



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**CAMPUS DE ITAPETINGA - BA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS**  
**ALIMENTOS**

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NA  
EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha arvensis*.**

**NADABE DOS SANTOS REIS**

**ITAPETINGA – BA**

**MARÇO/2015**

**NADABE DOS SANTOS REIS**

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NA  
EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha arvensis*.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>o</sup> DSc. Marcelo Franco

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. DSc. Larissa Corrêa do Bonfim Costa

**ITAPETINGA – BA**

**MARÇO/2015**

660.634

R311a Reis, Nadabe dos Santos.

Aplicação de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis*. / Nadabe dos Santos Reis. - Itapetinga: UESB, 2015.

65f.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Larissa Corrêa do Bonfim Costa.

1. Palma Forrageira - Óleo essencial - Hidrodestilação. 2. Fermentação em Estado Sólido. 3. Microscopia Eletrônica de Varredura. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Costa, Larissa Corrêa do Bonfim. V. Título.

CDD(21): 660.634

#### **Catálogo na fonte:**

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Palma Forrageira - Óleo essencial - Hidrodestilação
2. Fermentação em Estado Sólido
3. Microscopia Eletrônica de Varredura



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** APLICAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Mentha arvensis*.

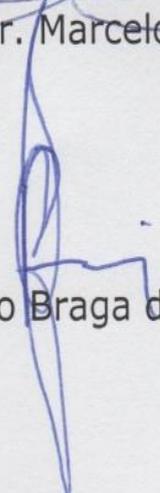
**Autor (a):** NADABE DOS SANTOS REIS

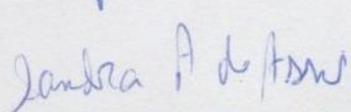
**Orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcelo Franco

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Corrêa do Bonfim Costa

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

  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcelo Franco (UESB)

  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Baraquisio Braga do Nascimento Júnior (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Aparecida de Assis (UEFS)

*Ao Senhor meu Deus, por sua bondade, misericórdia e infinito amor em todos os momentos.*

*A minha família, que é meu tesouro precioso, por tanto carinho, zelo, amor, pelo incentivo e compreensão, dedico a vocês esta vitória, como expressão de minha gratidão.*

*A duas grandes pessoas do saber: Professor Marcelo Franco e Professora Larissa Corrêa do Bonfim Costa, pela parceria oferecida, ensinamentos e pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

É excelente passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer e querer a tantos homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes, do nosso lado. Por isso meus sinceros agradecimentos...

Ao Senhor Jesus, por ser meu amigo em todos os momentos e me alcançar com graça e amor todos os dias. Foi seu abraço e sua bondade que me impulsionaram todas as manhãs. Obrigada por sua fidelidade! Tu és bom e teu amor dura para sempre...

Aos meus pais, José Reis e Noélia Reis, pelo amor, dedicação e incentivo. Vocês são bênçãos em minha vida, obrigada por todo apoio, amo vocês!

Aos meus irmãos, Tiago, Joabe e Raylane, a minha sobrinha Sophia, minhas cunhadas Verena, Sandra e Deise, aos meus cunhados Antônio e Jeferson, minha tia Preta, que são amigos maravilhosos, obrigada por cada palavra de incentivo e pelo companheirismo. Aos demais familiares, obrigada pelas orações e apoio.

Ao meu esposo Agninaldo Júnior (guinó) por seu amor, apoio e compreensão em todos os momentos. Obrigada por tornar meus dias tão agradáveis, te amo!

Aos meus amigos da turma de Mestrado e companheiros do LABRA, Aila Ryane, Adejanildo Pereira, Lívia Freitas, Thamyres Prado, Ludmila Mascarenhas, Nátilla Deyse, Rafael Costa, Grazielle, Bem-Hur por me proporcionarem momentos tão especiais.

As companheiras do laboratório de microbiologia da agroindústria da Uesc, Polyane Novais, Elck Carvalho, Laís Vieira, por tanta generosidade, disposição em ajudar, e pelas risadas compartilhadas.

Aos companheiros do Centro de Microscopia, Lucas e Vagner por serem tão prestativos e alegres.

Ao Seu Roberto no Horto de Plantas medicinais, por me ensinar a admirar cada plantinha aromática e ser tão gentil.

Ao meu orientador Professor Marcelo Franco, pela brilhante ideia deste trabalho, por tanto conhecimento transmitido, profissionalismo, confiança e amizade. Grande mentor!

As minhas co-orientadoras Renata Cristina F. Bonomo e Larissa Corrêa do Bonfim Costa pelos ensinamentos e apoio na realização deste trabalho.

A professora Ana Paula T. Uetanabaro pela solicitude apresentada, pela parceria neste trabalho.

Ao professor Baraquizio pela prontidão em ajudar e colaborar no meu aprendizado.

A todos os meus professores da pós-graduação por compartilharem de seus conhecimentos e experiências.

A UESB e ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida.

A UESC pela infraestrutura e excelente ambiente de trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite.

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

## RESUMO

A *Mentha arvensis* é uma espécie vegetal, aromática, produtora de óleo essencial rico em mentol. Para a remoção dos óleos essenciais das folhas de *Mentha arvensis* pode-se aplicar enzimas antes do processo de hidrodestilação. A extração combinada do uso de extratos enzimáticos e o processo de hidrodestilação neste estudo, resultou num aumento de 194% na elevação da massa de óleo extraída. Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de enzimas, na extração de óleos essenciais das folhas de *Mentha arvensis* por hidrodestilação. O extrato enzimático foi produzido durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger*. As atividades enzimáticas quantificadas foram; Carboximetilcelulase (3,35 U/mL), Celulases Totais (17,32 U/mL), Xilanase (35,23 U/mL), Lacase (1,17 U/mL), Lignina Peroxidase (2,34 U/mL), Mn Peroxidase (1,13 U/mL) e Amiloglucosidase (2,24 U/mL). Na segunda etapa, o extrato multienzimático foi utilizado no pré-tratamento no material vegetal, conforme a matriz de Doehlert em cinco faixas de temperaturas (30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C), cinco faixas de tempo (100 min, 115 min, 130 min, 145 min e 160 min), e três volumes de extrato enzimático (50 mL, 100 mL e 150 mL), seguido da extração do óleo, pela técnica da hidrodestilação, durante 1 hora de extração. Os valores otimizados, estatisticamente, foram 55 mL de extrato multienzimático, 36°C de temperatura e 128 minutos tempo de pré-tratamento. A elevação da massa de óleo extraída foi de 194% em comparação com o controle. Através da avaliação micromorfológica foi observado o rompimento dos tricomas glandulares peltados tanto na face adaxial como abaxial, os tratamentos quando analisados por ANOVA com teste de Tukey a 5% de significância apresentaram diferenças significativas. Os constituintes químicos foram analisados e identificados por análise cromatográfica, comprovando que não ocorreu nenhuma alteração química ou incorporação de substância volátil. Estes resultados indicam que o pré-tratamento enzimático reduz o tempo de hidrodestilação, preserva a integridade do componente majoritário do óleo, além de apresentar maior quantidade de óleo.

**Palavra-chave:** Hidrodestilação, Fermentação em Estado Sólido, Palma Forrageira, Microscopia Eletrônica de Varredura.

**REIS, N.S. Application of enzymes produced by *Aspergillus niger* in the extraction of essential oil of *Mentha arvensis*.** Itapetinga-BA: UESB, 2015. 65 p. (Dissertation: Master of Engineering and Food Science - Concentration Area in Food Science).

### **ABSTRACT**

*Mentha arvensis* is a species, aromatic, producer of essential oil rich in menthol. For the removal of the essential oils of *Mentha arvensis* leaves can be applied before the enzymes hydrodistillation process. The combined use of enzymatic extraction process extracts hydrodistillation this study resulted in a 194% increase in the mass of the extracted oil. From this perspective, the objective of this study was to evaluate the use enzymes, the extraction of essential oils from the leaves of *Mentha arvensis* by hydrodistillation. The enzyme extract was produced during solid-state fermentation of forage cactus by *Aspergillus niger*. The enzymatic activities were quantified; Carboxymethylcellulase (3.35 U / ml) Total cellulases (17.32 U / ml), Xylanase (35.23 U / mL), laccase (1.17 U / ml), lignin peroxidase (2.34 U / ml), manganese peroxidase (1.13 U / ml) and Amyloglucosidase (2.24 U / ml). In the second step, the multienzyme extract was used in the pretreatment of the plant material, as Doehlert matrix in five tracks temperatures (30 ° C 35 ° C 40 ° C 45 ° C and 50 ° C), five time slots (100 min, 115 min, 130 min, 145 min and 160 min), and three volumes of enzyme extract (50 ml, 100 ml and 150 ml), followed by oil extraction, the technique of hydrodistillation for 1 time of extraction. The optimized values statistically was 55 mL of enzymatic extract, 36 ° C and 128 minute time pretreatment. The increase in weight of extracted oil was 194% compared with the control. By micromorphological evaluation was observed disruption of peltate glandular trichomes in both upper side as abaxial, treatments when analyzed by ANOVA with Tukey test at 5% significance significantly different. The chemical constituents were analyzed and identified by chromatographic analysis showing that there has been no chemical change or volatile substance incorporation. These results indicate that the enzyme pre-treatment reduces the time hydrodistillation major component preserves the integrity of the oil, besides higher amount of oil.

**Keyword:** Hydrodistillation, SSF showed, Forage Palma, Scanning Electron Microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1</b> Espécie <i>Mentha arvensis</i> L, popularmente conhecida como hortelã - japonesa.....	15
<b>Figura 1.2</b> Estrutura da parede celular vegetal representando as fibras de celulose, hemicelulose e lignina.....	16
<b>Figura 1.3</b> Mecanismo de ação do complexo enzimático.....	20
<b>Figura 1.4</b> Representação Fermentação em Estado Sólido.....	23

### CAPÍTULO III

<b>Figura 3.1</b> Gráfico Superfície de resposta em função do tempo e da temperatura.....	53
<b>Figura 3.2</b> Gráfico Superfície de resposta em função do volume e da temperatura.....	53
<b>Figura 3.3</b> Gráfico Superfície de resposta em função do volume e do tempo.....	54
<b>Figura 3.4</b> Eletromicrografia de varredura da folha fresca: Face Abaxial-1/ Face Adaxial-2. Eletromicrografia de varredura do controle nas condições 36°C/126min/Água: Face Abaxial-3/Face Adaxial4.....	55
<b>Figura 3.5:</b> Eletromicrografia de varredura: Tratamento (36°C, 126 min, 55 mL)-Fases abaxial (A) e adaxial (B) / Tratamento - (30°C, 180 min, 15 mL)- Faces abaxial (C) e adaxial (D) / Tratamento-(40°C, 120 min, 25)- Faces abaxial (E) e adaxial (F) / Tratamento- (45°C, 130 min, 30 mL)- Face abaxial (G) e adaxial (H) / Tratamento - (48°C, 110 min, 35 mL)- Faces abaxial (I) e adaxial (J).....	56
<b>Figura 3.6:</b> Cromatograma referente ao óleo extraído sem enzimas (OS) após 1 hora de extração - A e referente ao óleo extraído com extrato multienzimático - B.....	60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 2.1</b> Valores experimentais para as atividades de produção das enzimas, CMCcase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase e Amiloglicosidase.....	36
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 3.1</b> Matriz de Doehlert utilizada para otimização da extração de óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> .....	49
<b>Tabela 3.2</b> Aumento do teor de óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> , após 1 hora de extração, utilizando extrato multienzimático obtido do farelo de palma forrageira.....	50
<b>Tabela 3.3</b> Análise de Variância (ANOVA) de efeitos principais e interações estudadas das variáveis estudadas no aumento de teor de óleo essencial.....	51
<b>Tabela 3.4</b> Condições experimentais para validação do modelo estatístico.....	54
<b>Tabela 3.5</b> Densidade de tricomas glandulares peltados ( $\text{mm}^2$ ) na superfície abaxial de folhas de <i>Mentha arvensis</i> submetidas a diferentes concentrações enzimáticas, tempo e temperatura.....	59
<b>Tabela 3.6</b> Densidade de tricomas glandulares peltados ( $\text{mm}^2$ ) na superfície adaxial de folhas de <i>Mentha arvensis</i> submetidas a diferentes concentrações enzimáticas, tempo e temperatura.....	59

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo Geral.....	14
1.2.2 Objetivos Específicos .....	14
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.3.1 Gênero <i>Mentha</i> .....	15
1.3.1 A Parede Celular Vegetal.....	15
1.3.1 Óleos Essenciais.....	17
1.3.1 Processos de Extração.....	18
1.3.1 Enzimas Degradadoras da Parede Celular Vegetal.....	19
1.3.5.1 Celulase.....	20
1.3.5.2 Hemicelulases.....	21
1.3.5.2 Enzimas Lignino.....	21
1.3.5 Fermentação em Estado Sólido.....	22
1.3.6.1 Biomassa- Palma Forrageira.....	23
1.3.6.1 Micro-organismos utilizados na Fermentação em Estado Sólido (FES).....	23
1.3.6.1 Enzimas Produzidas.....	24
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS	
<b>CAPÍTULO II</b> .....;	30
Produção de extrato multienzimático por fermentação em estado sólido sobre a palma forrageira por <i>Aspergillus niger</i> .....	30
<b>CAPÍTULO III</b> .....	45
Aplicação dos extratos multienzimáticos nas folhas de <i>Mentha arvensis</i> : Otimização do tempo de extração de óleos essenciais por hidrodestilação.....	46

## CAPÍTULO I

### 1.1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde a antiguidade devido aos seus efeitos terapêuticos atribuído aos óleos essenciais. Dentre essas plantas, a família das Lamiaceae é bastante pesquisada por agrupar um grande número de espécies produtoras de óleos essenciais. Vários gêneros dessa família são classificados como medicinais e aromáticos, entre eles pode citar; *Mentha*, *Plectranthus*, *Origanum*, *Ocimum* e *Thymus* (LORENZI, SOUZA, 2008). O gênero *Mentha* compreende cerca de 30 espécies que se desenvolvem em diversas regiões da Europa, Ásia, Austrália e América do Sul, entre essas espécies destaca-se a *Mentha arvensis* que produz óleo essencial cujo constituinte majoritário é o mentol (DORMAN *et al.*, 2003).

A extração de óleos essenciais pode ser efetuada através de diferentes processos físicos e mecânicos, sendo os mais usados; a hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor e prensagem a frio (YUSOFF *et al.*, 2011), entretanto, algumas desvantagens são observadas nestes processos como; equipamentos de alto custo, elevado volume de solvente orgânicos que apresentam o inconveniente de retirar junto com o óleo essencial, ceras e pigmentos da matéria-prima, que são caracterizados como contaminantes do óleo (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Normalmente, antes da extração dos óleos essenciais, as plantas medicinais passam por um processo de secagem, para a estabilização da composição química pela redução do desenvolvimento microbiano. O tempo de secagem recomendado pode variar de 3 a 7 dias, porém esta é uma etapa crítica para qualquer espécie aromática, pois pode ocasionar a redução do teor do óleo essencial, já que os tricomas (células armazenadoras do óleo essencial) são estruturas frágeis e o rompimento pode favorecer a volatilização e/ou degradação dos componentes presentes nos óleos (BORSATO *et al.*, 2008).

Com intuito de elevar o teor de óleo essencial e excluir a etapa de secagem podemos aplicar o tratamento enzimático. A utilização de enzimas contribui para a degradação da parede celular vegetal facilitando a remoção do óleo essencial. Nesse contexto, a aplicação de extrato multienzimático, ou seja, as enzimas em estado bruto, antes do processo de hidrodestilação pode ser uma aplicação tecnologicamente viável, pois, minimiza o tempo de extração e elimina a etapa de secagem realizada para plantas do gênero *Mentha*, reduzindo a energia do processo.

A produção de extratos multienzimáticos pode ser efetuada a partir da fermentação em estado sólido de biomassas. As biomassas vegetais possuem em sua composição material lignocelulósico que apresentam macronutrientes e micronutrientes que servem como suporte sólido e meio de nutrição para o crescimento de micro-organismos. Dentre as biomassas vegetais a palma forrageira (*Nopale cochenillifera*), pode ser utilizada como matéria-prima para bioprocessos. (GRORAI *et al.*,2009). A palma forrageira é uma cactácea pertencente ao gênero *Nopalea*, facilmente cultivada em regiões áridas, que é rica em carboidratos e apresenta em sua composição mineral; cálcio, potássio, fósforo, além de baixos teores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (SANTOS *et al.*, 2011a).

As biomassas utilizadas em muitos trabalhos na literatura são os resíduos agroindustriais como; bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de café, quirela do milho, bagaço de abacaxi etc. Entretanto, devido à falta de homogeneidade de seus componentes a produção de enzimas em larga escala é improvável.

A palma forrageira pode ser utilizada como matéria-prima para a fermentação em estado sólido na produção de extrato multienzimático aliada à sua aplicação nas folhas de *Mentha arvensis* para a extração de óleos essenciais, otimizando o tempo de extração por hidrodestilação, podendo promover o aumento do teor de óleo essencial, devido o rompimento dos tricomas causados pela ação das enzimas.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Utilizar extrato multienzimático produzidos por fermentação em estado sólido da palma forrageira com fungo *Aspergillus niger*, no pré-tratamento das folhas de *Mentha arvensis L.* para otimizar o processo de extração por hirodestilação.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a utilização da biomassa de palma forrageira, como meio de cultivo na FES, para produção de enzimas lignocelulósicas, utilizando o *Aspergillus niger*.
- Otimizar o tempo de extração de óleos essenciais com aplicação de extratos multienzimáticos nas folhas de *Mentha arvensis L.*
- Verificar através de estudo micromorfológico (Microscopia Eletrônica de Varredura) os possíveis danos causados as estruturas secretoras (tricomas) por meio da ação das enzimas.
- Comparar a presença do constituinte aromático majoritário do óleo essencial da espécie vegetal com e sem presença dos extratos multienzimático (análise cromatográfica gasosa), obtido por fermentação da palma forrageira usando a espécie fúngica *Aspergillus niger*.

## 1.3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 1.3.1 Gênero *Mentha*

As plantas do gênero *Mentha*, popularmente denominadas de “mentas” são espécies aromáticas ricas em óleo essencial. O gênero *Mentha* compreende cerca de 30 espécies que se desenvolvem em diversas regiões da Europa, Ásia, Austrália, África do Sul e América do Sul (DORMAN et al., 2003).

Dentre as espécies mais populares destaca-se a *Mentha arvensis*. A *Mentha arvensis*, foi introduzida no Brasil pelos japoneses e ficou conhecida como hortelã-japonesa ou vique. É uma planta medicinal e aromática pertencente à família das Lamiaceae, produtora de um óleo essencial rico em mentol, cujas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos lhe atribui uma grande importância econômica (DESCHAMPS, 2006).



**Figura 1.1** – Espécie *Mentha arvensis* L., popularmente conhecida como hortelã - japonesa. Fonte: A autora.

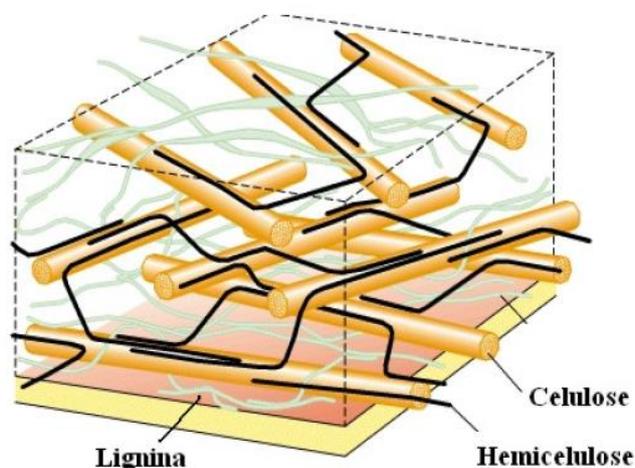
### 1.3.2 A Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal é formada por uma estrutura de celulose, hemicelulose e ligninas em ligações cruzadas, submersas em uma matriz de substâncias pécticas e reforçadas

com proteínas estruturais e substâncias aromáticas. A parede celular está dividida em níveis estruturais como: parede primária, parede secundária e lamela média.

A parede primária possui um percentual de aproximadamente 70% de água, os 30% restantes correspondem à matéria seca que está representada em sua maioria por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina). A parede secundária é composta principalmente por celulose apresentando também lignina, enquanto, a lamela média preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose (PRADE et al., 1999).

A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de glicose ligadas entre si através de ligações  $\beta$ -1,4, formando microfibras. Estas microfibras se entrelaçam, formando finos filamentos, denominados macrofibrilas. As moléculas de celulose possuem duas regiões, cristalina e amorfa, sendo a região cristalina impermeável à água e resistente à degradação química e biológica, pois apresenta um número elevado de interações moleculares intra e internamente, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Já a região amorfa é facilmente hidrolisável, pois nesta região há menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (PERCIVAL et al, 2006).



**Figura 1.2:** Estrutura da parede celular vegetal representando as fibras de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: SANTANA, 2010.

As hemiceluloses são polímeros constituídos de vários monossacarídeos, principalmente de D-xilose e por outras subunidades, com D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glicorônico e ácido galacturônico. A hemicelulose está fortemente ligada à

celulose por grupos de ligações de hidrogênio e também através de ligações covalentes. A xilana, principal polissacarídeo presente na hemicelulose, é um homopolímero linear formado por monômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (LI et al., 2007). As xilanas são encontradas principalmente na parede celular secundária dos vegetais em íntima associação com a celulose por meio de fortes interações estabelecidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waal. A xilana ligada covalentemente com a lignina tem importante papel na manutenção da integridade da celulose, protegendo as fibras contra a ação de celulases (WU et al., 2008).

A lignina é encontrada como parte integral da parede celular, imersa em meio à celulose e hemicelulose. A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropanóides ramificados dispostas aleatoriamente formando uma macromolécula tridimensional e amorfa (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). A lignina representa um dos maiores estoques de carbono e energia da natureza e é, ainda, o maior depósito natural de estruturas químicas aromáticas.

Como a parede celular vegetal é composta por essa estrutura resistente de celuloses, hemiceluloses, ligninas e substâncias pécticas, faz-se necessário a ação de um conjunto de enzimas degradadoras para romper a parede celular vegetal.

### 1.3.3 Óleos Essenciais

Óleos essenciais também denominados óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, de acordo com suas características físico-químicas, podem ser definidos como compostos químicos voláteis, menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em baixas concentrações, em glândulas especiais da planta, denominadas tricomas (NAVARRETE et al., 2011).

De acordo com Alves (2012) o armazenamento dos óleos essenciais no corpo vegetal pode ocorrer em diversos órgãos como flores, folhas, cascas do caule, frutos, sementes. Nas espécies de mentas os óleos essenciais estão concentrados nas folhas isso porque, são nas folhas que se encontram a maior quantidade células especializadas em sintetizar e armazenar o óleo essencial, as células específicas para a produção de óleo da família Lamiaceae são denominadas de tricomas glandulares (MORAIS et al.,2006).

O óleo essencial da *Mentha arvensis* é rico no monoterpeno mentol que confere sabor e aroma de menta a remédios, balas, creme dental e outros produtos da indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (UPADHYAY et al., 2014).

O mentol é uma molécula pertencente à classe dos monoterpenos, compostos do metabolismo secundário das plantas. Sua biossíntese compreende 8 reações metabólicas e uma complexa organização espacial, envolvendo enzimas localizadas nos plastídeos, no retículo endoplasmático, mitocôndrias e citoplasma (WILDUNG e CROTEAU, 2005). O MEP (metil eritritol fosfato) plastídico é a primeira molécula nessa cadeia de reações, originando o geranyl difosfato que, pela ação da enzima limonenosintase é convertido em limoneno, composto que dá origem à maioria dos terpenos do óleo essencial de *Mentha*. O mentol é derivado direto da mentona pela ação da enzima citoplasmática mentona redutase.

### 1.3.4 Processos de Extração de Óleo Essencial

Para a remoção de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, utilizam-se diferentes métodos de extração. Dentre os processos convencionais destacam-se; a hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, enfloração, sendo os métodos mais utilizados a hidrodestilação e destilação por arraste a vapor devido à simplicidade e economia do processo (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Dentre esses processos algumas desvantagens podem ser citadas como, por exemplo, o emprego de solvente por apresentar o inconveniente de retirar junto com o óleo essencial, ceras e pigmentos da matéria-prima, que são caracterizados como contaminantes do óleo, causando indesejáveis efeitos colaterais na qualidade do produto final, além elevar o custo do processo, pois é difícil remover todo o solvente residual sem um grande dispêndio de energia, também vale mencionar os equipamentos utilizados para a extração de óleo essencial por fluido supercrítico possuem elevado custo (BELO, 2009).

Na literatura podem-se encontrar vários trabalhos sobre a extração de óleo essencial por diferentes métodos, sendo possível observar que mesmo com os processos físicos e mecânicos utilizados o teor do óleo essencial obtido é baixo. Alves (2012), estudando a extração do óleo essencial das folhas secas da *Mentha arvensis* obteve um teor de óleo essencial equivalente a 0,23%. O teor de óleo essencial de folhas frescas para *M. arvensis* encontrado por Garlet et al. (2007) variou entre 0,79 e 1,07 %. Em estudos realizados por Watanabe et al.(2006), avaliando a extração do óleo de *Mentha arvensis* através da destilação por arraste a vapor e extração com etanol, alcançaram um teor de óleo igual a 0,5% , mais vale citar que o tempo utilizado durante a extração durou 1 hora.

Há poucos relatos na literatura sobre a extração de óleos essenciais através de tratamento enzimático. Porém, muitos estudos vêm sendo realizado sobre a extração de óleos vegetais, a partir do uso de enzimas específicas associada simultaneamente a processos mecânicos. As enzimas promovem a degradação da parede do tecido celular vegetal facilitando a remoção do óleo vegetal dos vacúolos intracelulares (SANTOS e FERRARI, 2005). A tecnologia enzimática na indústria de óleos vegetais pode ser aplicada através de extração combinada.

Na extração combinada, a enzima é adicionada durante a etapa de cozimento, antes da prensagem do grão ou polpa, ocasionando uma pré-ruptura do tecido celular e aumentando o rendimento da prensagem (SANTOS, 2008). Preferencialmente, essa etapa deve ser efetuada na temperatura de máxima atividade das enzimas. A concentração do extrato enzimático deve ser otimizada e, por questões de viabilidade econômica, deve ser inferior a 0,1% em relação ao peso da matéria prima. A grande vantagem da extração combinada está associada ao fato de não se alterar nenhuma etapa do processamento convencional, além de aumentar o rendimento do óleo essencial.

Na realização deste trabalho, foi possível aplicar a solução multienzimática nas folhas de *Mentha arvensis* e após o pré-tratamento conduzir a extração do óleo por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. A extração combinada com processo multienzimático pode possibilitar a ruptura da parede celular vegetal, pois as multienzimas possuem diferentes atividades como; celulases, xilanases, proteases, pectinases, que atuam sobre a superfície do material vegetal causando danos na epiderme foliar, atingindo os tricomas promovendo dessa forma, a extração do óleo essencial.

### **1.3.5 Enzimas Degradadoras da Parede Celular Vegetal**

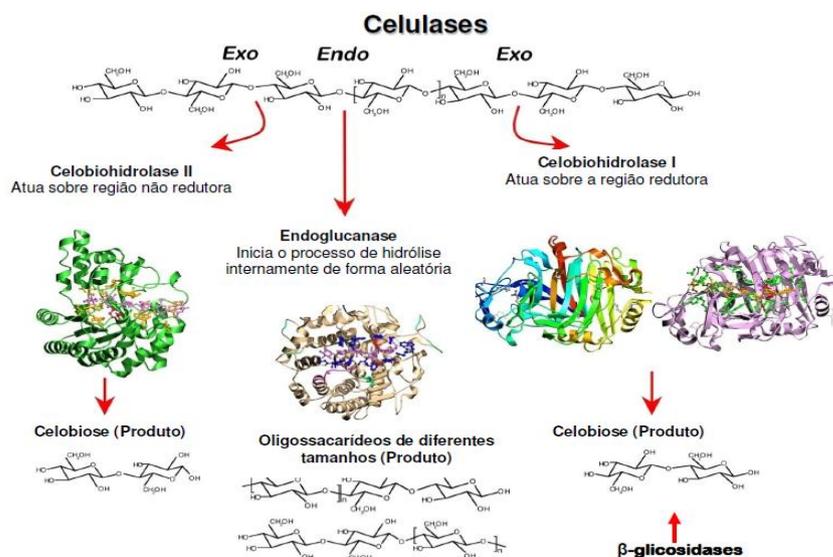
O resultado da associação dos diferentes tipos de polímeros que compõem a matéria vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), o grau de cristalinidade e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina, obtém-se um material de estrutura rígida e muito resistente ao ataque enzimático, dessa forma a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente a partir das extremidades susceptíveis (LIMA, 2007). Logo, as enzimas que são proteínas com função específica de acelerar reações químicas por meio de catálise, podem ser utilizadas para facilitar o processo de degradação da parede celular vegetal.

Como a parede celular vegetal é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, é necessário que as multienzimas possuam diferentes atividades como; pectinases,

celulases, xilanases e proteases para ocasionar a ruptura da parede celular (SAHA et al., 2006).

### 1.3.5.1 Celulases

As celulases são enzimas que fazem parte da família das glicosil -hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações  $\alpha$ -1,4 entre as moléculas de glicose (HAICHAR et al., 2007). A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, que em conjunto, constituem um complexo de enzimas celulases.



**Figura 1.3:** Mecanismo de ação do complexo enzimático. Fonte: Google imagem.

As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em moléculas menores. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. As endoglucanases também são conhecidas como celulases e carboximetil celulase. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável em carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose cristalina),  $\beta$ -glicana e xilana (PERCIVAL ZHANG et al, 2006).

As exoglucanases são enzimas que atacam as unidades de celobiose nas terminações deixadas pelas endoglucanases. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática: 1,4- $\beta$ -D-glucana-hidrolases e celobiohidrolase. Celobiohidrolase pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) e possuem ação limitada sobre substratos de carboximetil celulose e hidroxetilcelulose (CASTRO e PEREIRA, 2010).

As  $\beta$ -1,4-glicosidases, que hidrolisam a celobiose liberando glicose. As  $\beta$ -glicosidases tem um papel importante na hidrólise de materiais lignocelulolíticos. A celobiose, principal substrato para a  $\beta$ -glicosidase é um potente inibidor de exocelulases e sua ausência diminui o processo de sacarificação das biomassas (ALMEIDA, 2009; LYNDY *et al.*, 2002).

#### **1.3.5.2 Hemicelulases**

As hemicelulases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos entre elas, as mais importantes são as xilanases (hidrolisam ligações do tipo  $\beta$ -1,4 entre as unidades de xilose), as arabanases e as  $\beta$ -glicanases (KOBBLITZ, 2010). Devido à sua complexa estrutura, a degradação completa da xilana requer a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As Endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase) clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando na diminuição do grau de polimerização do substrato e as  $\beta$ -D-xilosidases: ( $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolase) hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose. As  $\beta$ -xilosidases purificadas geralmente não hidrolisam xilana, sendo a xilobiose seu melhor substrato (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006).

#### **1.3.5.3 Enzimas Ligninolíticas**

Segundo SANTOS *et al.*, (2011) a degradação da lignina pode ser compreendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares (grupo de oxidoredutases-representadas por peroxidases, lacases, manganês peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de metabólicos intermediários de baixa massa molecular) as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso.

A lacase é uma das enzimas que participa do processo de degradação de material lignocelulósico, por ser um polifenol oxidase que contém quatro núcleos de cobre, sendo capaz de oxidar o substrato utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons. Entre os substratos oxidados pela lacase destaca-se; orto e n-difenol além de compostos aromáticos contendo hidroxila e grupos amino.

No processo de degradação da lignina, LiP que é uma heme proteína monomérica com massa molecular de cerca de 40 KDa, é inicialmente oxidada pelo  $H_2O_2$  e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente  $H_2O$ ) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática” onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos (MOREIRA, 2006).

A Manganês peroxidase (MnP) é a mais comum das ligninas peroxidase modificadas que desempenha um papel crucial na degradação da lignina. As MnPs são glicoproteínas, que oxidam  $Mn^{2+}$  e a  $Mn^{3+}$ , sendo este último cátion responsável por oxidar unidades fenólicas (fenóis monoaromáticos e compostos aromáticos) da lignina, estando envolvido na sua fragmentação (SANTOS *et al.*, 2010).

### **1.3.6 Fermentação em Estado Sólido**

Dentre os processos usados para a produção de enzimas, a fermentação em estado sólido (FES) é tida como uma técnica de baixo custo, pois neste processo ocorre o crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido, que pode ser usado como fonte de carbono e energia, com a mínima quantidade de água livre entre as partículas (PANDEY, 2002).

O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de micro-organismos, principalmente leveduras e fungos filamentosos. Durante a fermentação em estado sólido, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais, as enzimas (MITCHELL *et al.*, 2006).

A técnica de FES tem recebido uma maior atenção dos pesquisadores, tanto para produção de enzimas, quanto para obtenção de substâncias de interesse da indústria de alimentos, pois tem mostrado que pode ofertar maior produtividade ou produtos com melhores características do que a fermentação submersa (ROBINSON e NIGAM, 2003).



**Figura 1.4:** Representação Fermentação em Estado Sólido. Fonte: A autora.

### 1.3.6.1 Biomassa - Palma Forrageira

A palma forrageira (*Nopalea coccinellifera*) é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semiárido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo. A composição química relativa possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis também são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, devendo serem destacados os teores de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) (CHIACCHIO et al. 2006), além de baixos teores de matéria seca ( $11,69 \pm 2,56\%$ ), proteína bruta ( $4,81 \pm 1,16\%$ ), fibra em detergente neutro ( $26,79 \pm 5,07\%$ ) e fibra em detergente ácido ( $18,85 \pm 3,17\%$ ) (SANTOS *et al.*, 2011a).

O aproveitamento de biomassa vegetal regional é importante para reduzir os custos de produção de biocompostos. Por ser rica em macro e micro nutrientes a palma forrageira pode ser utilizada como suporte na fermentação em estado sólido.

### 1.3.6.2 Micro-organismos utilizados na Fermentação em Estado Sólido (FES)

Os micro-organismos utilizados na Fermentação em Estado Sólido (FES) podem ser, tanto bactérias, leveduras como os fungos filamentosos, pois estes crescem em substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os micro-organismos mais adaptáveis a este tipo de processo. Os fungos filamentosos sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas,

sendo os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* os principais produtores de enzimas, responsáveis por 20% da produção do mercado mundial.

O *Aspergillus niger* é um bom produtor de várias enzimas tais como pectinesterase, endo e exopoligalaturonase, pectina liase (GRASSIN *et.al*, 1999). Em estudos anteriores, Pandey *et al.*,(1999), relataram que o *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase,  $\beta$ -glucosidase e protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação.

### 1.3.6.3 Enzimas Produzidas

Neste trabalho a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger* foi possível produzir e quantificar as atividades de; CMcase, FPase, Xilanase, Lacase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Amiloglucosidase.

Em estudos realizados por Yon *et al.*,(2014), foi possível produzir celulases a partir da fermentação em estado sólido sobre o farelo de arroz e de milho por *Aspergillus niger*.

Santana *et al.*,(2012), estudando a fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger* obtiveram a produção de amiloglucosidase. Tavares (2012), observou que através do processo fermentativo em estado sólido dos substratos de caju e acerola por *Aspergillus niger*, foi possível a produção enzimática de celulases, corroborando com Santos (2012), que obteve bons resultados das atividades enzimáticas de celulases totais e endoglucanases a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger*.

## 1.4 Considerações Finais

A utilização de extratos multienzimáticos obtidas por meio da fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger* pode ser uma alternativa viável na extração de óleos essenciais, tornando o processo mais econômico por reduzir o tempo de extração e energia do processo.

Este é o primeiro relato a avaliar o teor de óleo essencial das folhas de *Mentha arvensis*, e concomitantemente os danos causados aos tricomas (células armazenadoras do óleo essencial) através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

## 1.5 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M. N. **Celulases e hemicelulases de espécies de Acremonium Endofíticos**. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa do programa de pós-graduação em Bioquímica, 2009.

BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. de J. ; SIGNOR, D.; ALVES, M. A.; LIMA, F. I. de; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. de P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v.27, p. 35-39, 2009.

CASTRO, A.M. de; CARVALHO, M.L. de A. de; LEITE, S.G.F.; PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, n.1, p.151-158, 2010

CHÁVEZ, R., BULL, P., EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v.123, p. 413–433, 2006.

DORMAN, H. J; KOSKAR, M.; KAHLOS, K; HOLM, Y.;HILTUNEN, R. Antioxidant propriets and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food**,California, v. 51, n 16, p. 4563-4569, 2003.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (org.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**.Caxias do Sul: Educs, 2004, 510 p.

GARLET, T. M. B; SANTOS, O. S.; MEDEIROS S. L. P. ;MANFRON, P. A;GARCIA, D. C.; SINCHAK, S.S. Crescimento e teor de óleo essencial de mentas com diferentes concentrações de potássio na solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**,v. 25, p. 230-237, 2007.

GHORAI,S.,BANIK,S.,VERMA,D.,CHOWDHURY,S.,MUKHERJEE,S.,KHOWALA,S.Fungal Biotechnology in food and feed processing.**Food Research International**,v.42,n.1,577-587,2009.

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.

KOBLITZ, B.G.M. **Bioquímica de Alimentos; Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LI, L.; ZHU, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; CHEN, W. Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on metal-chelate Eupergit C 250L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 278 – 285, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**.2<sup>a</sup> ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas utilizadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 3ed. Fortaleza: Imprensa universitária, 2007. 394p.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.19, Heidelberg, 2006.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M.J. **Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment**. I&EC Research, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999a.

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.

PERCIVAL ZHANG, Y. H; HIMMEL, M. E; MIELENZ, F; MUTJE, P. Enzyme deinking of old newspapers with cellulose.**Process Biochemistry**, v.24, p.452-481, 2006.

ROBINSON, T. E NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197-203, 2003.

SAID, S.; PIETRO R.C.L.R.**Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto. 2004.

SANTANA, M. Produção,**Caracterização,Aplicação e Determinação Estrutural de Celulase de *Moniliophthora pernicios***.15p. 2010 (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana-Ba.

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, 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**, v .41, n.12, p.2210 -2216, 2011.

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.

WILDUNG, M. R.; CROTEAU, R. B. Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. **Transgenic Research**, n. 14, p. 365-372, 2005.

WU, H.; PEI, J.; WU, G.; SHAO, W. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 230 - 234, 2008.

YON, L. W.; ANG, N. T.; NGOH, G. C.; CHUA, M. S. A. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201, 2011.

## CAPÍTULO II

### **Produção de extrato multienzimático por fermentação em estado sólido sobre a palma forrageira por *Aspergillus niger*.**

#### **Resumo:**

As enzimas microbianas são um dos produtos biotecnológicos mais utilizados nas últimas décadas, sendo produzidas por uma grande variedade de micro-organismos e substratos de diversas origens. O presente trabalho teve por objetivo a produção de extrato multienzimático por fermentação em estado sólido da palma forrageira com *Aspergillus niger*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. As fermentações sólidas foram realizadas em Erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma, ao qual foi adicionada uma suspensão contendo  $10^7$  esporos por grama de substrato. Foram adicionados volumes de água estéril (12,5 mL) o que equivale a uma atividade de água aproximada de 0,985. Os cultivos foram conduzidos a 30°C em estufa bacteriológica. As incubações ocorreram à temperatura de 30°C, durante 96 horas e com umidade 60%. As atividades enzimáticas foram quantificadas para; Carboximetilcelulase (3,35 U/mL), Celulases Totais (17,32 U/mL), Xilanase (35,23 U/mL), Lacase (1,17 U/mL), Lignina Peroxidase (2,34 U/mL), Mn Peroxidase (1,13U/mL) e Amiloglucosidase (2,24 U/mL). Durante os processos fermentativos o fungo sintetizou e excretou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor além da palma forrageira e água, demonstrando a viabilidade de utilização da palma forrageira como matéria-prima para o bioprocesso.

**Palavras-chave:** fungos filamentosos, *Nopalea cochenillifera*, biotransformação.

**Multienzymatic extract production by solid state fermentation on the cactus by *Aspergillus niger*.**

**Summary:**

Microbial enzymes are one of the most biotechnological products used in the past decades and is produced by a wide variety of microorganisms and substrates of various origins. This work aimed at the production of enzymatic extract by solid state fermentation of cactus with *Aspergillus niger*. The experiments were conducted in the Microbiology Laboratory of Agro-Industry, the State University of Santa Cruz - UESC. The solid fermentations were carried out in flasks containing 10g of palm meal, to which was added a suspension containing  $10^7$  spores per gram of substrate. Sterile water were added (12.5mL) which is equivalent to an approximate water activity of 0.985. The cultures were conducted at 30° C in a bacteriological incubator. Incubations were at 30° C for 96 hours and 60% humidity. The enzymatic activities were quantified for; Carboxymethylcellulase (3.35 U/mL) Total cellulases (17.32 U/mL), Xylanase (35.23 U/mL), laccase (1.17 U/mL), lignin peroxidase (2.34 U / mL), manganese peroxidase (1,13U / mL) and Amyloglucosidase (2.24 U/mL). During the fermentation process the yeast enzyme synthesized and excreted without any inducer. Apart from cactus and water, demonstrating the feasibility of the use of fresh feedstock palm for the bioprocess.

**Keywords:** filamentous fungi, *Nopalea cochenillifera*, biotransformation.

## 2.1 Introdução

A palma forrageira é uma cactácea do gênero *Nopalea*, originária do continente Americano, sendo o México o centro de sua origem. Devido às suas características morfofisiológicas, essa cactácea é uma cultura bastante adaptada ao semiárido brasileiro. De acordo com Dessimoni et al.,(2014), a palma forrageira possui grande quantidade de água, é rica em resíduos minerais como cálcio, magnésio, sódio e potássio e vitaminas A, C e do complexo B, apresenta elevado teor de carboidratos solúveis, além de alto coeficiente de digestibilidade da matéria seca, essas características fazem da palma uma ótima biomassa para a fermentação em estado sólido na tentativa de produzir compostos de alto valor agregado.

Devido à sua composição essa biomassa vegetal apresenta potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, medicamentos, enzimas e compostos de aroma, entre outros, além de ser utilizada nas regiões semiáridas como alimento para animais (SOCCOL et al., 2010). Dentre esses biocompostos, as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais. As enzimas são utilizadas com a finalidade de aumentar a eficiência dos processos industriais, entretanto, o uso de enzimas purificadas eleva o custo do procedimento. Diante disso, o uso da palma forrageira como matéria-prima para bioprocessos, viabiliza a produção de extrato multienzimático, tornando economicamente viável a aplicação destas enzimas em diversos processos tecnológicos.

Nesse sentido, avaliou-se nesta etapa a viabilidade da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) produzida em abundância no semiárido brasileiro na produção de multienzimas, utilizando como agente da fermentação o fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1 Obtenção e Preparação do Farelo de Palma Forrageira

As amostras foram coletadas no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Campus de Itapetinga. Após a higienização a palma foi cortada em tiras, secos em estufa de secagem e circulação de ar a 65°C por 24 horas (SOLAB), e triturados em moinho tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulométrica aproximada de 2 mm. O teor de água inicial foi de 2% quantificado em determinador de umidade infravermelho (MARTE

ID200). A massa seca foi 12%, determinada em estufa de secagem a 105°C (DELEO-A3 SEDT) por 24 horas.

### **2.2.2 Preparo do Inóculo**

Os micro-organismos *Aspergillus niger* foram obtidos através de cepas pertencentes ao Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais LABRA da UESB, campus de Itapetinga.

Para obtenção dos inóculos, os micro-organismos foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio sólido Potato Dextrose Agar, HIMEDIA acidificado para *A. niger*. Foram incubados por 7 dias em estufa a 30° C.

A solução de esporos foi obtida através da propagação das culturas esporuladas de *Aspergillus niger*. Após a propagação, os esporos foram recuperados em solução de água destilada estéril contendo Tween 80 (vetec) a (0,01%). O número de esporos em suspensão foi quantificado em câmara de Neubauer duplamente espelhada. A concentração utilizada em todos os testes foi de  $10^7$  esporos/ mL.

### **2.2.3 Bioprocesso – Fermentação em estado sólido**

Foi utilizado erlenmeyers de 125 mL como biorreatores para o processo fermentativo tendo como meio de cultivo o farelo de palma forrageira. Foram pesados 10g da biomassa e submetidos à esterilização em autoclave a 121°C e 1,0 atm de pressão por 15 minutos. Após resfriamento, foi inoculada sobre o farelo de palma a suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/grama da biomassa. As fermentações foram conduzidas em estufas bacteriológicas B.O.D a 30°C durante 96 horas. O cálculo do volume de água adicionado para se chegar à umidade desejada (60%) foi realizado mediante o conteúdo de matéria seca da biomassa vegetal, através do determinador de umidade infravermelho MARTE ID200. As condições do processo fermentativo com temperatura de 30°C, tempo de 96 horas e umidade de 60% foi descrita por Santos (2012).

### **2.2.3 Obtenção do extrato multienzimático**

Para a obtenção dos extratos enzimáticos após o processo fermentativo do farelo de palma forrageira, foi adicionado em cada biorreator 50 mL de solução tampão de citrato de

sódio (pH 4,8 a 50 mM). Os extratos foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro. A extração foi realizada por prensagem manual para a obtenção do extrato bruto enzimático, o qual foi centrifugado a 15.115 x g por 15 minutos em centrífuga (Heraeus Megafuge 16R) para remoção de sólidos mais finos, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (SANTOS *et al.*, 2011(a)).

## **2.2.4 Determinação da atividade enzimática**

### **2.2.4.1 Atividade de Carboximetilcelulase (endoglucanase)**

A atividade da enzima CMCase (endoglucanase) foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação da carboximetilcelulose ou CMC (SIGMA) a 2% (p/v) diluído previamente na solução tampão citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 250 µL de extrato enzimático e 250 µL de CMC. Para o controle da reação foram adicionados 250 µL da solução tampão citrato de sódio e 250 µL de extrato enzimático. No branco da análise foi adicionado 250 µL de CMC e 250 µL de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C durante 10 minutos e a interrupção da reação foi realizada com a adição de 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submersos em água fervente por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 5,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi medida na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto (GHOSE, 1987).

### **2.2.4.2 Celulases Totais (complexo endoglucanases e exoglucanases)**

A atividade de celulases totais abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959) através dos açúcares redutores liberado pela degradação de uma tira de papel filtro Whatman n°1 (1,0 cm x 6,0 cm). Nos tubos reacionais foram adicionados 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM e 0,5 mL do extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Para o controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, e no branco da análise foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro.

As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS e todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto (GHOSE, 1987).

#### **2.2.4.3 Atividade da Xilanase**

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo MILLER (1959) através da liberação de açúcares redutores pela hidrólise da xilana. Nos tubos reacionais foram adicionados 125µL de extrato enzimático e 125µL de solução xilana 1% (SIGMA) diluída em tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM. Para o controle da reação, foram adicionados 125µL da solução tampão citrato de sódio e 125µL de extrato enzimático, enquanto no branco para zerar o espectrofotômetro foram adicionados 125µL da solução tampão citrato de sódio e 125µL de solução xilana 1%. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 250 µL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto (GHOSE, 1987)..

#### **2.2.5.4 Atividade da Lacase**

A atividade de lacases foi determinada utilizando-se como substrato 0,1 mL de uma solução etanólica de siringaldazina (4-hidroxi-3,5-azino-metoxibenzaldeído) em concentração de 1 mM . A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 5,0 e 0,6 mL de multienzimas não purificadas. A reação foi quantificada após 10 minutos através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (BELPHOTONICS 2000 UV) no comprimento de onda de 525 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar dos substratos oxidados ( $\epsilon_{525} = 44.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (SZKLARZ *et al.*, 1989).

#### **2.2.5.5 Atividade Enzimática Lignina Peroxidase**

Foram utilizados seis tubos de ensaios de 10x100 mm, três para as amostras não fervidas e os demais para as amostras fervidas. Foi adicionado em cada tubo 0,6 mL da amostra a ser analisada, 0,2 mL do tampão citrato-fosfato, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de siringaldazine. Depois foi feita outra medição no tempo final após 10 minutos. De cada tubo foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas no comprimento de onda 460 nm ( $\epsilon_{460} = 29400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (ARCHIBALD, 1992).

#### **2.2.5.6 Atividade Enzimática de Manganês Peroxidase**

A manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1% (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste continuado do pH em 7,4) em 1,25 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio, 0,5 mL de albumina (1%), 0,5 mL de MnSO<sub>4</sub> 1 mM, 0,5 mL da mistura contida no tubo de ensaio, foi removida e a esse volume foi feita a adição de 30 µL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada a partir da absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ( $\epsilon_{610} = 65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (ANASTASI *et al.*, 2009).

#### **2.2.5.7 Atividade Enzimática da Amiloglucosidase**

A atividade amiloglucosidase é determinada pela liberação de açúcares redutores, dosados pelo método DNS (Miller, 1959) citado por COSTA (1996), descrito por SOCCOL (1992) e por PANDEY *et al.*, (2005). Os açúcares são expressos em glucose equivalente. Uma unidade de amiloglucosidase é definida como sendo a quantidade de enzima liberada por 1 µmol de açúcar redutor (expresso como glucose) por minuto nas condições de ensaio (Alazard e Raimbault, 1981) citado por SOCCOL (1992).

A amiloglucosidase foi quantificada através da adição de 1 mL de uma solução contendo 1% de amido solúvel (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0 (Vetec) e 1 mL do extrato multienzimático em tubos de ensaio esses foram incubados por 30 minutos a

37° C em incubadora de bancada com agitação orbitalar (Quimis). Os açúcares redutores produzidos nessa incubação foram quantificados pela técnica de Miller (1959).

## 2.2.6 Resultados e Discussão

A palma forrageira foi utilizada como fonte de macro e micro nutrientes, sem a adição de qualquer substância enriquecedora, servindo de matriz sólida para o crescimento do micro-organismo selecionado (PANDEY et al., 2000). Na Tabela 2.1 estão descritos os valores experimentais obtidos para as enzimas CMCCase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase e Amiloglucosidase.

**Tabela 2.1** Valores experimentais para as atividades de produção das enzimas, CMCCase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase e Amiloglucosidase.

Atividade Enzimática( U/mL)	
CMCase	3,35
FPase	17,32
Xilanase	35,23
Lacase	1,17
Lignina Peroxidase	2,34
Mn Peroxidase	1,13
Amiloglucosidase	2,24

\*Atividade Enzimática quantificada a U/mL; valores obtidos a partir da média de três repetições experimentais.

A produção enzimática está associada às condições de cultivo, (temperatura, tempo e umidade). Neste trabalho as incubações ocorreram a 30°C durante 96 horas com umidade de 60%. Nestas condições o fungo filamentos, *Aspergillus niger*, produziu diferentes enzimas, sendo analisadas as atividades de carboximetilcelulase, celulasas totais, xilanase, lacase, lignina peroxidase, Mn peroxidase e amiloglucosidase.

A atividade enzimática da carboximetilcelulase (CMCase) pelo fungo filamentos *A. niger* foi igual a 3,35 U/mL. A produção desta enzima foi favorecida pela composição da

palma forrageira que é rica em nutrientes fornecendo condições adequadas ao crescimento do micro-organismo. Para essa enzima específica, o valor obtido no presente trabalho é superior ao descrito por Ferreira (2011), que relatou valor máximo de CMCase de 3 U/mL utilizando a fermentação em estado sólido do farelo cajá por *Aspergillus niger*, em cultivo de 72 horas com 50 % de umidade. Tavares (2012), relatou que 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 dois resíduos, apresentando um pico de atividade enzimática de 6,79 U/mL para o resíduo de caju, e de 11,7 U/mL para o resíduo de acerola.

No entanto, a comparação dos resultados de diferentes estudos é limitada dada às diferenças no tipo de substrato e nas condições operacionais utilizadas. Franco (2010), por exemplo, reporta valores de atividade de CMCase superiores a 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.

Em relação à enzima celulase total (FPase), a atividade enzimática obtida foi de 17,32 U/mL. Apesar do *A.niger* ser um fungo que geralmente apresenta uma produtividade inferior em termos de FPase quando comparada aos fungos do gênero *Trichoderma*, os dados aqui apresentados são superiores aos valores máximos de FPase obtidos por Latifian *et al.* (2009), utilizando o *Trichoderma reesei* substrato farelo de arroz (2,3 U/mL). Os valores máximos encontrados por Tavares (2012), foram de 4,09 U/mL para o resíduo de caju e 4,80 U/mL para o resíduo de acerola respectivamente, o tempo de fermentação de 48 horas e atividade de água de 0,969 com umidade de 50%.

A diferença entre o valor da atividade enzimática encontrada neste trabalho para os resultados de trabalhos na literatura pode ser devido, à composição dos diferentes substratos, uma vez que a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo micro-organismo agente da fermentação. A atividade da FPase também constitui um fator importante na avaliação para a escolha da melhor condição de produção do extrato enzimático bruto, 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 micro-organismos celulolíticos apresenta atividade de endoglucanase, mas nem sempre apresentam de exo e, por conseguinte, a atividade de FPase é um diferencial (FRANCO, 2009).

A produção de xilanase observada em 96 horas de crescimento do micro-organismo *Aspergillus niger* foi de 35,23 U/mL. Segundo Lee *et al.*(2009), a enzima xilanase produzida

por *Aspergillus* têm despertado um considerável interesse de pesquisa devido aos seus potenciais de aplicações biotecnológicas nos diversos processos industriais, destacando-se na indústria de polpa celulósica e papel, no setor de alimentos e bebidas (clarificação de sucos de frutas e vinhos, etc.), também sendo aplicada na extração de óleo vegetal e outros.

Sales et al.,(2010), estudando a produção de xilanase por meio da fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar por *Aspergillus aculeatus* observaram uma atividade igual a 30,05 U/ mL. A atividade xilanolítica também foi observada por Ladeira (2010), através da fermentação em estado sólido do farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho por *Bacillus sp.*sendo os valores encontrados respectivamente,1,32U/mL ,0,80 U/mL e 0,30 U/mL. Nos trabalhos citados para atividade desta enzima, é possível observar que o fungo *Aspergillus niger* apresentou uma maior produtividade em termos de xilanase quando comparado aos demais fungos, outra condição a ser apontada são os substratos utilizados que apresentam diferentes composições que influenciam no crescimento do micro-organismo.

Em relação à enzima lacase a atividade obtida neste trabalho foi de 1,17 U/mL.Santos et al. (2011(b)) relataram a atividade da lacase utilizando a fermentação em estado sólido do farelo de cacau por *Aspergillus niger* igual a 8,49 U/mL em 72 horas de fermentação e umidade de 60%, já nos estudos de Neto et al (2012) com produção de lacases por fermentação em estado sólido do resíduo da pupunha por *Bactris gasipaes*,o valor máximo encontrado nas condições com 50 % de teor de água e a 72 horas de fermentação, a 35 °C foi de 5,17 U/mL. A redução da atividade enzimática da lacase pode ter sido devido ao decaimento dos nutrientes ao longo do tempo de cultivo, interferido na atividade enzimática, provocando a diminuição da produção microbiana e conseqüentemente a produção enzimática (GUPTA, 2010).

Outros trabalhos são citados na literatura, mostrando a produção de lacase, utilizando variados substratos. Utilizando ainda resíduos agroindustriais como substrato, porém acrescidos de fontes de nutrientes, de acordo com Karp et al. (2012), foram encontrados maior produção de lacase de 11,6 U/mL trabalhando com *Pleurotustreatus*,em fermentação no estado sólido em meio a base de bagaço de cana acrescido de levedura, em estudos realizados por D'Agostini et al. (2011), observaram maior atividade de lacase (80 U/mL) de *Pleurotus ostreatus*, utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em fermentação no estado sólido com cascas de soja. Neste trabalho é importante ressaltar que não foi utilizado nem um tipo de indutor, suprimento, além da palma in natura, ou pré-hidrólise do substrato, demonstrando assim que as enzimas são constitutivas.

Em relação ao processo fermentativo deste trabalho, a atividade da enzima lignina peroxidase atingiu o valor 2,34 U/mL e a atividade da enzima Mn peroxidase 1,13 U/mL. Estas enzimas pertencem ao grupo de enzimas dependentes de peróxido de hidrogênio ou peroxidases. Pode ser observado que os valores encontrados para a Mn Peroxidase e Lignina Peroxidase, foram próximas fato que deve estar relacionada ao conjunto estrutural ou arranjo estrutural do resíduo, ou ainda a formação de compostos fenólicos durante a fermentação que induzem estas duas enzimas (SANTOS, 2011).

Nos resultados das pesquisas realizadas por Filho (2011), através da fermentação do bagaço de cana por *Pleurotus sajor* durante 72 horas, verificou-se a atividade da lignina peroxidase e manganês peroxidase com valores respectivamente de 3,47 U/mL e 2,33 U/mL. Santos *et al.*, (2011b) com a utilização do farelo de cacau e *Aspergillus niger* encontraram os valores de  $8,44 \times 10^{12}$  UI/L e  $1,79 \times 10^{11}$  UI/L para Lignina Peroxidase e Mn Peroxidase respectivamente, em 72 horas de fermentação a 30°C. As baixas atividades enzimáticas encontradas para as enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase quantificadas neste trabalho, pode ter sido influenciada pelo tempo de fermentação. Uma pressuposição para este resultado é que a presença de nutrientes dispersos ao longo da fermentação pode ter contribuído para o crescimento do micro-organismo e a deterioração desses nutrientes ao longo do tempo pode ter afetado a produção das enzimas.

A atividade da amiloglucosidase alcançada na realização deste trabalho foi 2,24 U/mL. Em trabalhos anteriores, Mafra (2012), observou que o extrato enzimático bruto obtido a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira por *Aspergillus niger* apresentou uma atividade da amiloglucosidase de 60,32 U/mL em 72 horas com a atividade de água de 0,891.

A redução da atividade enzimática neste trabalho é justificada pelo tempo de fermentação, pois, de acordo com Whitaker (1994) após 72 horas de fermentação ocorre o esgotamento de nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática, geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle que são estimulados ou inibidos por produtos do meio. Porém, Moreira *et al.*, (1999) relataram que a atividade máxima na (144 U/mL) produção de amiloglucosidase por *Aspergillus tamarisii* ocorreu após 120 horas de fermentação, concordando com Alva *et al.*, (2007), que também verificaram uma maior atividade de 16,42 U/mL amilolítica de *Aspergillus* em 144 horas de fermentação.

Segundo Biazus *et al.* (2006), a produção de enzima à princípio é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo, apresentando a melhor atividade enzimática no

terceiro dia de fermentação, sendo a partir desse ponto observada a redução da atividade enzimática.

### **2.2.7 Conclusão**

Os resultados experimentais confirmaram a viabilidade da produção de extrato multienzimático a partir da fermentação em estado sólido utilizando a palma forrageira como substrato e o *Aspergillus niger* como micro-organismo. Vale salientar que o fungo excretou a enzima tendo como indutor ou suprimento apenas o farelo da palma forrageira e a água. O extrato multienzimático obtido apresentou diferentes atividades enzimáticas.

### **2.2.8 Agradecimentos**

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **2.2.9 Referências Bibliográficas**

ALVA, S.et.al.Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi,v.6,n.5,p.576-581,2007.

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.

ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. **Journal of Harzardous Materials**, v. 165, p. 1229-1233, 2009.

ANDRADE, A.T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase 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.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.787-792, 2006.

CASTRO, M.A.; CASTILHO, R.L.; FREIRE, G.M.D. Performance of a fixed-bed solid state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal** v. 93 (2015) 303–308

CHEN, J.; LI, D. C.; ZHANG, Y. Q.; ZHOU, Q. X. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 175-181, 2005.

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.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; SANTOS, D.C. dos; SANTOS, M.V.F. dos; FARIAS, I.; LIRA, M. de A.; MELO, J.N. de; OLIVEIRA JÚNIOR, I.S. de. Desempenho da palma forrageira CV. IPA-20 (*Opuntia fícus-indica*, Mill.) submetida a diferentes espaçamentos e adubações, no agreste e sertão de Pernambuco. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002, Recife-PE. **Anais**, Recife-PE, 2002.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, JL. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Editora Educs, Caixa do Sul, 510p., 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.

- FRANCO, M.N. **Produção de celulases 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.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GUPTA, A.; GAUTAM, N.; MODI, D. R. Optimization of a-amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Bio-technology and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.
- LADEIRA, S.A; Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais para a produção de celulases e xilanas por espécies de *Bacillus sp.*2013. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- LEE, I.Y., JUNG, K.H., LEE, C.H., PARK, Y.H. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. **Biotechnology Letters** 21: 965-969 (2009).
- MAFRA,S.;SAMPAIO,R; SANTANA,G. Z.; FERREIRA, B.R. C.; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira.**Revista Caatinga**, vol. 25, núm. 1,2012, pp. 188-193 Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, Brasil.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, F. G; et al. Produção de amilases por *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p.157-162, 1999.
- NETO, A.M.B.;CARVALHO,A.E.;PACHECO,V.S.C.;FERREIRA,N.A,FRANCO,M. **Produção de amilase por *Aspergillus niger* a partir do resíduo do fruto da pupunheira(*Bactris gasipaes*, Kunth),2011.**

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. Ind ed. New Delhi: **Asiatech Publishers**. 760p, 2005.

SALES, R.M.; MOURA, B.R. PORTO, S.T. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296, nov. 2010

SAID, S.; PIETRO R. C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto. 2004.

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

SANTOS, 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 b.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SILVEIRA, S. T.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of glucoamylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v. 128, n. 2, p. 131-139, 2006.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P. ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825, 2010.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em estado sólido por *Aspergillus Níger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides***. Dissertação Mestrado, 67p. 2012.

TIEN, M.; KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in enzymology**, New York, v. 49, p.161-238, 1988.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed., New York, NY: Marcel Dekker, 1994. 625 p.

### CAPÍTULO III

**O efeito da ação das enzimas no processo de extração de óleo essencial da *Mentha arvensis*.**

**Resumo:**

A utilização de extratos enzimáticos como um pré-tratamento de obtenção de óleos vem adquirindo grande interesse pela indústria biotecnológica, e está sendo uma nova metodologia para redução de custos, pois o processo consome pouca energia. Neste sentido, este trabalho avaliou a aplicação de extratos multienzimáticos, no processo de extração do óleo essencial das folhas de *Mentha arvensis* por hidrodestilação. Os extratos multienzimáticos foram produzidos pelo fungo *Aspergillus niger* durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. O pré-tratamento foi otimizado com auxílio da matriz de Doehlert, as variáveis otimizadas foram; o volume de extrato, a temperatura e o tempo de contato. Estatisticamente, os resultados foram 55 mL de extrato multienzimático, 36°C de temperatura e 128 minutos de tempo. A elevação da massa de óleo extraída foi de 194% e teor de 3,94% em comparação com o controle. Através da avaliação micromorfológica foi observado o rompimento dos tricomas glandulares peltados tanto na face adaxial como abaxial, os tratamentos quando analisados por ANOVA com teste de Tukey a 5% de significância apresentaram diferenças significativas. Por meio da análise de cromatografia gasosa, não foi observado alteração quantitativa ou qualitativa do óleo essencial extraído. Estes resultados demonstraram que o pré-tratamento enzimático pode reduzir o tempo de hidrodestilação, apresentando vantagens do ponto de vista de custo de produção e de integridade do componente majoritário do óleo.

**Palavra-chave:** Extrato enzimático bruto, Hidrodestilação, Tricomas.

## **The effect of the action of enzymes in the essential oil extraction process of *Mentha arvensis*.**

### **Summary:**

The use of enzymatic extracts as a pretreatment to obtain oils has gained interest in the biotechnology industry, and being a new methodology to reduce costs because the process consumes little energy. Thus, this study evaluated the application of multi-enzyme extracts, the essential oil extraction process of the leaves of *Mentha arvensis* by hydrodistillation. The multi-enzyme extracts were produced by the fungus *Aspergillus niger* during solid-state fermentation of cactus. The pretreatment was optimized with the aid of Doehlert matrix variables were optimized; the volume of extract, temperature and contact time. Statistically speaking, the results were 55 ml of enzymatic extract, 36 ° C and 128 minutes of time. The increase in weight of extracted oil was 194% and 3.94% content compared with the control. By micromorphological evaluation was observed disruption of peltate glandular trichomes in both upper side as abaxial, treatments when analyzed by ANOVA with Tukey test at 5% significance significantly different. By gas chromatography analysis, there was no quantitative or qualitative change in the essential oil extracted. These results demonstrated that the enzymatic pretreatment can reduce the time hydrodistillation, with advantages from the standpoint of production cost and oil major component integrity.

**Keyword:** Crude enzymatic extract, Hydrodistillation, Trichomes.

### **3.1 Introdução**

A *Mentha arvensis*, produz um óleo essencial rico em mentol. O mentol é um monoterpeno utilizado pela indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos com a finalidade de conferir sabor e odor de menta a remédios, balas, pastas de dentes e outros produtos da indústria (GARLET et al., 2007)

O óleo essencial pode ficar armazenado em diversos órgãos do vegetal como em flores (laranja), folhas (capim-limão), cascas do caule (canela), madeira (pau-rosa), entretanto, são nas folhas, que se encontra o maior número de estruturas especializadas para síntese e o armazenamento do óleo, sendo que os tricomas glandulares são as estruturas secretoras na família das Lamiaceae (SANTANA, 2013).

Para a remoção dos óleos essenciais vários métodos de extração são utilizados, como; a hidrodestilação, a extração por solventes orgânicos, a destilação a vapor, a prensagem a frio, dentre outros (YUSOFF et al., 2011).

Normalmente, as plantas aromáticas passam por um processo de secagem antes da extração do óleo. A etapa de secagem tem a finalidade de conservar a grande quantidade de material vegetal que será processado, no entanto, o processo de secagem é crítico para qualquer espécie que contenha óleos essenciais, pois estes são substâncias químicas voláteis.

Nesse sentido, a utilização de extratos multienzimáticos no pré-tratamento torna-se favorável, pois ao eliminar a etapa de secagem, minimiza a demanda de energia envolvida no processo. Durante o pré-tratamento enzimático os óleos essenciais são removidos dos tricomas e ficam suspensos em água, fato que não permite sua evaporação.

Muitos trabalhos têm focado o uso de enzimas para produção de glicose; tratamento de resíduos, remoção manchas, clarificação, desengomagem, na extração de chá verde, proteína de soja, aromatizantes e produção de Agar. As enzimas também pode ser utilizado na extração de óleo essencial, pois elas degradam a parede celular vegetal promovendo o rompimento dos tricomas, facilitando a remoção dos óleos essenciais, o que pode ser visualizado através na microscopia eletrônica de varredura.

### **3.2 Material e Métodos**

#### **3.2.1 Coleta do Material Vegetal para Obtenção dos Óleos Essenciais**

O material vegetal utilizado neste projeto, as folhas de *Mentha arvensis*, foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Santa Cruz na cidade de Ilhéus-Ba. Uma excisicata encontra-se depositada no Herbário HUESC sob registro 14.524.

### **3.2.2 Aplicação das Multienzimas nas Folhas de *Mentha arvensis***

Foi realizado um pré-tratamento nas folhas de *Mentha arvensis*, antes da extração do óleo essencial. Este pré-tratamento consistiu na aplicação de multienzimas nas folhas de *Mentha arvensis*. Para isso, foi realizada a pesagem de 30g de biomassa foliar fresca, estas folhas foram colocadas em balão de fundo redondo com boca esmerilhada com capacidade de 1L, onde foi adicionado diferentes concentrações de multienzimas (50 mL, 100 mL e 150 mL) sendo adicionado água destilada até obter um volume final de 500 mL. Posteriormente, os balões foram colocados em banho termostático, onde foram estudadas cinco faixas de temperaturas (30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C), foram avaliadas cinco faixas de tempo (100 min, 115 min, 130min, 145 min e 160 min). Ao término do pré-tratamento estabelecido em cada condição a extração dos óleos essenciais foi conduzida pelo processo de hidrodestilação, onde os balões foram acoplados ao aparelho de Clevenger. Foram desenvolvidos testes controle em todas as etapas do processo. No controle as folhas ficaram submersas em 500 mL de água destilada nas faixas de temperaturas e tempos avaliadas.

### **3.2.3 Extração do Óleo Essencial**

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Fitotecnia na Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC. As amostras foram submetidas ao processo de extração por hidrodestilação usando um aparelho Clevenger. Cerca de 30g de folhas frescas foram colocados em balão de fundo redondo com capacidade de 1L, sendo adicionados água destilada e extrato multienzimático e após o tempo de contato, o processo de extração durou 1 hora. O hidrolato foi extraído com diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro e concentrado.

Os teores foram determinados pela quantificação da massa dos óleos, utilizando balança analítica e expressa em percentual massa/massa (g de óleo por 100g de material vegetal). Os frascos contendo os óleos foram mantidos em resfriamento até o momento da análise cromatográfica. A equação (1) representa a fórmula do teor de óleo:

$$\text{Teor\%} = \frac{\text{g (massa de óleo)}}{\text{g (massa de biomassa foliar fresca)}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.2.4 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. As condições cromatográficas foram: Coluna DB5 (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm); Temperatura inicial de 50°C; Tempo inicial de 5 minutos; Tempo final de 65,33 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 1:30.

Para serem injetadas no CG, todas as amostras de óleo foram diluídas em diclorometano, em uma proporção de 10 µL 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 álcool isoamílico (1 µL).

### 3.2.5 Avaliação Micromorfológica

A análise micromorfológica da superfície foliar para avaliação da integridade dos tricomas foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC-Bahia) utilizando microscópio eletrônico de varredura.

Foram retirados fragmentos de aproximadamente 1,0 cm da região mediana das folhas frescas, folhas frescas que passaram pelo pré-tratamento com as multienzimas, folhas frescas que ficaram submersas apenas em água destilada, que posteriormente foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1M e armazenadas em resfriamento. No período de análise, os fragmentos foram desidratados em gradiente progressivo de acetona, levados à secagem em ponto crítico (marca BAL-TEC, modelo CPD030), fixados a um suporte “Stub” e em seguida metalizados com fina camada de ouro, cerca de 20 a 30 nm de espessura por um sistema de evaporação “sputtering” utilizando o aparelho Sputter Coater, BAL-TEC SCD050. Os fragmentos das folhas de *Mentha arvensis* foram fotografados em cinco replicatas sob aumento X160. A contagem e determinação da frequência dos tricomas foram obtidas através do programa ANATI QUANTI.

### 3.2.6 Análise Estatística

A otimização das variáveis experimentais (volume de extrato enzimático, temperatura e tempo de contato) deste estudo foi realizado utilizando-se a matriz de Doehlert. Segundo a matriz experimental Doehlert, a combinação dos níveis dos fatores estudados originou treze condições experimentais diferentes. Também foi realizada uma triplicata com os valores do ponto central (50 mL, 40°C, 130 min) para possibilitar uma estimativa do erro. A tabela 3.1 demonstra as condições experimentais avaliadas neste estudo.

**Tabela 3.1:** Matriz de Doehlert utilizada para otimização da extração de óleo essencial de *Mentha arvensis*.

Ensaio	Volume (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	50	50	130
2	80	45	115
3	20	45	115
4	80	45	145
5	20	45	145
6	50	40	100
7	50	40	130
8	50	40	160
9	80	35	115
10	20	35	115
11	80	35	145
12	20	35	145
13	50	30	130
14	50	40	130
15	50	40	130

Para a determinação da densidade dos tricomas o experimento foi conduzido a partir do delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, os

dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Extração do óleo essencial

Na tabela 3.2 é possível observar os resultados obtidos para a massa de óleo obtida, o teor de óleo essencial e aumento de massa de óleo extraído em todas as condições avaliadas.

**Tabela 3.2:** Aumento do teor de óleo essencial de *Mentha arvensis*, após 1 hora de extração, utilizando extrato multienzimático obtido do farelo de palma forrageira.

Ensaio	T <sub>e</sub> (°C)	T <sub>em</sub> (min)	V (mL)	*MSE (g)	*TSE (%)	MCE (g)	TCE (%)	AOE (%)
1	50	130	50	0,2144	2,99	0,2267	3,16	5,73
2	45	115	80	0,1982	2,76	0,2367	3,29	19,42
3	45	115	20	0,1226	1,70	0,152	2,11	24
4	45	145	80	0,0688	0,095	0,2022	2,82	193,8
5	45	145	20	0,0952	1,32	0,1977	2,75	107,6
6	40	100	50	0,1846	2,57	0,251	3,50	36
7	40	130	50	0,1058	1,47	0,2718	3,79	156,8
8	40	160	50	0,1231	1,71	0,2294	3,19	86,35
9	35	115	80	0,1949	2,71	0,2195	3,06	12,62
10	35	115	20	0,1943	2,70	0,2089	2,91	7,51
11	35	145	80	0,1617	2,25	0,2388	3,33	47,7
12	35	145	20	0,1726	2,40	0,2035	2,83	18
13	30	130	50	0,1705	2,37	0,2541	3,54	49,03
14	40	130	50	0,0965	1,34	0,2831	3,94	194
15	40	130	50	0,0852	1,18	0,2255	3,14	164,67

T<sub>e</sub>= temperatura / T<sub>em</sub> = tempo / V= volume / TSE=teor de óleo obtido sem enzimas / MSE=Massa de óleo extraído sem enzimas / MCE=Massa de óleo extraído com enzimas / TCE=Teor de óleo obtido com auxílio de enzimas / AOE = Aumento da massa do óleo extraído (%).

\*As amostras que não receberam tratamento enzimático foram submersas apenas em água destilada (500 mL).

O resultado de aumento da massa de óleo extraído nos ensaios 4 e 14(193,8% e 194%), confirmam a viabilidade do uso dos extratos multienzimáticos na extração dos óleos essenciais.

Os resultados obtidos na elevação do teor de óleo demonstraram que em todas as condições, houve aumento na massa de óleo extraída e, portanto, um maior teor, comprovando que o estudo das variáveis independentes (temperatura, tempo de contato e volume de extrato enzimático) assim como as suas interações, proporcionaram um maior rendimento ao processo de extração, ou seja, qualquer condição adotada na matriz de Doehlert proporcionaram maior rendimento no processo de extração de óleo.

O volume de extrato enzimático de 55 mL, que proporcionou estatisticamente um aumento na massa do óleo extraído e conseqüentemente um maior teor, a explicação para tal correlação se encontra no fato de que a velocidade máxima da reação esta interligada a função da enzima disponível. Santos (2008), utilizando enzimas na extração de óleo essencial para fins farmacêuticos obteve um aumento de extração de 60 %, quando utilizou extrato enzimático em concentração máxima, 1% em relação ao material vegetal. Porém, a produção do extrato enzimático neste caso, diferenciou-se por utilizar outra técnica fermentativa, a fermentação submersa em meios de cultura selecionados e enriquecidos, e também por precipitar as enzimas após a extração, obtendo, assim, um extrato enzimático mais concentrado.

Sowbhagha et al (2011), aplicaram extrato enzimático purificado na extração de óleo volátil de aipo. O rendimento depois da aplicação do extrato enzimático puro foi de 22 a 27%.

A temperatura ótima obtida neste trabalho foi de 36 °C. Em estudos realizados por Tavares (2012), na extração do óleo essencial do *Cróton grewioide* a temperatura utilizada no pré-tratamento enzimático foi de 50°C durante 1 hora, utilizando-se 350 mL do extrato enzimático obtido por meio da fermentação em estado sólido do caju por *Aspergillus niger* alcançando um teor de óleo igual a 3%.

Na tabela 3.3 são apresentados os resultados da ANOVA para o modelo adotado:

**Tabela 3.3:** Análise de Variância (ANOVA) de efeitos principais e interações estudadas das variáveis estudadas no aumento de teor de óleo essencial.

Fonte	SQ	GI	QM	F	p
(1) Temperatura (L)	0,230400	1	0,230400	1,274101	0,376185
Temperatura (Q)	0,089653	1	0,089653	0,495779	0,554302
(2) Tempo (L)	0,004225	1	0,004225	0,023364	0,892542
Tempo (Q)	0,092963	1	0,092963	0,514083	0,547804
(3) Volume (L)	0,451250	1	0,451250	2,495392	0,254950
Volume (Q)	1,320016	1	1,320016	7,299628	0,114033
1L por 2L	0,000050	1	0,000050	0,000276	0,988243
1L por 3L	0,045000	1	0,045000	0,248848	0,667350
2L por 3L	0,072200	1	0,072200	0,399263	0,592065
Falta Ajuste	0,336475	3	0,112158	0,620230	0,665409
Erro Puro	0,361667	2	0,180833		
Total SQ	2,879893	14			
R <sup>2</sup>	0,7576				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R<sup>2</sup>= Coeficiente de Determinação.

O modelo pode ser descrito pela equação (2) em termos de valores não codificados, que corresponde à relação entre as três variáveis e a resposta.

$$T_{\text{óleo}} = -7,478 + 0,174x - 0,0027x^2 + 0,0912y - 0,0003y^2 + 0,0818z - 0,0007z^2 - 0,00003xy + 0,0005xy - 0,0002yz \quad (2)$$

Tóleo = teor de óleo,

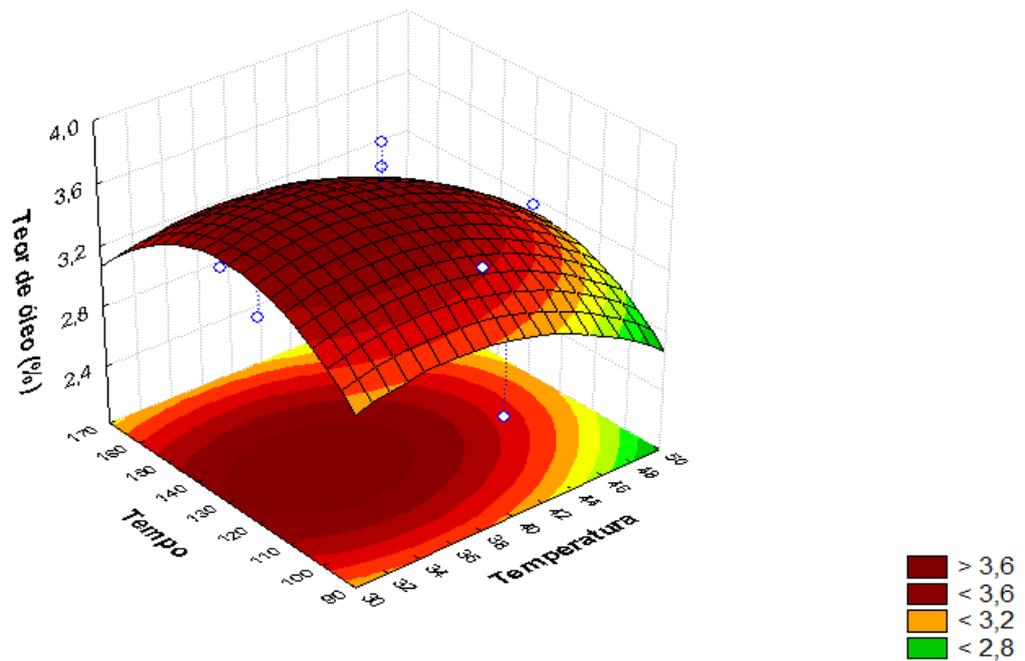
x= volume,

y = temperatura e

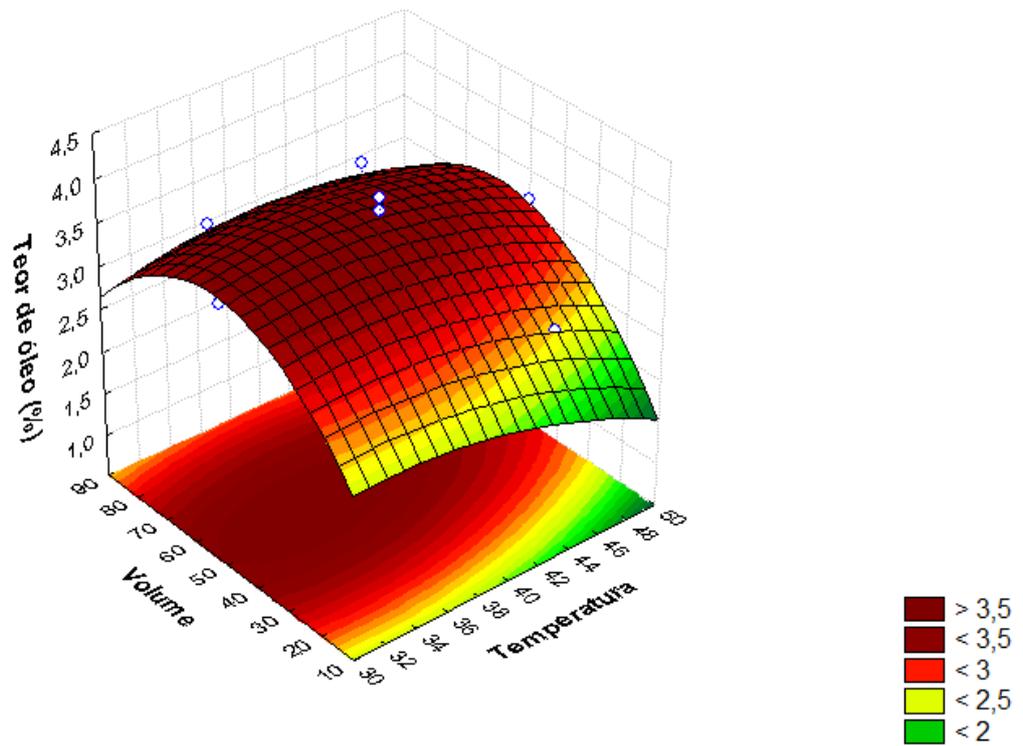
z = tempo de contato.

Os resultados obtidos a partir da equação (2) correspondem aos gráficos de curva de níveis nas Figuras: 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4.

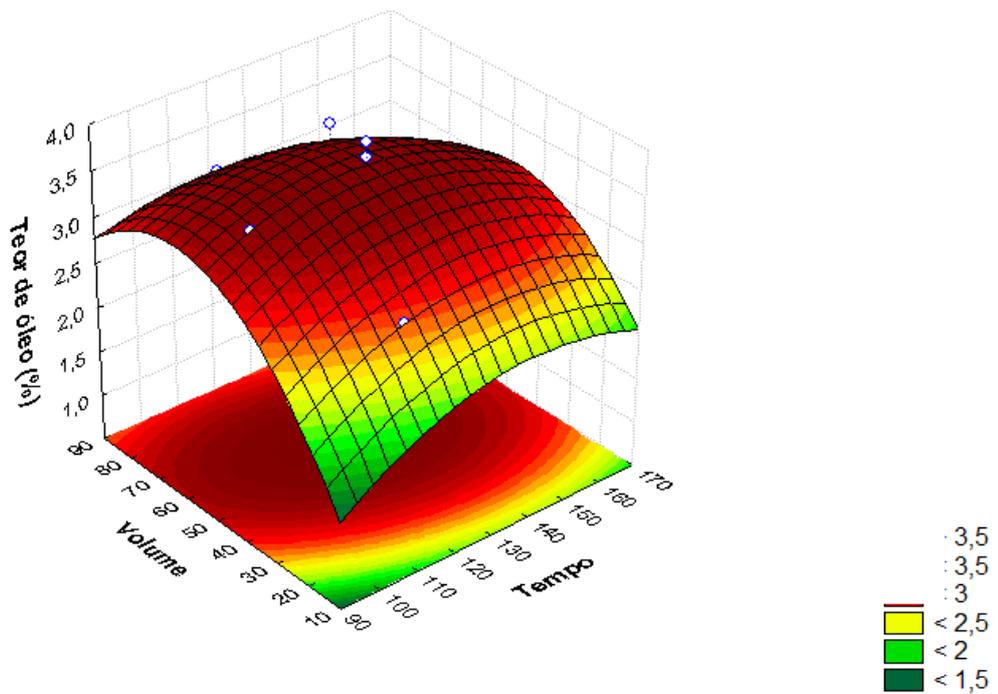
Através do software Statistica 8.0 foi possível obter os valores ótimos para produção de óleo essencial de *Mentha arvensis* sendo a temperatura de 36°C, o tempo de contato 126 minutos e concentração enzimática de 55mL.



**Figura 3.1:** Gráfico Superfície de resposta em função do tempo e da temperatura.



**Figura 3.2:** Gráfico Superfície de resposta em função do volume e da temperatura.



**Figura 3.3:** Gráfico Superfície de resposta em função do volume e do tempo.

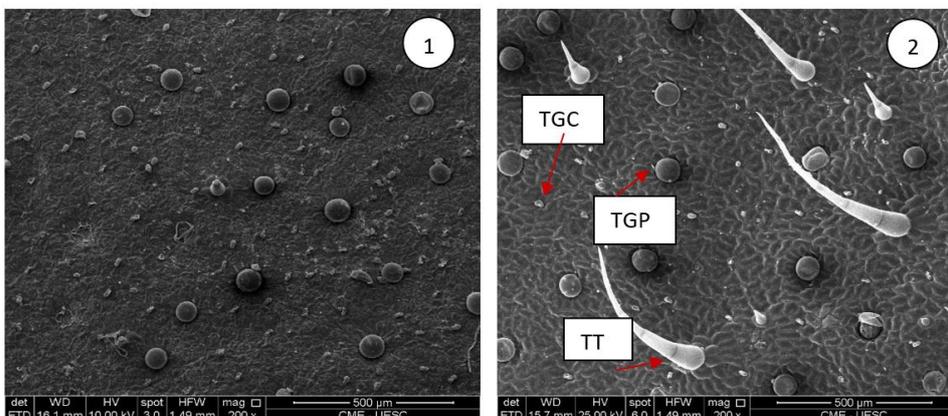
Para validação do modelo estatístico foi analisado o efeito do extrato enzimático sobre as estruturas armazenadoras do óleo (tricomas) avaliadas nas condições descritas na tabela 3.4. Foram observadas cinco condições experimentais que não foram descritas pela matriz de Doehlert, mas que estão dentro dos limites avaliados.

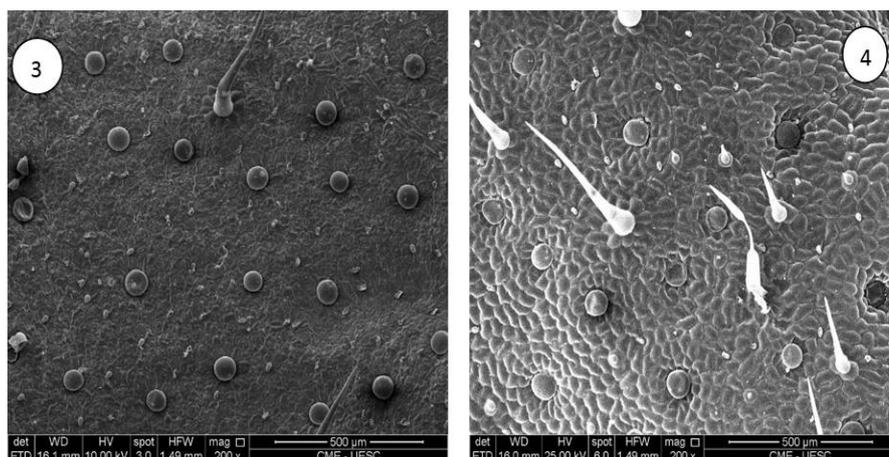
**Tabela 3.4:** Condições experimentais para validação do modelo estatístico.

Temperatura (°C)	Tempo de contato (min)	Volume Extrato Enzimático (mL)
30	180	15
36	126	55
40	120	25
45	130	30
48	110	35

### 3.3.2 Avaliação Micromorfológica

Os tricomas da espécie *Mentha arvensis* podem ser classificados em tricomas tectores (não glandulares), tricomas glandulares peltados e tricomas glandulares capitados, dentre estes, os tricomas glandulares peltados são os responsáveis pela maior produção de óleo essencial. A maior quantidade de tricomas glandulares capitados encontra-se preferencialmente na face abaxial, ocorrendo na face adaxial em menor densidade. (ALVES, 2012).

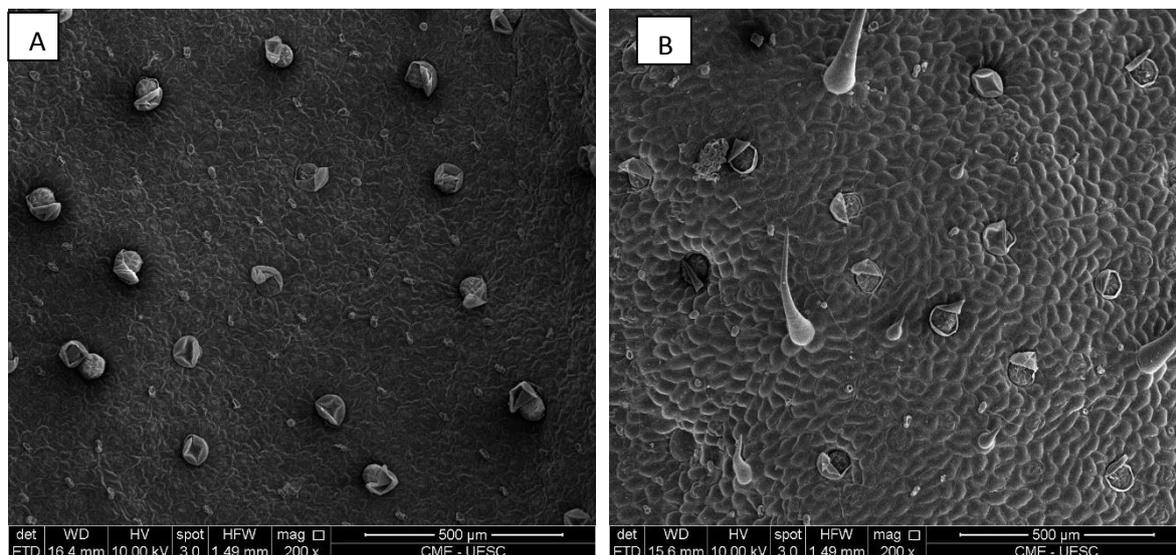


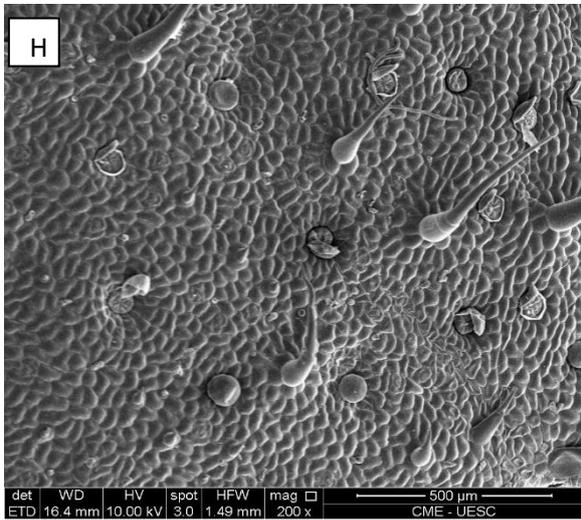
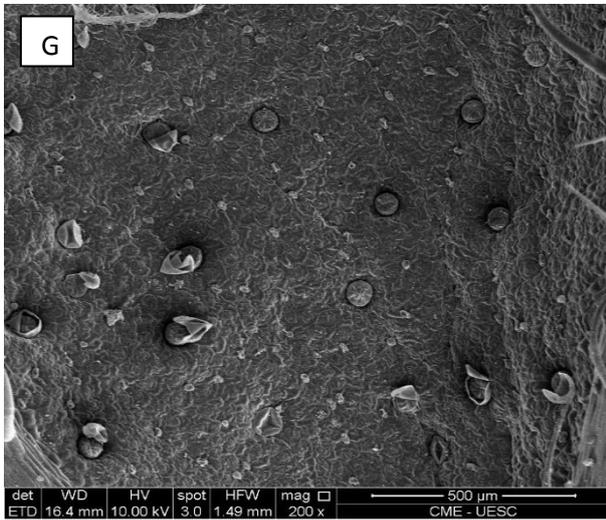
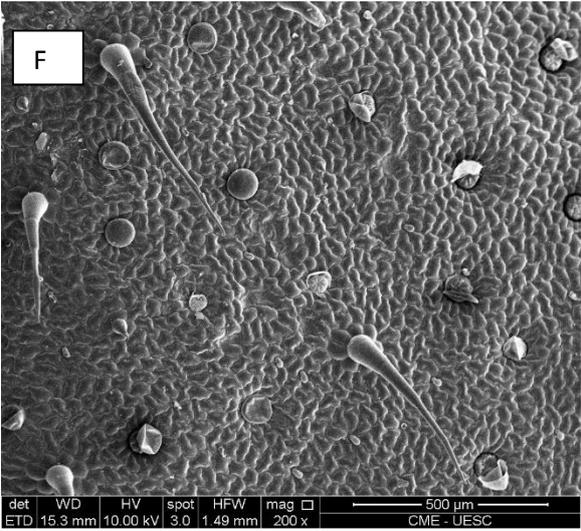
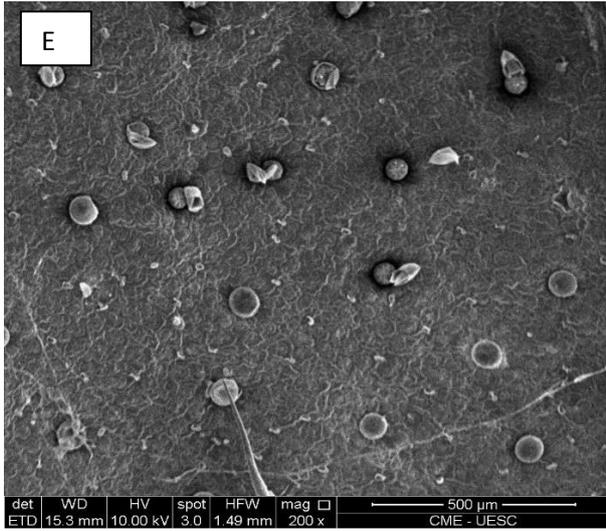
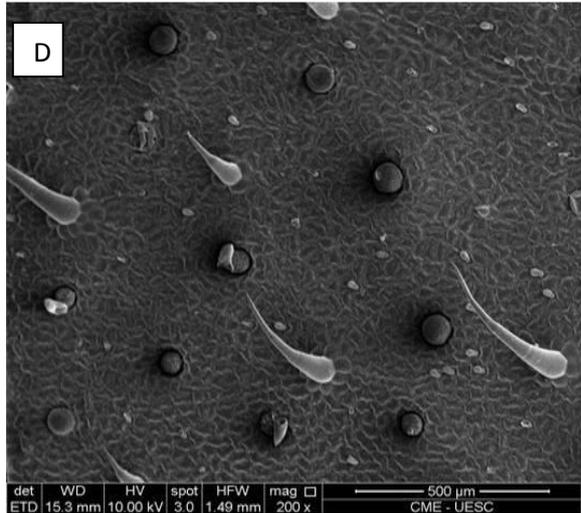
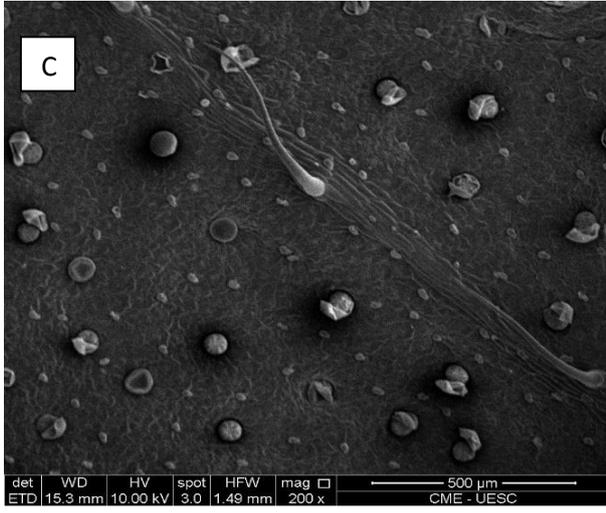


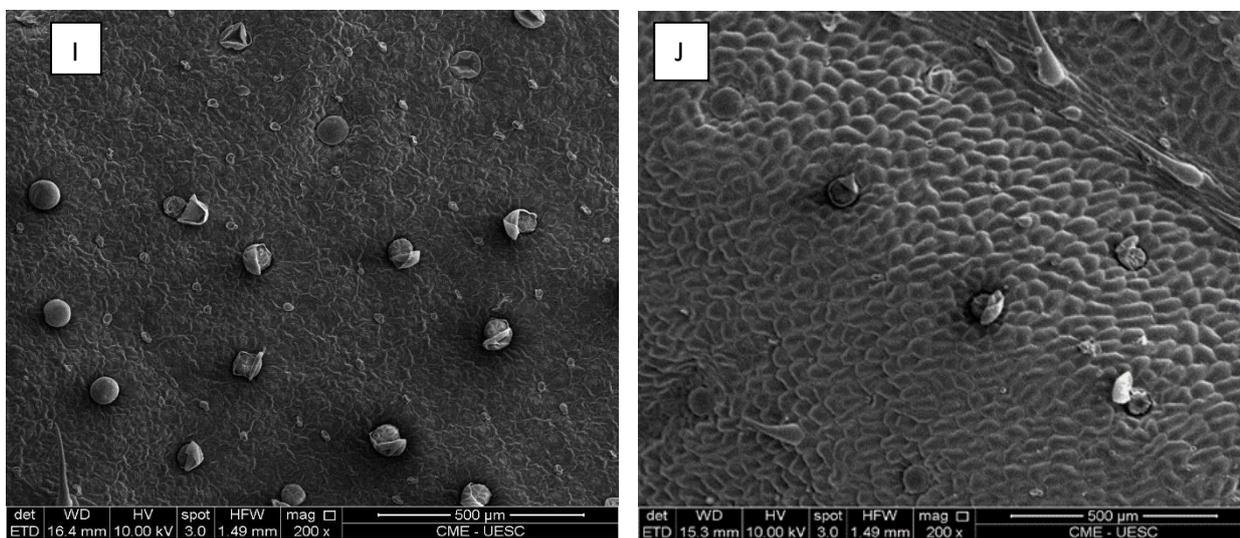
**Figura 3.4:** Eletromicrografia de varredura da folha fresca: Face Abaxial-1/ Face Adaxial-2. Eletromicrografia de varredura do controle nas condições 36°C/126min/Água: Face Abaxial-3/ Face Adaxial-4.

Na figura 3.4, são observadas as eletromicrografias das folhas frescas ao serem colhidas não foram tratadas com extrato multienzimático e nem ficaram submersas em água destilada, foram posteriormente processadas para análise micromorfológica, foi possível observar que tanto na face abaxial (1) como na face adaxial (2), os tricomas glandulares peltados permaneceram íntegros, isso porque, possivelmente, apenas a presença da água não altera a parede celular vegetal, o que pode estar relacionado à composição da parede celular que possui impermeabilidade a água.

A amostra controle onde as folhas frescas ficaram submersas em água destilada durante 126 minutos em temperatura de 36°C, figura 3.4 (3 e 4), pode-se notar que os tricomas glandulares peltados tanto na face abaxial (3) como na face adaxial (4) não sofreram nenhum rompimento.







**Figura 3.5:** Eletromicrografia de varredura: Tratamento (36°C, 126 min, 55 mL)-Faces abaxial (A) e adaxial (B) / Tratamento - (30°C, 180 min, 15 mL)-Faces abaxial (C) e adaxial (D) / Tratamento- (40°C, 120 min, 25)- Faces abaxial (E) e adaxial (F) / Tratamento- (45°C, 130 min, 30 mL)- Face abaxial(G) e adaxial(H) / Tratamento- (48°C, 110 min, 35 mL)-Faces abaxial (I) e adaxial(J).

A visualização das eletromicrografias do ponto ótimo apresentada na figura 3.5 (A e B) confirma que na temperatura de 36°C, tempo de 126 minutos e 55 mL de extrato multienzimático houve o maior rompimento dos tricomas e, portanto, o maior teor de óleo essencial.

As enzimas presentes no extrato possivelmente devem ter clivado a região amorfa da celulose, facilmente hidrolisável, devido há poucas ligações de hidrogênio, alcançando toda superfície foliar, rompendo a parede celular vegetal, promovendo a extração do óleo. Os óleos secretados dos tricomas ficam sobre a superfície foliar em contato com água formando uma emulsão, que pode ser recuperado pelo processo de hidrodestilação obtendo-se um rendimento significativo, sem ser necessário um tempo extenso de extração.

O processo de extração de óleo essencial auxiliado pelo extrato multienzimático provocou o rompimento dos tricomas a temperaturas brandas se comparado a etapa de secagem. Neste trabalho as folhas não foram secas, entretanto, quando são submetidas ao processo de secagem, as temperaturas elevadas provocam os rompimentos dos tricomas, porém, estas temperaturas, provocam o baixo rendimento do óleo devido a volatilização. Logo, o pré-tratamento enzimático pode reduzir o tempo de hidrodestilação, apresentando vantagens do ponto de vista de custo energético, visto o menor tempo de exposição do material vegetal à temperatura de ebulição da água, preconizando as bases para um processo tecnológico que envolve uma extração combinada do pré-tratamento enzimático associado a hidrodestilação na obtenção do óleo essencial das folhas de *Mentha arvensis*.

O rompimento dos tricomas glandulares peltados, na face abaxial, quando analisados por ANOVA com teste de Tukey a 5% de significância apresentaram diferença significativa, contudo a avaliação micromorfológica demonstrou que houve maior rompimento na temperatura de 36°C, tempo de 126 minutos e concentração de 55 mL conforme previsto através da análise estatística com a matriz de Doehlert. Na tabela 3.5 estão os valores das densidades dos tricomas glandulares peltados na superfície abaxial das folhas de *Mentha arvensis*.

**Tabela 3.5:** Densidade de tricomas glandulares peltados (mm<sup>2</sup>) na superfície abaxial de folhas de *Mentha arvensis* submetidas a diferentes concentrações enzimáticas, tempo e temperatura.

Tratamento Enzimático	Densidade Tricomas Glandulares Peltados (mm <sup>2</sup> )	
	Íntegros	Danificados
T <sub>1</sub> (30°C, 180 minutos, 15 mL )	12 a	35 a
T <sub>2</sub> (40°C, 120 minutos, 25 mL)	9 b	39 b
T <sub>3</sub> (45°C, 130 minutos, 30 mL)	10 ab	45 c
T <sub>4</sub> (48°C, 110 minutos, 35 mL)	9 b	49 d
T <sub>5</sub> (36°C, 126 minutos, 55 mL)	6 c	51 d

Os valores seguidos pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A face adaxial possui uma menor densidade de tricomas glandular capitado, mas em ambas as faces há uma grande frequência de tricomas glandulares peltados, que são os responsáveis por armazenar e sintetizar uma maior quantidade de óleo essencial. A tabela 3.6 apresenta os valores das densidades dos tricomas encontrados na face adaxial das folhas de *Mentha arvensis*.

**Tabela 3.6:** Densidade de tricomas glandulares peltados (mm<sup>2</sup>) na superfície adaxial de folhas de *Mentha arvensis* submetidas a diferentes concentrações enzimáticas, tempo e temperatura.

Tratamento Enzimático	Densidade Tricomas Glandulares Peltados (mm <sup>2</sup> )	
	Íntegros	Danificados
T <sub>1</sub> (30°C, 180 minutos, 15 mL )	4 a	24 a
T <sub>2</sub> (40°C, 120 minutos, 25 mL)	2 b	31 b
T <sub>3</sub> (45°C, 130 minutos, 30 mL)	1 b	27 b
T <sub>4</sub> (48°C, 110 minutos, 35 mL)	1 b	39 c
T <sub>5</sub> (36°C, 126 minutos, 55 mL)	1 b	41 c

Os valores seguidos pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Nesta face, o rompimento dos tricomas peltados quando avaliados por ANOVA com teste de Tuckey a 5% de significância apresentou diferença significativa, a avaliação micromorfológica permitiu a visualização dos tricomas danificados demonstrando que estes sofreram maiores rupturas quando utilizou-se de maiores concentrações enzimáticas.

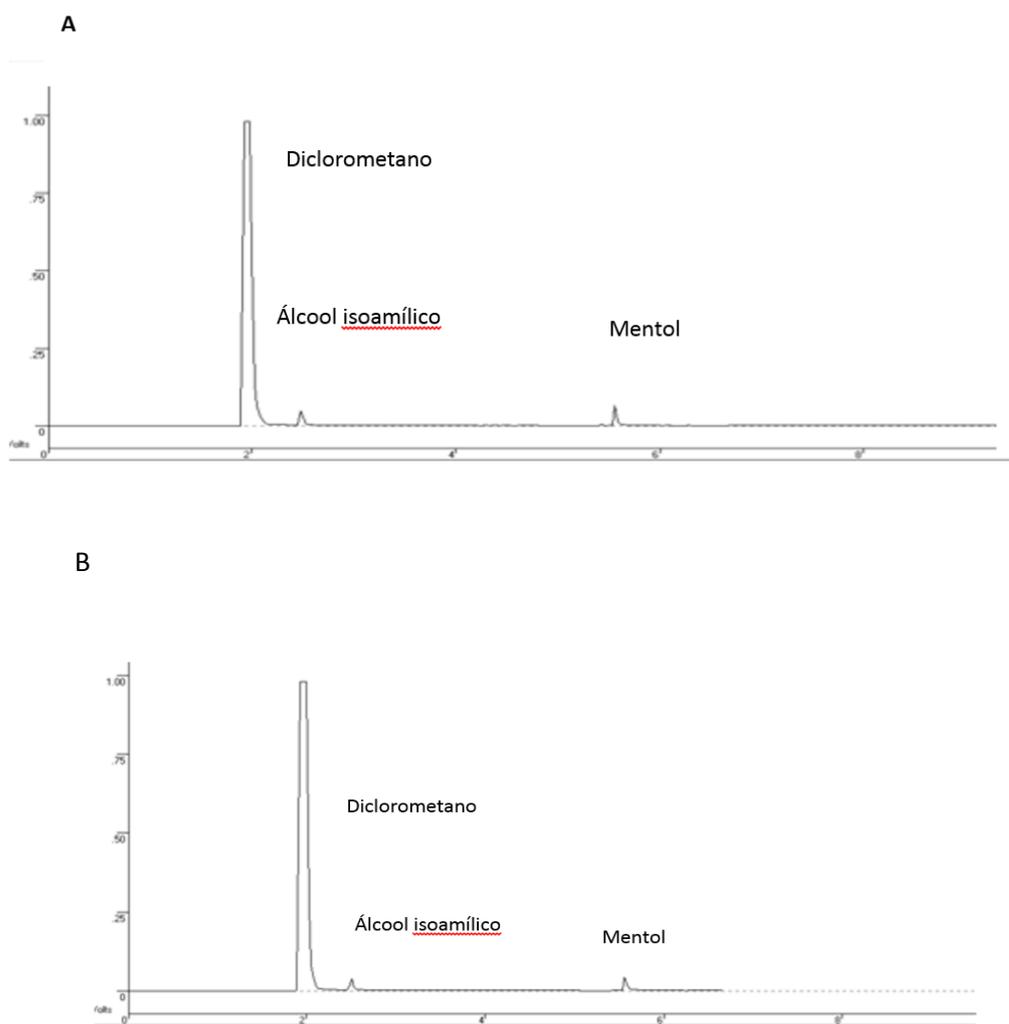
Foi verificado a influência do tratamento enzimático sobre a integridade dos tricomas glandulares peltados, houve rompimentos nos tricomas, o que justifica o aumento de massa de óleo extraído.

### 3.3.3 Análise Cromatográfica

De acordo com Guimarães et al. (2008), os óleos essenciais, em geral, são degradados na presença de ar, calor, luz, umidade e metais. Para verificar uma possível alteração na composição química do óleo essencial extraído com auxílio do extrato multienzimático foram efetuadas análises cromatográficas.

Através dos cromatogramas obtidos por meio da cromatografia gasosa CG-FID, verificou-se a presença de um único composto majoritário, o mentol, em todas as amostras (sem e com tratamento enzimático). A utilização dos extratos multienzimáticos nas

concentrações avaliadas neste trabalho, não ocasionou nenhuma alteração na composição química dos óleos extraídos nem a incorporação de substância volátil do extrato enzimático a estes óleos, como pode ser observado na Figura 3.6 (A e B), que representa os cromatogramas dos óleos extraídos sem enzima e do óleo extraído com auxílio de multienzimas.



**Figura 3.6:** Cromatograma referente ao óleo extraído sem enzimas (OS) após 1 hora de extração- A e referente ao óleo extraído com extrato multienzimático - B.

Os picos apresentados nos cromatogramas, figura (3.6), são os mesmos em todos os tratamentos. O primeiro pico que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 2,0 minutos é correspondente ao solvente utilizado na amostra, o diclorometano. O segundo pico que aparece no tempo de aproximadamente 2,48 minutos é referente ao padrão interno, que é

o álcool isoamílico, já o terceiro pico que apresenta tempo de retenção de aproximadamente de 5,54 minutos, é referente à substância presente no óleo, o mentol.

A razão entre as áreas dos picos do álcool isoamílico e do mentol são de aproximadamente 1, em todos os tratamentos, significando que não houve alteração de sua constituição química, nem adição de outras substâncias voláteis.

### **3.4 Conclusão**

Aplicando-se o extrato multienzimático na etapa de pré-tratamento nas folhas de *Mentha arvensis* houve um aumento máximo da massa do óleo extraído de 194%. A composição química dos óleos não sofreu alteração pela concentração multienzimática utilizada no processo.

### **3.5 Agradecimentos**

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **3.6 Referências Bibliográficas**

ALVES, C.A.P.; **Adubação orgânica e calagem no crescimento e nutrição de *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) e Produção do óleo essencial.** Dissertação Mestrado, 91p. 2012.

BORSATO, A.V; DONI-FILHO, L.; PAGLIA, E.C. Tricomas glandulares e teores de água e do óleo essencial de Camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) sob secagem em camada fixa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.2, p.50-55, ago., 2008.

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.

GUPTA, A.; GAUTAM, N.; MODI, D. R. Optimization of  $\alpha$ -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Bio-technology and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.

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. 2014.

SANTANA, M.C.A.; **Micromorfologia das estruturas secretoras foliares e produção do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes tipos e temperaturas de secagem e condições de armazenamento.** Dissertação Mestrado, 147p. 2013

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.

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.

TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em estado sólido por *Aspergillus Níger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides*.** Dissertação Mestrado, 67p. 2012.

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201, 2011.