substrato na produção, a FPase (endoglucanase + exoglucanase) por *Risopus* sp. foi obtido valor máximo de atividade de 8,7 U/mL a 0,993 de atividade de água em 72 horas de fermentação.

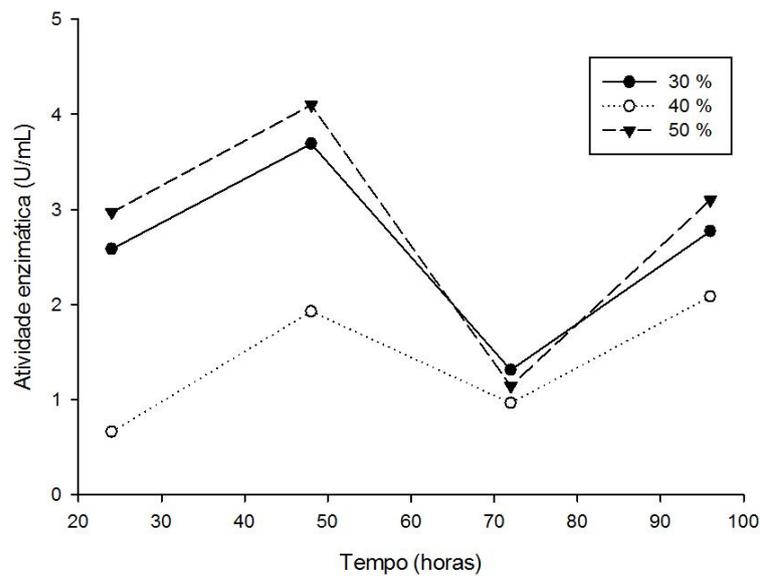


Figura 14: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de endo e exoglucanase (FPase) por *Aspergillus niger*.

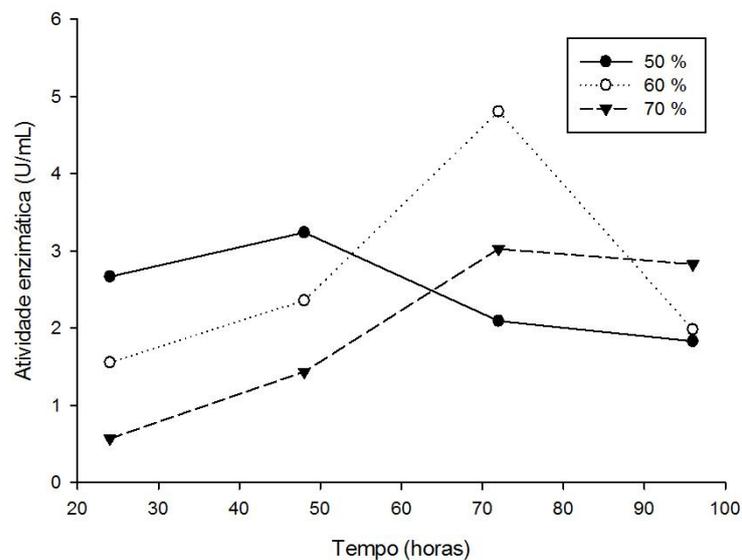


Figura 15: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre a produção de endo e exoglucanase (FPase) por *Aspergillus niger*.

Em trabalhos envolvendo a quantificação da atividade de FPase por fungos, observam-se valores mais baixos de atividade enzimática. Jorgensen e Olsson (2006) obtiveram para *Penicillium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido à explosão a vapor, valores de 0,59 U/mL de FPase. *Trichoderma viride* NCIM 1051 em 1,0% de bagaço de cana tratado com

NaOH resultou em uma atividade FPásica de 0,4 U/mL (ADSUL et al., 2004). *Aspergillus niger* IZ9 em meio contendo bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de sódio (NaOH) apresentou pico de atividade de 0,2 U/mL (AGUIAR e MENEZES, 2000). A estirpe *Streptomyces* sp. M23 forneceu atividade de 61,2 U/L em meio contendo farelo de trigo, e de 37,8 U/L quando cultivada em meio contendo bagaço de cana, acrescidos de milhocina (FRANCO, 2009). Neste último trabalho, o tempo de incubação foi de 3 a 4 dias, enquanto em todos os outros casos acima descritos os tempos de incubação variaram de 7 a 10 dias, bem maiores que aqueles utilizados em nosso trabalho.

A produção máxima de Xilanase foi observada em 48 horas de crescimento do microrganismo para os dois resíduos, umidade de 40 % (atividade de água de 0,939) para FES do resíduo de caju (Figuras 16) e de 60% (atividade de água de 0,981) para o resíduo de acerola (Figura 17), atingindo os picos de 4,04 e 4,06 U/ml para os respectivos resíduos.

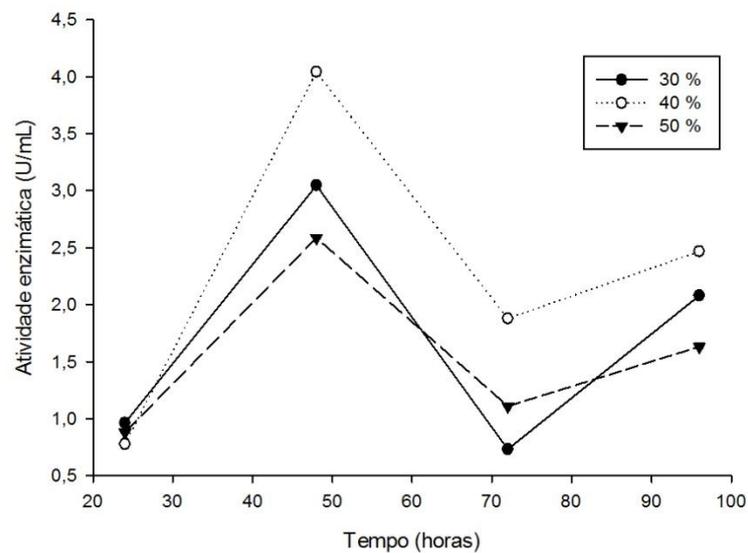


Figura 16: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de caju sobre a produção de xilanase por *Aspergillus niger*.

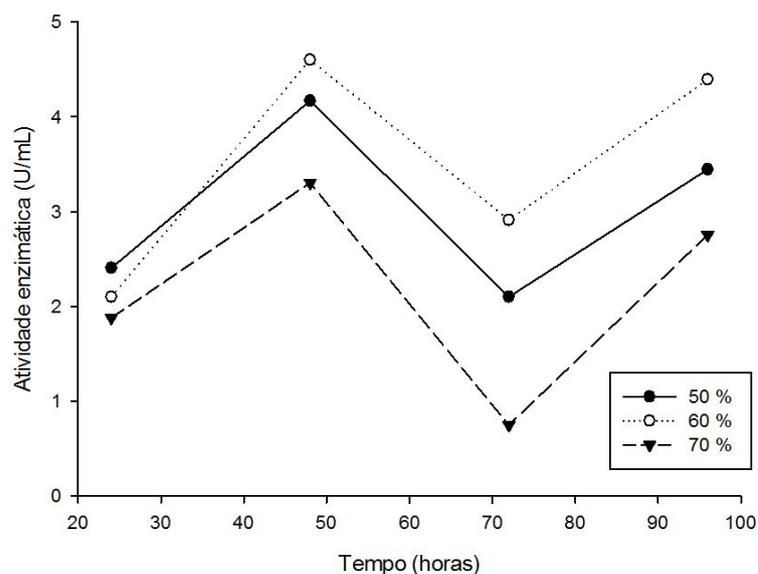


Figura 17: Efeito do tempo e umidade de fermentação do resíduo de acerola sobre a produção de xilanase por *Aspergillus niger*.

As xilanases possuem um importante papel na hidrólise da celulose por hidrolisar xilana, polissacarídeo formado por unidades monoméricas de xilose, que é um dos principais constituintes da hemicelulose (HECK et al., 2002; DUMITRIU, 2005).

Os resultados encontrados para xilanase ficaram abaixo aos obtidos por Qinnghe et al. (2004), que obtiveram 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia, utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida, sob condições otimizadas, utilizando farelo de trigo; valores superiores aos encontrados neste trabalho.

LU et al. (2003) observou a produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus* em FES, em escala piloto, utilizando koji (massa de arroz cozido fermentado), seco como meio. Obtiveram valores de 650 UI / g, quando a FES foi realizada naturalmente (sem ajuste de umidade e temperatura) e valores superiores a 1000 UI / g, quando a temperatura média e atividade de água foram equilibradas, concluindo, assim, que a produção de xilanase foi fortemente afetada pela atividade de água do meio. A melhor umidade do meio para se atingir a produtividade enzimática máxima foi de 40-50%, o que, de acordo com os autores, corresponde a valores de a_w na faixa de 0,93 a 0,96, faixa na qual se enquadra o resíduo de caju para as enzimas estudadas neste trabalho.

Os picos de atividade enzimática de CMCase, FPase e Xilanase foram atingidos em valores de umidade que variaram de 40 e 50%, para o resíduo de caju, e de 50 e 60%, para o resíduo de acerola. Estes valores correspondem a uma variação de atividade de água que

ficaram entre 0,939 e 0,969 para o resíduo de caju, e 0,967 e 0,981 para o resíduo de acerola, dependendo da enzima produzida.

A água representa um papel primordial na FES, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular (PANDEY, 2003).

Para cada espécie de microrganismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzima (AMORIM, 2011). Na FES, o microrganismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento, a atividade de água ótima para fungos é por volta de 0,7; para leveduras 0,8, e para bactérias 0,9, uma pequena flutuação nesses valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e metabolismo dos microrganismos (ANDRADE, 1999).

Observa-se em todos os casos a ocorrência de um pico de produção enzimática em curto período, nos tempos de 48 e 72 horas, dependendo da enzima e do resíduo, seguido de um novo aumento ao final da fermentação. A queda da atividade pode estar relacionada à desestabilização da enzima pelo efeito do pH, temperatura ou ainda à produção de enzimas inibidoras pelo microrganismo, conforme já demonstrado por Palma et al. (2000). O aumento de atividade enzimática ao final das fermentações pode estar correlacionado a vários fatores como a produção de novas enzimas, queda de atividade da enzima inibidora, indisponibilidade de substrato ou retroalimentação.

As enzimas produzidas a partir dos dois resíduos testados apresentaram picos de produção enzimática em diferentes tempos de fermentação, com valores de atividade enzimática variando também com a umidade. Sendo assim, as condições tempo e umidade para a produção do EEB, consideradas mais eficientes, foi de 48 horas de fermentação e 50% de umidade para ambos os resíduos, pois atingiram valores de atividades enzimáticas próximos dos picos máximos. Os valores de produção enzimática encontrados nestas condições foram de 6,8 e 11,7 U/mL para CMCase, de 3,2 e 4,1 U/mL para FPases, e de 2,6 e 4,1 U/mL Xilanases para os resíduos de caju e acerola, respectivamente.

5.2 Extração do óleo essencial

5.2.1 Avaliação do tempo de extração

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios das massas do OS (óleo essencial extraído sem pré-tratamento com EEB) OC (óleo essencial extraído após pré-tratamento com EEB obtido a partir da fermentação de resíduo de caju) e OA (óleo essencial extraído após pré-tratamento com EEB obtido a partir da fermentação de resíduo de acerola), recolhido em tempos de 1 a 4 horas, assim como o rendimento obtido a partir de 36 g de material vegetal.

Tabela 3: Massa do óleo essencial obtido com e sem pré-tratamento com EEB, produzido a partir de resíduo de caju e acerola recolhido após diferentes tempos de extração e seu rendimento.

Tempo de extração (h)	Óleo extraído s/ enzima		Óleo extraído c/ EEB de caju		Óleo extraído c/ EEB de acerola	
	Massa (g)	Rendimento (%)	Massa (g)	Rendimento (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
1	1,031 ±0,086	2,86	1,082 ±0,078	3,00	1,171 ±0,080	3,25
2	1,053 ±0,081	2,93	1,116 ±0,072	3,10	1,195 ±0,086	3,32
3	1,070 ±0,077	2,97	1,145 ±0,078	3,18	1,210 ±0,085	3,36
4	1,083 ±0,071	3,01	1,159 ±0,082	3,22	1,221 ±0,083	3,39

* Valores de massas correspondem à média ± desvio padrão

Pode ser observado que em todos os tempos de extração, o rendimento dos óleos extraídos após aplicação de EEB na etapa de pré-tratamento é maior do que o rendimento do óleo extraído sem a utilização dos extratos enzimáticos. Para todos os casos o rendimento é crescente ao passar do tempo de extração. Após quatro horas de extração, que é o tempo máximo utilizado, o rendimento do OS foi de 3,01%, enquanto do OC foi de 3,22, e do AO de 3,39. Isso demonstra a eficiência da aplicação dos EEBs, pois houve aumento do rendimento dos óleos extraídos utilizando extrato enzimático..

As diferenças entre o rendimento dos óleos extraídos após pré-tratamento com EEB produzido a partir de resíduo de caju e de acerola podem também serem explicadas através das diferenças quantitativas e qualitativas das enzimas presentes nos dois EEBs. O que demonstra que o substrato ou fonte de alimentação do fungo é o fator determinante na produção do EEB, o tipo de EEB interfere diretamente em sua aplicação na extração de óleo essencial.

Pode ser observado também que, logo na primeira hora, o rendimento da de extração de OC é praticamente igual ao de OS com 4 horas de extração, enquanto que para o AO o rendimento é 0,03%, maior que com 4 horas de extração do OS. Isso possibilita a redução do tempo de extração nos processos, utilizando-se enzimas, diminuindo o custo do processo e possíveis alterações químicas durante a extração de óleos pouco estáveis.

De acordo com Guimarães et al. (2008), os óleos essenciais, em geral, não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais, podendo sofrer alteração em sua composição, quando expostas a estes fatores. Para verificar uma possível alteração na composição química dos OC e OA, esses óleos foram submetidos à análise cromatográfica, uma vez que os mesmos foram expostos a altas temperaturas por um longo período de tempo, além da possível adição de compostos dos EEB.

Através dos cromatogramas obtidas por meio de GC-FID, verificou-se a presença de um único composto majoritário, o metilchavicol, em todas as amostras (sem e com tratamento enzimático e de tempos de 1 a 4 horas), e nenhuma alteração química dos óleos extraídos. Na

Figura 18, 19 e 20 estão representados os cromatogramas referentes às análises dos OC, OA e OS, respectivamente, no maior tempo de extração (4 horas). Os cromatogramas referentes aos demais tempos de extração dos tratamentos com e sem enzima estão no APÊNDICE (Figuras A-1 a A-9).

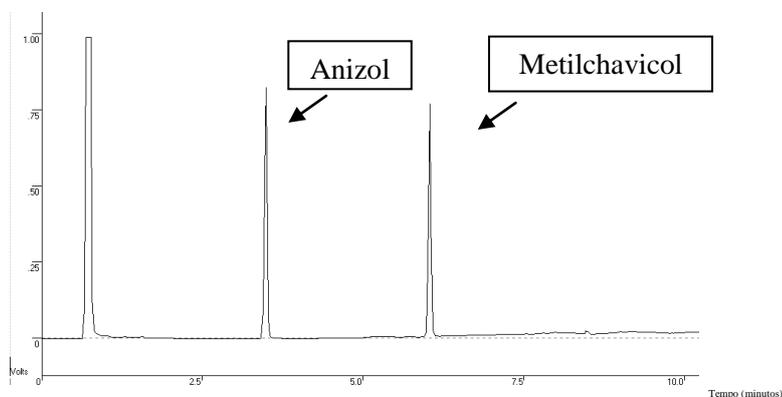


Figura 18: Cromatograma referente ao OC após 4 horas de extração.

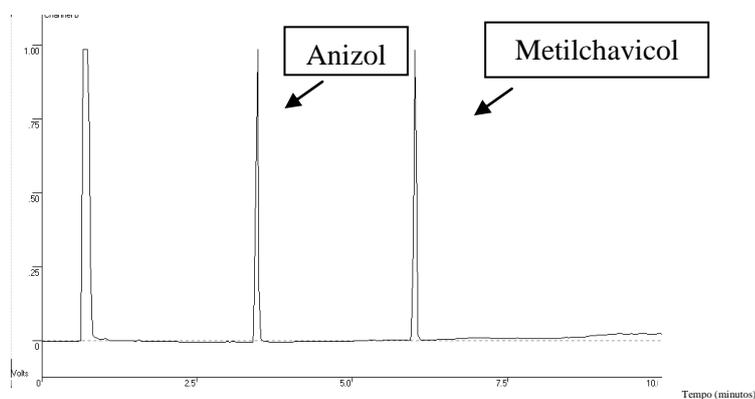


Figura 19: Cromatograma referente ao OA após 4 horas de extração.

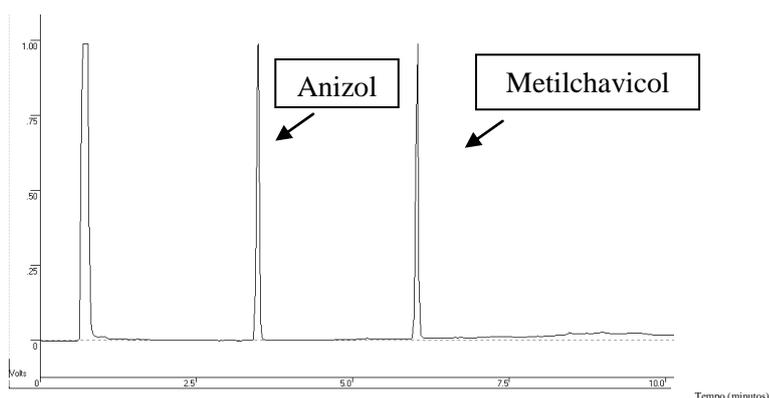


Figura 20: Cromatograma referente ao OS após 4 horas de extração.

Os picos apresentados nos cromatogramas são os mesmos em todos os tratamentos. O primeiro pico que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 0,7 minutos é correspondente ao solvente utilizado na amostra, o diclorometano (Figura A-10). O segundo pico que aparece no tempo de aproximadamente 3,3 minutos é referente ao padrão interno, que é o anizol (Figura A-11), já o terceiro pico que apresenta tempo de retenção de

aproximadamente de 5,9 minutos, é referente à substância presente no óleo, o metilchavicol. A razão entre as áreas dos picos do anizol e do metilchavicol são de aproximadamente 1, o que leva a supor que o óleo está praticamente puro, podendo conter somente traços de outras substâncias, e que não houve alteração de sua constituição química, nem adição de outras substâncias voláteis.

5.2.2 Determinação da concentração enzimática

Os experimentos utilizando diferentes concentrações de EEBs obtidos a partir da fermentação de resíduos de acerola (*Malpighia emarginata D.C.*) e de caju (*Anacardium occidentale L.*) para a extração de óleos essenciais foram realizados com tempo de pré-tratamento estipulado em 1 hora. Estes demonstraram a eficácia da utilização destes extratos enzimáticos, com um aumento máximo médio de 14, 14 e 10,01%, respectivamente, para a produção de óleo, em relação à extração sem a aplicação das enzimas. Foram utilizadas concentrações de EEB/tampão crescentes para os dois resíduos, e somente tampão nos tratamentos controles.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos volumes utilizados de EEB, proveniente da fermentação do resíduo de caju, que variam de 150 a 550 mL. Também estão apresentados os valores das massas do óleo extraído, com e sem o auxílio destas enzimas, e o aumento desta massa em porcentagem, que variaram entre 2,88 a 10,01%.

Tabela 4: Aumento da massa de óleo essencial de *Croton grewoides*, após 1 hora de extração, utilizando extrato enzimático bruto obtido a partir de resíduo de caju.

Amostra	Extrato enzimático (ml)	Massa de óleo obtida (mg)*		
		S/extrato	C/extrato	Aumento do óleo extraído (%)
1	150	488,5	503	2,88
2	250	472	493	4,25
3	350	544	583	6,7
4	450	564,6	515	8,72
5	550	607	681	10,1

Na Tabela 5 estão os valores dos volumes de EEB, produzido a partir de resíduo de acerola, que tiveram uma maior variação de 50 a 550 ml, assim como as massas dos óleos extraídos, com e sem adição de extrato enzimático, e o aumento desta massa em porcentagem que variou entre 3,03 a 14,14 %.

Tabela 5: Aumento da massa de óleo essencial de *C. grewoides*, após 1 hora de extração, utilizando extrato enzimático bruto obtido a partir de resíduo de acerola.

Amostra	Extrato enzimático (ml)	Massa de óleo obtida (mg)*		Aumento do óleo extraído (%)
		S/enzimático	C/enzimático	
1	50	607	626	3,03
2	150	727	776,5	6,24
3	250	668	720,5	7,28
4	400	693,5	774	10,4
5	550	640,5	746	14,14

O EEB, produzido a partir de resíduo de acerola, pode ser considerado mais eficiente quando comparado ao de caju, por apresentar maior aumento da massa do óleo extraído. A melhor eficiência da aplicação do EEB de acerola pode ser explicada à maior quantidade de enzimas celulolíticas presentes neste resíduo.

Quando comparados o aumento da massa do óleo extraído após a aplicação dos dois extratos, pode ser observado que, com um volume inicial reduzido (50 mL), o aumento da massa verificado com a extração utilizando EEB, produzido a partir de resíduo de acerola, foi de 3,3%. Para que o EEB produzido a partir de resíduo de caju atinja eficiência semelhante de 2,88%, foi necessária a adição de 150 mL de extrato, um volume cerca de 3 vezes maior. Porém, na concentração máxima (550 mL) essa diferença não é tão relevante, o aumento da massa de óleo gerado pelo EEB obtido a partir do resíduo de caju é de 10,1%, um aumento não tão superior do obtido a partir do resíduo de acerola, que é de 14,14%.

A partir da análise estatística ANOVA dos resultados experimentais, observou-se que houve diferença significativa para a massa de óleo extraído com e sem pré-tratamento com EEB, a 5% de probabilidade pelo teste F. Essa diferença ocorreu, possivelmente, influenciada pela diferença entre dos tipos e das proporções de enzimas presentes nos EEB, produzidos a partir de resíduo de caju e acerola.

Analisando o comportamento das curvas (Figura 21 e 22), percebe-se que a quantidade de EEB aplicado no pré-tratamento, exerceu uma influência semelhante em ambos os casos, ou seja, com o aumento do volume de EEB aplicado, houve um aumento da extração de óleo.

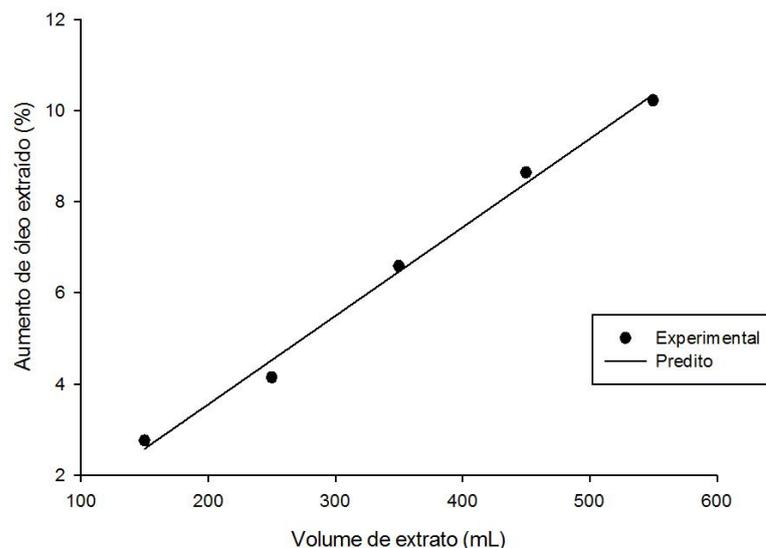


Figura 21. Aumento da massa de óleo essencial extraída, pelo volume de EEB produzido a partir de resíduo de caju, utilizado no pré-tratamento das folhas de *Croton grewioides*.

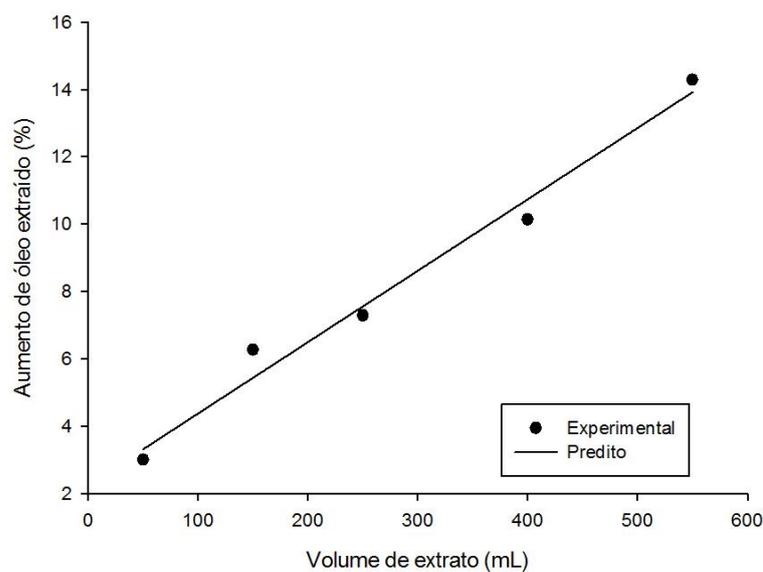


Figura 22. Aumento da massa de óleo essencial extraída pelo volume de EEB produzido a partir de resíduo de acerola, utilizado no pré-tratamento das folhas de *Croton grewioides*.

Os resultados obtidos de aumento da extração do óleo essencial em função do volume de extrato aplicado foram bem ajustados no modelo linear (Equações 1 e 2), R^2 igual a 0,992, para os valores apresentados na Figura 21, e para os valores apresentados na Figura 22, R^2 igual a 0,987, sendo todos os parâmetros significativo ($P < 0,001$). De acordo com estas equações, a variação positiva de um mL no volume de EEB aplicado na etapa de pré-tratamento, acarreta no

aumento de 0,0194% de aumento da massa do OC, e um aumento de 0,0212% de aumento da massa do AO.

$$\text{EEB caju} \quad R = -0,3326 + 0,0194V \quad R = 0,992 \quad (1)$$

$$\text{EEB acerola} \quad R = 2,604 + 0,0212V \quad R = 0,987 \quad (2)$$

O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente há alguns anos e aplicado para todas as oleaginosas de interesse comercial, como mostrado nos trabalhos de revisão publicados por Rosenthal et al. (1996), Freitas et al. (1996) e Dominguez et al. (1994). Essa tecnologia está voltada à área alimentícia, por isso, poucos dados estão disponíveis sobre a aplicação de enzimas na extração de óleos essenciais. Em estudo realizado por Santos (2008) sobre utilização de enzimas na extração de óleo essencial para fins farmacêuticos, foi obtido aumento de extração máximo superior ao encontrado neste trabalho, cerca de 60 %, quando utilizando EEB em concentração máxima, 1% em relação ao material vegetal. Porém, a produção do EEB, neste caso, diferenciou-se por utilizar outra técnica fermentativa, a FS em meios de cultura selecionados e enriquecidos, e também por precipitar as enzimas após a extração, obtendo, assim, um EEB mais concentrado.

Em trabalho realizado por Sowbhagha et al (2011), testou-se quatro enzimas purificadas na extração de óleo volátil de aipo. O rendimento de óleo volátil, depois de aplicação individual por pulverização de celulase, pectinase, protease e viscozyme no pré-tratamento, teve aumento de de 22 a 27%. A obtenção do óleo foi por hidrodestilação, sendo observada uma alteração na composição dos seus constituintes, o terpeno principal e o limoneno aumentaram sua concentração de 63% para 82% com tratamento enzimático; outros compostos principais tiveram alterações menos significativas, de 16 a 17%, o que não ocorreu neste trabalho.

Mesmo com a utilização de altas concentrações de EEB, não foi verificada nenhuma alteração na composição química dos óleos extraídos nem a incorporação de nenhuma substância volátil do extrato enzimático a estes óleos, como pode ser observado nas Figuras 23, 24 e 25, que representam as análises cromatográficas dos OC e OA nas concentrações máximas de EEB (550 ml) e do OS, respectivamente. Verificou-se a presença de um único composto majoritário, em tempo de retenção, de aproximadamente 5,9, o mesmo descrito no item 5.2.1.

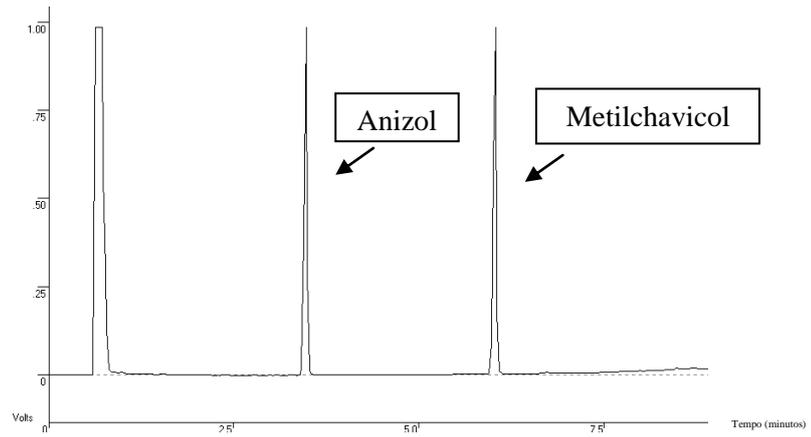


Figura 23: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 550 ml de EEB.

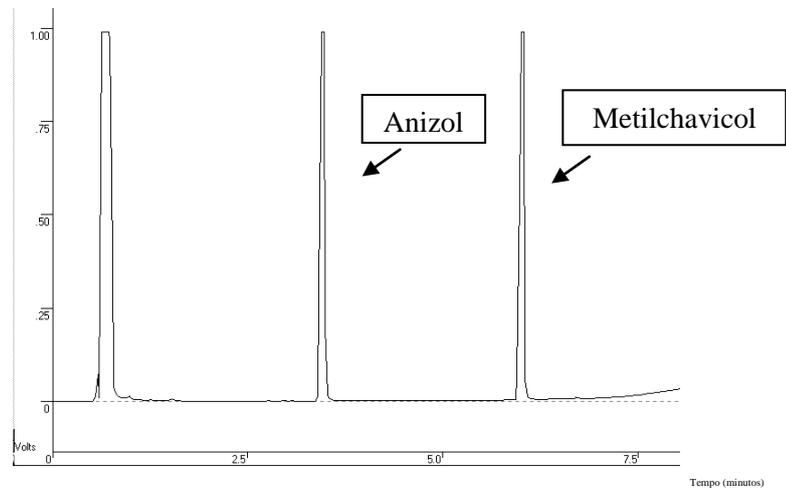


Figura 24: Cromatograma referente ao OA após pré-tratamento com 550 ml de EEB.

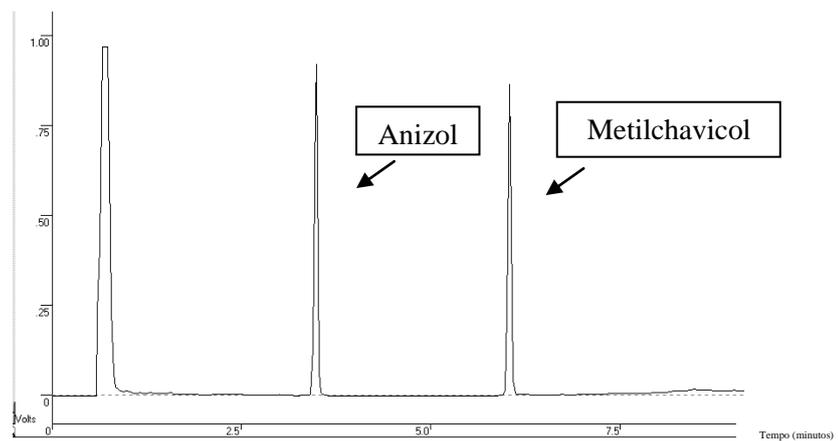


Figura 25: Cromatograma referente ao OS após pré-tratamento com 550 ml de EEB.

Através das razões entre as áreas dos picos da substância utilizada como padrão e da substância majoritária encontrada no óleo, foi possível verificar que não houve alteração quantitativa nem qualitativa do óleo, uma vez que esta razão é a mesma para o OC, OA, para o controle OS, igual a 1.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados experimentais confirmaram a viabilidade da produção de EEB contendo as enzimas CMCase, FPase e Xilanase, a partir dos resíduos de caju e acerola;
- As condições consideradas mais eficientes foram de 48 horas para ambos os resíduos, contendo 50% de umidade para os dois resíduos, pois atingiram valores de atividades enzimáticas de CMCase (6,8 e 11,7 U/ml), FPases (3,2 e 4,1 U/ml) e Xilanases (2,6 e 4,1 U/ml) mais próximos dos máximos;
- Aplicando-se EEBs na etapa de pré-tratamento aumentou o rendimento do óleo extraído, comprovando-se assim a eficácia da utilização dos mesmos. Houve um aumento da massa do óleo extraído em até 10,1%, para o resíduo de caju, e em 14,14%, para o resíduo de acerola. Sendo o de acerola considerado mais eficiente;
- O tipo de substrato (resíduo agroindustrial) utilizado para a produção dos extratos enzimáticos interfere na composição quantitativa das enzimas presentes, o que influenciou diretamente na diferença de rendimento entre os óleos produzidos a partir do resíduo de caju e acerola;
- A composição química dos óleos não é alterada nem pelo tempo de extração dos óleos nem pela quantidade de extrato utilizado.

7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Mais estudos devem ser realizados para saber quais das enzimas celulolíticas presentes são as principais responsáveis pelo aumento de rendimento na extração do óleo essencial através de aplicação individual de enzimas celulolíticas purificadas. Também são relevantes novos estudos sobre a utilização de outros tipos de resíduos, como substrato, para a produção de enzimas.

8 REFERENCIAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers.**, v.57, n.1, p.67-72, 2004.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar.** **Boletim do Ceppa**, 18(1), 57-70, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/viewFile/1125/926>>. Acesso em 29. Nov 2011.
- ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, v.30, n.1, p.123-126, 2008.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN A. G. J. An hypothesis: the same mix polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A.G.J. **Pectins and Pectinases**. Amsterdam, v.14, p.47-55, 1996.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.16, n.3, p.273-285, 2002.
- ALVES, R.E. Características das frutas para exportação. In: GORGATTI NETTO, A.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E. (Eds.) **Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.9-12. (Série Publicações técnicas FRUPEX, 21).
- AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. 2011. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UESB, Itapetinga:
- ANDRADE, A.T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglucosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz**. 1999. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos) - Centro de Estudos Ambientais, Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- ASPINNALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, cap.12, p.473-500, 1980.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemical Toxicology.**, v.46, n.2, p.446 – 475, 2008.
- BARRIOS, V. A., OLMOS, D. A., NOYOLA, R. A., and LOPEZ-MUNGUÍA, C. A. Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction. **Oleagineux**, v.45, n.1, p.35-42, 1990.
- BELO, R.F.C., **Caracterização de genótipos de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) pelo perfil cromatográfico de voláteis**. 2009. 125 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia. UFMG. Belo Horizonte.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. v.15, n.4, p.583-620, 1997.

- BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectiva. **Química Nova**. v.32, n.3, 588-594, 2009.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. (eds.). **Interciência Brasil**. p.241-271, 2008.
- BRAITHWAITE, K. L., BLACK, G.W., HAZLEWOOD, G. P., ALI, B. R., GILBERT, H.J. A non-modular endo- β -1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies cellulose. **Biochemical Journal**, v.305, part 3, p.1005-1010, 1995.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y farmaconognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.
- CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; ARAÚJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal Food Technology**, v.12, n.2, p.155-160, 2009.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, n.14, p.1291–1296, 2002.
- CAPEK, P.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J-F. Enzymatic degradation of cell walls of apples and characterization of solubilized products. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n.6, p.337-340, 1995.
- CARVALHO, R. A. **Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé-Açu, Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 21p., 2000. (Documento, 49).
- CHRISTENSEN, F. M. Extraction by aqueous enzymatic process. **Inform: International News on Fat, Oils and related Materials**, v.2, n.11, p.984 - 987, 1991.
- CINIGLIO, G., Eucaliptus para a produção de óleos essenciais. In: **ESALQ-USP**, Piracicaba, 15p. 1993.
- COELHO, J. A. P.; PEREIRA, A. P; MENDE,S R. L; PALAVRA, A. M. F. Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal** v. 18, n. 4, p.316–319, 2003.
- COSTA, J. A. V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. 1996. 203 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R., SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p.583-586, 2008.
- COUNCIL OF EUROPE. Opinion of the scientific committee of food on estragol (1-allyl-4-methoxybenzene). Strasbourg: Committee of Experts on Flavouring Substances. 2001.

- COURI, S.; ALTER, P.; ABREU, F. A. P.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M. Propriedade antioxidante de cinco variedades de pendúnculo de cajueiro anão precoce. In: **ENAAL** Rio de Janeiro. v. 1, p. 214-214, 2003.
- CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Anise-like Flavor of *Croton aff. zehntneri* pax et Hoff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.773, 1978.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste. **Edições UFC**, Fortaleza, CE, Brasil, 1981.
- DAMIANI, C. **Qualidade e perfil volátil de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas.** 2006. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. UFLA Lavras:
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v.20, p.11-21, 2004.
- DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J., LEMA, J. M. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. **Food Chemistry**, v.49, p.271-286, 1994.
- DOURADO, R. C. M.; SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: habitat, plant part and harvest time variation. **The Journal of essential oil research**. v.17, n.1, p.36-40, 2005.
- DUMITRIU, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility.** 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2005.
- FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas.** Zaragoza: Editorial Acribia, p.172-177, 1994.
- FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1380-1385, 2004.
- FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da Fermentação em Estado Sólido na Biotransformação do Resíduo do Cajá. Revista Acadêmica: **Ciências Agrárias e Ambientais** (PUCPR. Impresso), v.9, p.207-213, 2011.
- FONTENELLE, R. O. S; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S. ; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F. ; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the brazilian caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1383-1390, 2008.
- FRANCO, M.N. Produção de celulasas por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em em Ciências Biológicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). UFRJ. Rio de Janeiro:
- FREITAS, S.; HARTMAN, L.; COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, n.32, p.29-32, 1996.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.4, p.395-400, 2006.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v.77, p.171-175, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

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.

GUTIERREZ – ROJAS, M. ; TORRES, E. F. **Curso de Fermentaciones em Medio- Sólido – Biotecnología para el Aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales**. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.

HAICHAR, F. Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M. F. ; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESSENT, J.; BERGE, O. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environ. Microbiology**, v.9, n.3, p.625-634, 2007.

HANMOUNGJAI, PYLE, D.L.; NIRAJAN, K. Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. **Journal of AOCS**, v.78, n.8, p.817-821, 2001.

HECK, J.X.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid- state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.213- 218, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em : 20 de Nov. de 2011.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.19, p.263-268, 2003.

JORGENSEN, H., MORKEBERG, A., KROGH, K. B.R., OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.42-48, 2005.

JORGENSEN, H; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.381-390, 2006.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v.40, p.3519- 3525, 2005.

KAMEL, C.; HAFEDH, H.; TAREK, Z.; AMEL, B. K. N.; MAHMOUD, R.; KACEM, M.; AMINA, B.; The chemical composition and Biological activity of Clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L Myrtaceae): **a short Review Phytother Research**, v.21, p.501-506, 2007.

KANG, S. W. PARK, Y. S. LEE, J. S. HONG, S. I. KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.91, p.153-156, 2004.

- KNORR, D. **Food Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 383-399, 1987.
- LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytother Research**, v.18, p.435-448, 2004.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P. Exoenzymes **In: Solid Substrate Cultivation**, Elsevier, London . 1992.
- LONSANE, B. K.; KRIAHNAIAH, M. M. Product Leaching and Downstream Processing **In: Solid Substrate Cultivation**, Elsevier, London, 1992.
- LU, W.; LII, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, n.2, p. 305 – 311, 2003.
- MABBERLEY, D.J. **The Plant Book**, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997.
- MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S. GUIMARÃES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n.21, v.1, p.43-46, 2001.
- MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum***. 121p. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Programa de Pós-Graduação em química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MARX, F.; LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; PAPAGIANNPOULOS, M.; MAIA, J. G. S. Evaluation of the total oxidant scavenging capacities of açai (*Euterpe oleracea*) and cashew apple (*Anacardium occidentale*) juices and identification of the active compounds by LCMS. In: **SLACA**, 5, 2003, Campinas: UNICAMP, 2003.
- MATOS, A. T. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais. Viçosa, UFV, 2005.
- MAUL, A. A., WASICHY, R., BACCHI, E. M. Extração por fluido super-crítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.5, p.185-200, 1996.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.1, p.426-28, 1959.
- MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K.. Definition, characterization and economic evaluation. **In: Solid Substrate Cultivation**, Elsevier, London. 1992.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY. New developments in solid-state fermentation: II – Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p. 1211-1225, 2000.
- MITCHELL, D. A., VON MEIEN O. F., KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.
- MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A. R.; TENGERTDY, R. P. Principles of solid-substrate fermentation. **In: The Filamentous Fungi**, ed JE Smith. Edward Arnold, London, v.4, 1983.
- MORENO, P. R. H.; LIMA, M.E.L.; CARUZO, M. B. R.; TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from

Croton heterocalyx Baill. (Euphorbiaceae s.s.) leaves. . **The Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.2: p.190-192, 2009.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Silva Junio. J. F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.463-470, 2002.

OLIVEIRA, V. H. D.; ANDRADE, A. P. S. **Produção integrada de caju**. Abrindo portas para qualidade. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/pif/artigo1.pdf>>. Acesso em 20 nov. 2011.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M. Melhoramento genético da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na Embrapa Agroindústria Tropical. **In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento industrial do caju**. Fortaleza: CNPAT/SEBRAE/CE (Embrapa CNPAT, 38), 85p, 2000.

PALMA, M. B., PINTO, A. L., GOMBERT, A. K., SEITZ, K. H., KIVATINITZ, S. C., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, p.1137-1145, 2000.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed Column Bioreactor for Production of Enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 14, p. 486-488, 1992..

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; SOCCOL, C. R. ; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **In: Current Science**, v.77. n.1, p.149-161, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. In: sugarcane bagasse. **A review. Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.1-4, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v.24,p. 2107- 2111, 2002.

PRADE, R. A.; ZHANG, D-F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and lantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.361- 391, 1999.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir do Bagaço de Mandioca**. 2002. 81 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFPR, Santa Catarina.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, London, v.39, n.5, p.561-566, 2004.

- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6^a . ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.
- REED, G. Enzymes in Food Processing. 2.ed. New York: **Academic Press Inc.**. p.62-87, 1975.
- ROMANI, R. A. , In: **Óleos essenciais de eucalipto**, ESALQ-USP, Piracicaba, 1972.
- ROSENTHAL, A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19, p.402-420, 1996.
- 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.1, p.1-9, 2006.
- SAID, S.; PIETRO R. C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto. 2004.
- SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1,:p.132-138, jan.-mar. 2005.
- SANTOS, E. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. 127p. 2008 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista. Araraquara.
- SANTOS (a), 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, 2011.
- SANTOS (b), T. C.; SOARES, G. A.; ROCHA, T. J. O.; FERREIRA, A. N; PACHECO, C. S. V.; FRANCO, M. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Exatas Online Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v.2, p.22-29, 2011.
- SANTOS (c), T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F. ; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. . Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v.41, p.2210-2216, 2011.
- SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology** 2nd ed., ed. ASM Press, Washington DC, 1999.
- SHANKAR, D., AGRAWAL, Y. C., SARKAR, B. C., SINEH, B. P. N. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery. **Jornal of AOCS**, v.74, n.12, p.1543-1547, 1997.
- SIANI, A. C., SAMPAIO, F. L. A., SOUSA, C. M., HENRIQUE, O. M. G. M., RAMOS, S. F. M. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 37-43, 2000.
- SILVA, D. D.; CHIERICE G. O.; GALHIANE M. S.; CHAAR J. S.; MOUCHREK-FILHO V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em Cromatografia Gasosa. São Paulo, **Química Nova**, v.26, n.4, 2003.
- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2005.

SILVA, C. G. V.; ZAGO, H. B.; S. JUNIOR, H. G.; CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E.; LUCENA, M. F. A. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **The Journal of essential oil research**, v.20, n.2, p.179-182, 2008.

SIMÕES C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, C.; MELLO, J. C. P.; DE, MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC. p.387-415, 2000.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª edição. Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, cap.7, 2003

SMITH, J. **Food Additive User's Handbook**. New York: Blackie and Son Ltd., 1991. P.131-144.

SOCCOL, C. R. **Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. 1992. 218p.Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France,

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, Washington, v.88, n.3, p.411-417, 2004.

SOSULSKI, F. W. The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheat. **Cereal Chemistry**, v.39, p.344-349, 1962.

SOWBHAGYA, H. B.; SRINIVAS, P.; KRISHNAMURTHY, N. Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. **Food Chemistry**. v.120, p. 230–234, 2010.

STRAUS, E. L.; MENEZES L. V. T. Minimização de Resíduos. In: **Anais do 17 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, p.212- 225, 1993.

TORRES, M. C. M.; ASSUNÇÃO, J. C.; SANTIAGO, G. M. P.; ANDRADE-NETO, M. SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D. B.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, v.5, n.12, p.2724-2728, 2008.

UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. **Morphology of Medically Important Fungi**, San Francisco, 2000. Disponível em: http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung_morph/homepage1.html. Acesso em: 18 dez. 2011.

VINCENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: II Estragole. **Fitoterapia**, v.71, p.725-729. 2000.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.

WARD, O. **Biotecnologia de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.. p. 64-67 e 233-247, 1989.

WULFF, N. A. Caracterização enzimática das celulasas XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *Escherichia coli*. 196 p., 2002. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, USP, Piracicaba.

XU, P.; HUA, D.; MA, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. **Trends Biotechnol.**, v.25, n.12, p.571-576, 2007.

APÊNDICE

As Figuras A-1 a A-9 representam os cromatogramas do OC, AO, obtidos após pré-tratamento, com 300 ml de EEB, e OS nos tempos de 1, 2 e 3 horas de hidrodestilação.

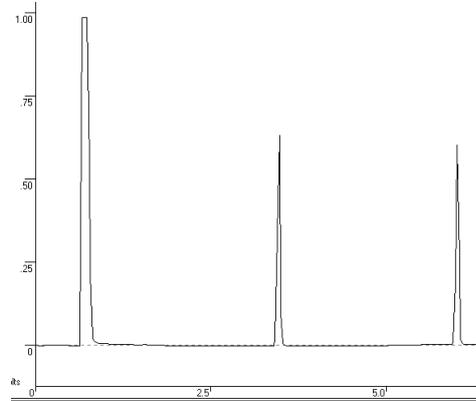


Figura A-1: Cromatograma referente ao OC após 1 hora de extração.

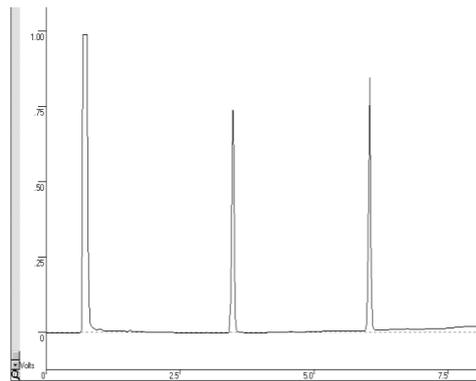


Figura A-2: Cromatograma referente ao OA após 1 hora de extração.

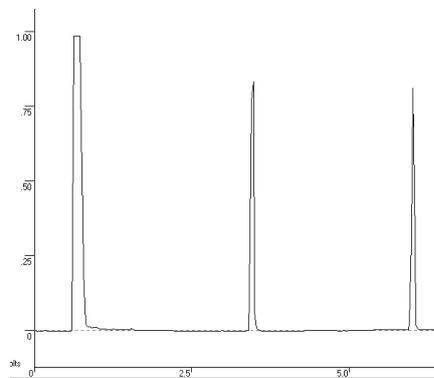


Figura A-3: Cromatograma referente ao OS após 1 hora de extração.

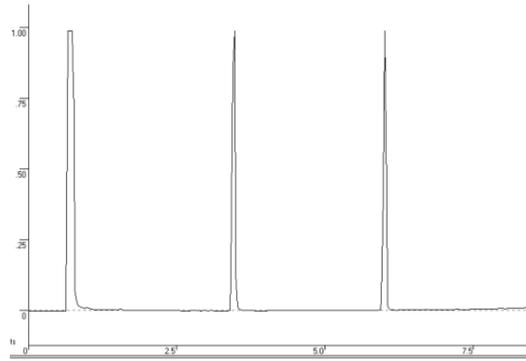


Figura A-4: Cromatograma referente ao OC após 2 horas de extração.

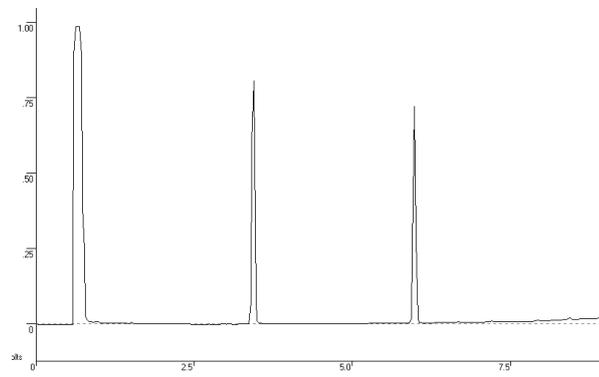


Figura A-5: Cromatograma referente ao OA após 2 horas de extração.

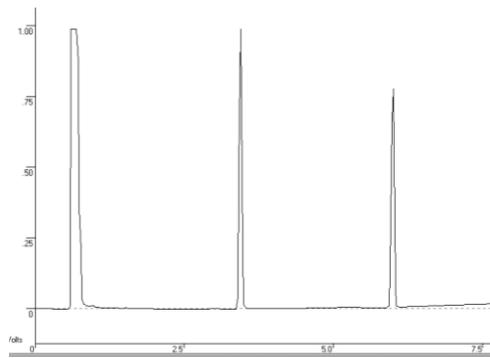


Figura A-6: Cromatograma referente ao OS após 2 horas de extração.

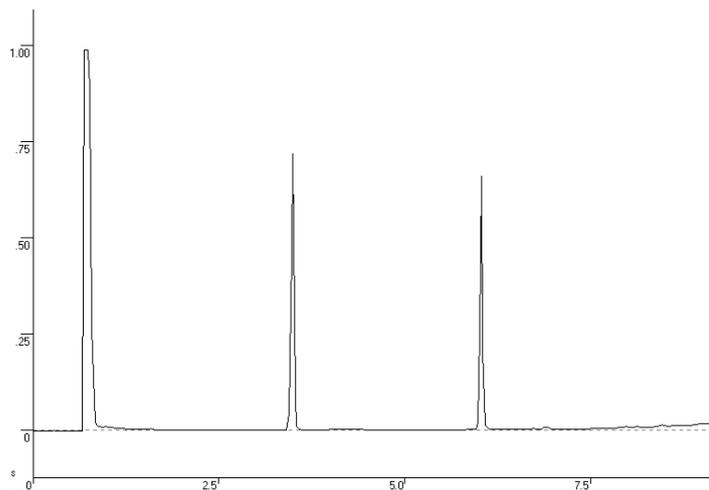


Figura A-7: Cromatograma referente ao OC após 3 horas de extração.

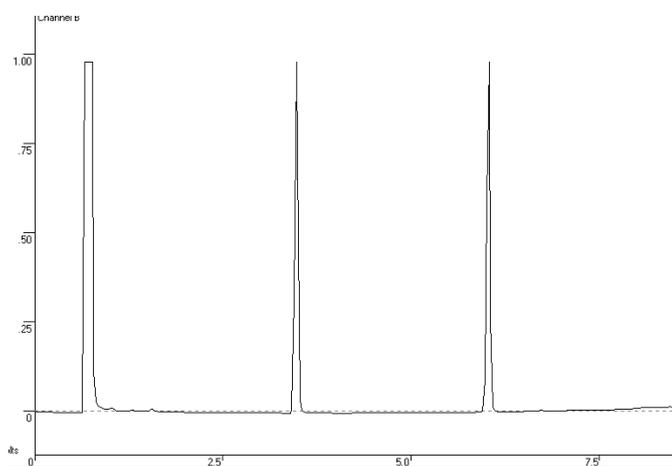


Figura A-8: Cromatograma referente ao OA após 3 horas de extração.

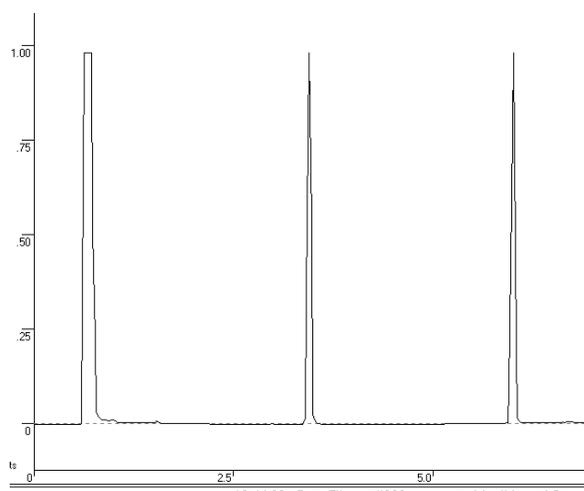


Figura A-9: Cromatograma referente ao OA após 3 horas de extração.

As Figuras A-10 e A-11 são referentes aos cromatogramas das injeções do Diclorometano (utilizado como solvente) e do Anizol (utilizado como padrão), respectivamente.

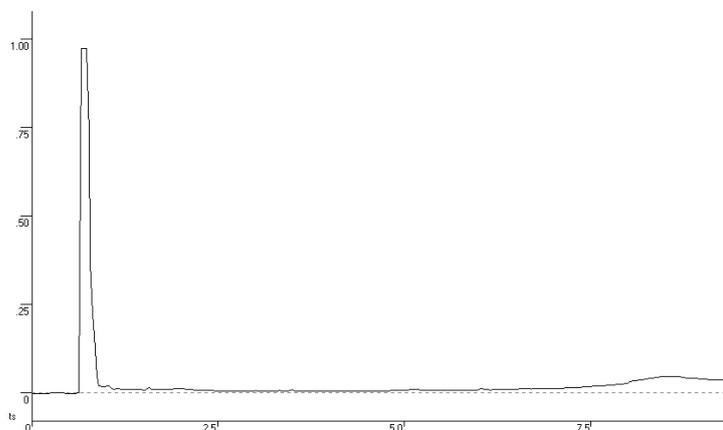


Figura A-10: Cromatograma referente ao Diclorometano.

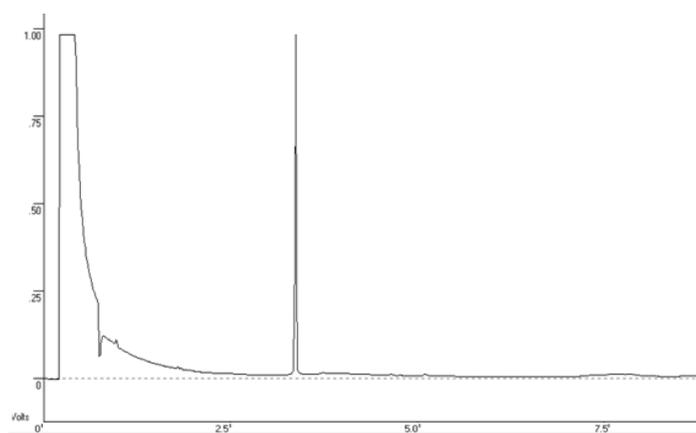


Figura A-11: Cromatograma referente ao Anizol.

As Figuras A-12 a A-20 são referentes aos cromatogramas dos OC e AO, após pré-tratamento com concentrações crescentes de EEB.

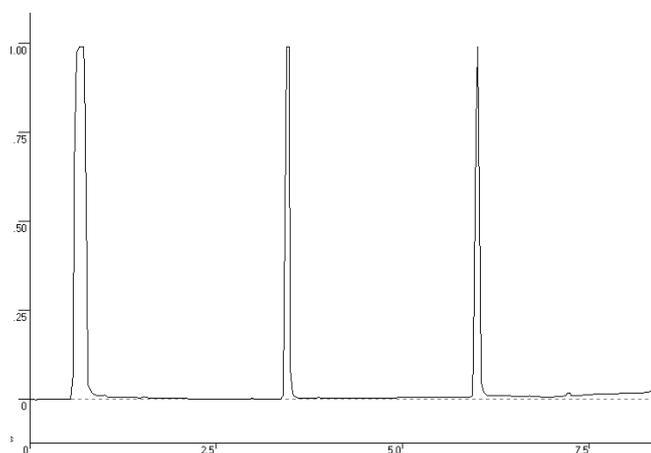


Figura A-12: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 50 ml de EEB.

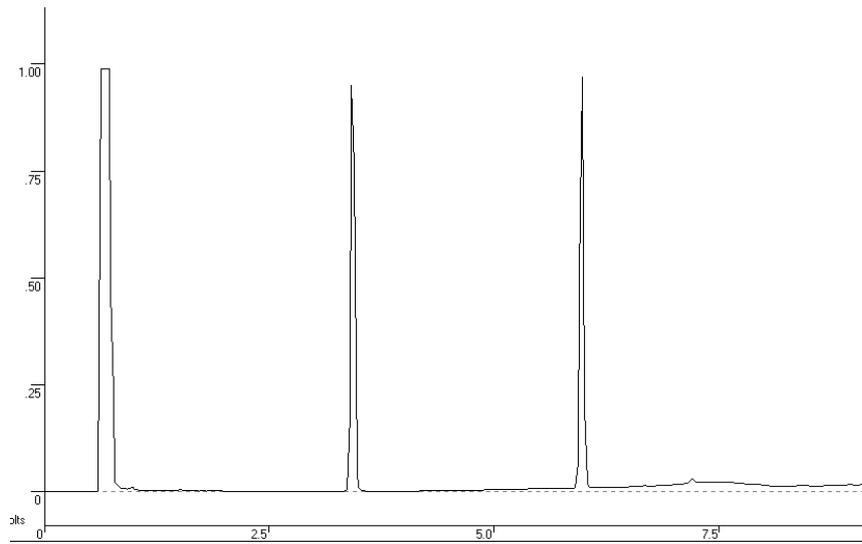


Figura A-13: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 150 ml de EEB.

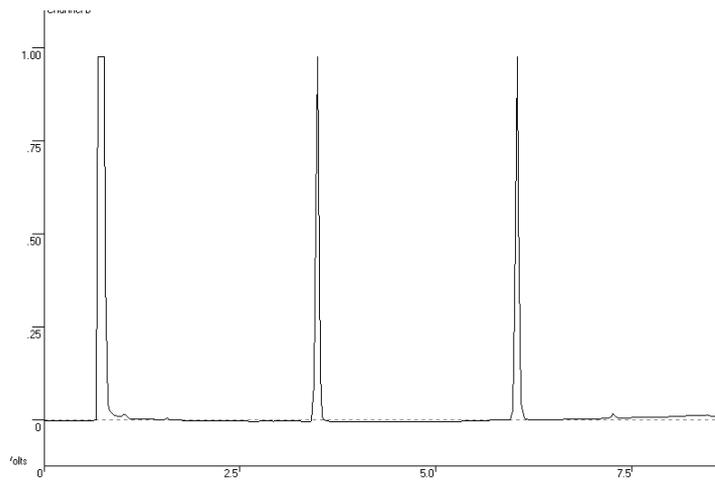


Figura A-14: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 250 ml de EEB.

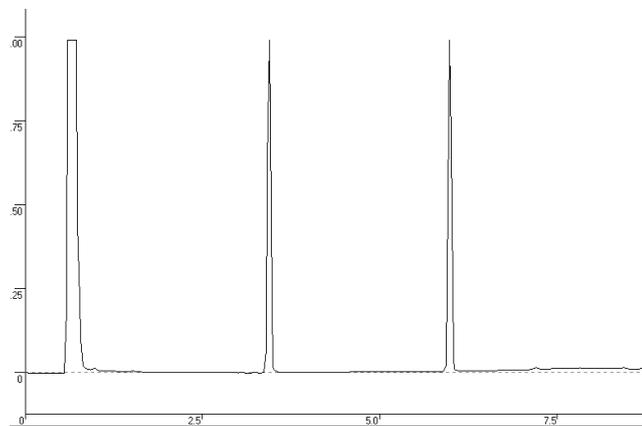


Figura A-15: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 350 ml de EEB.

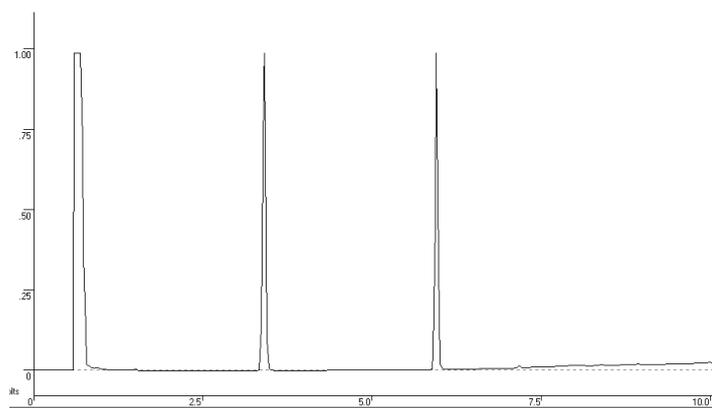


Figura A-16: Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 450 ml de EEB.

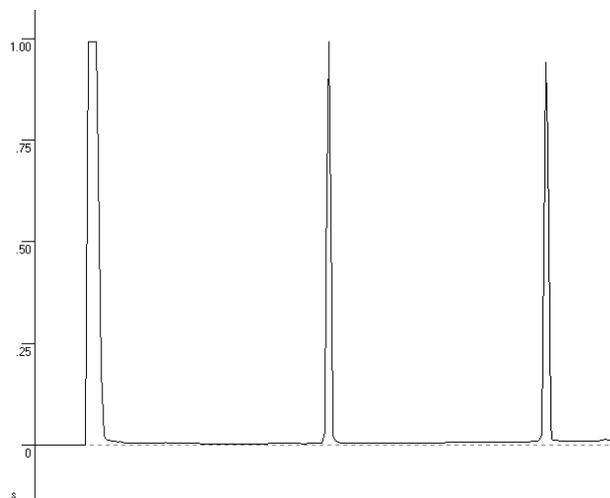


Figura A-17: Cromatograma referente ao OA após pré-tratamento com 50 ml de EEB.

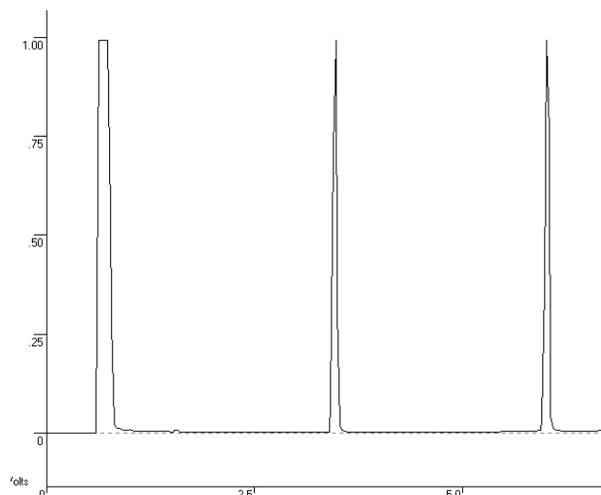


Figura A-18: Cromatograma referente ao OA após pré-tratamento com 150 ml de EEB.

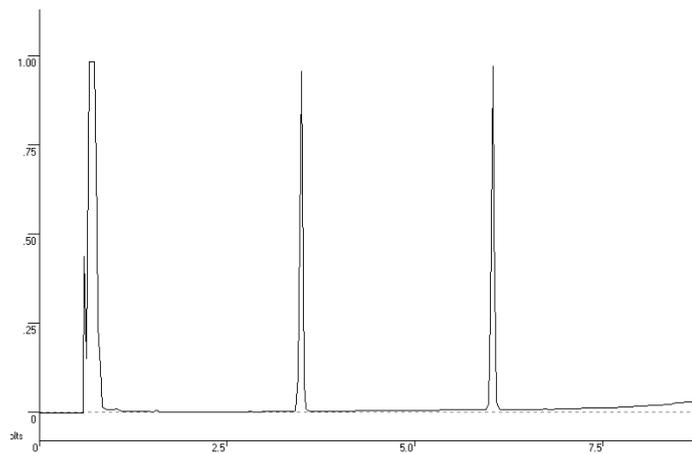


Figura A-19: Cromatograma referente ao OA após pré-tratamento com 250 ml de EEB.

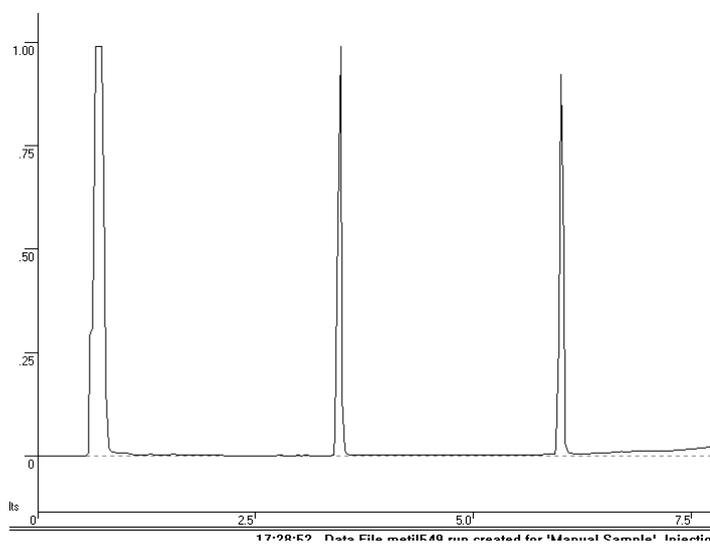


Figura A-20: Cromatograma referente ao OA após pré-tratamento com 400 ml de EEB.

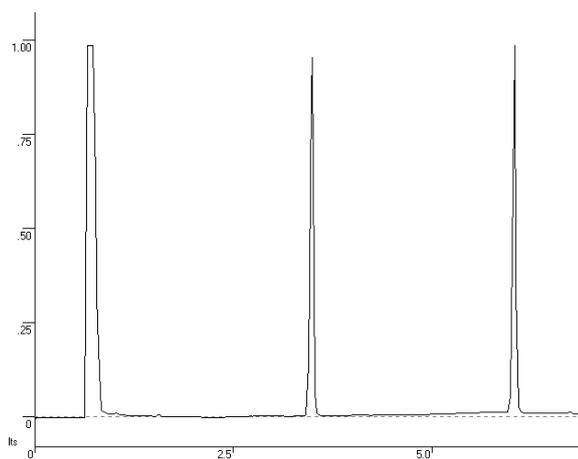


Figura A-21: Cromatograma referente ao OS.