

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DE
ALIMENTOS

Área de concentração: Ciências de Alimentos

APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Pimenta dioica* L.
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Autor: Caio Alencar de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientadora: Dr^a. Fabiane Neves Silva

ITAPETINGA - BA

JUNHO / 2026

CAIO ALENCAR DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Pimenta dioica* L.
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia..

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientadora: Dr^a. Fabiane Neves Silva

ITAPETINGA - BA

JUNHO / 2026

633.84
O46a

Oliveira, Caio Alencar de.

Aplicação de extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido para extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L. Assistida por micro-ondas. / Caio Alencar de Oliveira. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.
66f.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Ciências de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco e coorientação da D. Sc. Fabiane Neves Silva.

1. *Pimenta dioica* – Extração de óleo essencial. 2. *Pimenta dioica* – Extrato enzimático - Fermentação em estado sólido. 3. Óleo essencial – Extração – Extrato enzimático. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais. II. Franco, Marcelo. III. Silva, Fabiane Neves. IV. Título.

CDD (21): 633.84

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Pimenta-da-Jamaica – Compostos bioativos – Processo sustentável

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE Pimenta dioica L. ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.”

Autor (a): **CAIO ALENCAR DE OLIVEIRA**

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Aprovada 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.

Documento assinado digitalmente
 **FABIANE NEVES SILVA**
Data: 08/06/2026 11:10:49-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Fabiane Neves Silva
(UFMG)

Documento assinado digitalmente
 **LISIANE DOS SANTOS FREITAS**
Data: 10/06/2026 15:42:10-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Lisiane dos Santos Freitas
(UFS)

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO FRANCO**
Data: 08/06/2026 11:00:59-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Franco
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 20 de abril de 2026.

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu pai, aos meus familiares, amigos e professores que fizeram parte da minha formação. A cada um que, de alguma forma, contribuiu com apoio, incentivo, ensinamentos e presença ao longo desta trajetória, minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Stella, pelo amor incondicional, pela força, dedicação e por nunca ter medido esforços para que eu chegasse até aqui. Seu apoio foi essencial em todos os momentos da minha trajetória.

Ao meu pai, Cleber (*in memoriam*), que, mesmo não estando presente nesta etapa, foi fundamental na formação de quem sou hoje. Sua memória e seus ensinamentos permanecem comigo.

Aos meus irmãos, Patrick e Cleber Jr., às minhas cunhadas, Joanna e Carol, aos meus sobrinhos, Mateus e Maria Alice, e aos demais familiares, pelos momentos de alegria, pelo carinho e pelo incentivo ao longo desta trajetória.

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e pelos momentos de leveza ao longo dessa caminhada.

Ao meu namorado, Sanderson, pelo carinho, paciência e apoio em uma etapa importante deste ciclo, contribuindo com tranquilidade e acolhimento nos momentos desafiadores.

Ao meu orientador, Marcelo, pela confiança, orientação e contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora, Fabiane, pelas contribuições, apoio e acompanhamento ao longo desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, pelos ensinamentos e pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), pela convivência, troca de conhecimentos e apoio durante a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde iniciei minha formação acadêmica, despertei meu interesse pela ciência e tive acesso à infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo vínculo institucional junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudos, essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIACÕES	8
RESUMO	9
CAPÍTULO I.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Óleo essencial.....	14
2.2 <i>Pimenta dioica</i> L.: origem, perfil químico e usos	15
2.3 Tecnologias clássicas de extração de óleos essenciais.....	17
2.4 Novas tecnologias para extração de óleo essencial.....	18
2.5 Micro-ondas na extração de compostos bioativos.....	20
2.6 Pré-tratamento para extração de óleo essencial.....	25
2.7 Fermentação em estado sólido e uso das enzimas no pré-tratamento para o processo de extração de óleo essencial	26
2.8 Avaliação analítica do óleo essencial.....	28
3 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II.....	39
1. OBJETIVOS.....	40
1. Objetivo Geral	40
2. Objetivos Específicos	40
CAPÍTULO III	41
ARTIGO: Otimização do pré-tratamento enzimático para hidrodestilação assistida por micro-ondas de <i>Pimenta dioica</i> L.: efeitos sobre o rendimento, a composição química e a atividade antioxidante do óleo essencial	41
Resumo.....	42
1.Introdução.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Material vegetal.....	44
2.2. Resíduo agroindustrial.....	45
2.3. Micro-organismo e preparo do inóculo	45

2.4. Fermentação em estado sólido e obtenção do extrato bruto enzimático	45
2.5. Ensaio enzimáticos	46
2.6. Planejamento experimental (Doehlert) do pré-tratamento enzimático e hidrodestilação de óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> L. mediados por micro-ondas	46
2.7. Caracterização do óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> L.	48
2.7.1 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) ..	48
2.7.2 Ensaio antioxidantes	48
Ensaio ABTS.....	48
Ensaio DPPH.....	49
Ensaio FRAP	49
Ensaio β -caroteno-ácido linoleico.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1 Planejamento experimental tipo Doehlert do pré-tratamento enzimático e hidrodestilação de óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> L. mediados por micro-ondas	50
3.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) ...	53
3.3 Ensaio antioxidantes	56
4. CONCLUSÃO	59
5. AGRADECIMENTOS.....	59
6. FONTES DE FINANCIAMENTO	59
7. REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO IV	64
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - <i>Pimenta dioica</i> L. (Merr.) em grãos.....	16
Figura 2 - Estrutura química do eugenol.....	17
Figura 3 - Diferenças na transferência de calor, pressão e massa na extração com micro-ondas e convencional.....	22

CAPÍTULO III

Figura 1. Gráfico de Pareto do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert, mostrando a magnitude e a significância dos efeitos do volume de extrato (A), pH (B), seus termos quadráticos e de interação sobre a resposta. A linha vertical indica $p = 0,05$	51
Figura 2. (a) Gráfico de contorno e (b) superfície de resposta tridimensional do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert, mostrando o efeito combinado do pH e do volume de extrato enzimático sobre o rendimento de óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> L.....	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Exemplos de trabalhos que utilizaram micro-ondas para extração de óleo essencial.....	22
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 Matriz experimental do delineamento Doehlert aplicada à otimização do pré-tratamento enzimático para a extração de óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> L.,.....	46
Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert aplicado à otimização do pré-tratamento enzimático para a extração de óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> L.....	50
Tabela 3. Composição relativa (%) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados nos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> L. obtidos sem (OES) e com (OEP) pré-tratamento enzimático.....	53
Tabela 4. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Pimenta dioica</i> L. obtidos com (OEP) e sem (OES) pré-tratamento enzimático, determinada pelos ensaios ABTS, DPPH, FRAP e sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	56

LISTA DE ABREVIACÕES

CAPÍTULO I

OEs – Óleos essenciais

ISO – Organização Internacional de Normalização

EAU – Extração assistida por ultrassom

EFS – Extração por fluido supercrítico

ESSAM – Extração sem solvente assistida por micro-ondas

DAVAM – Destilação a vapor assistida por micro-ondas

DACAM – Destilação com ar comprimido assistida por micro-ondas

HDAM – Hidrodestilação assistida por micro-ondas

FES – Fermentação em estado sólido

CG – Cromatografia gasosa

CG-ES – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

CLAE-EM – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)

FRAP – Poder Antioxidante de Redução Férrica

IC₅₀ - Concentração inibitória média

UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz

CAPÍTULO III

ABTS – catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

CG-ES – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FRAP – Poder Antioxidante de Redução Férrica

OEP – Óleo essencial da *P. dioica* L. com pré-tratamento

OES – Óleo essencial da *P. dioica* L. sem pré-tratamento

OLIVEIRA, C. A. DE. “Aplicação de extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido para extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* assistida por micro-ondas. Itapetinga – BA: UESB, 2026. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Área de concentração em Ciência de Alimentos) *

RESUMO

A busca por métodos de extração mais eficientes e sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias voltadas à valorização de recursos naturais, especialmente na obtenção de ingredientes bioativos. Neste trabalho, avaliou-se a aplicação de extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido como estratégia para aumentar a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L. por hidrodestilação assistida por micro-ondas. O extrato enzimático bruto foi produzido por FES utilizando *Aspergillus niger* 1004 e aplicado como pré-tratamento da matriz vegetal por 10 min. As condições da aplicação desse pré-tratamento foram definidas por meio de delineamento experimental de Doehlert, no qual foram avaliadas as variáveis pH e volume de extrato enzimático. A condição ótima, correspondente a pH 6 e volume de 433,5 mL, promoveu aumento de aproximadamente 50% no rendimento do óleo essencial, com rendimento de $0,75 \pm 0,07\%$, em comparação ao processo sem pré-tratamento, que apresentou $0,50 \pm 0,03\%$. O óleo essencial obtido com e sem o uso do extrato enzimático foi caracterizado quanto ao rendimento, composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, β -caroteno-ácido linoleico e FRAP. A composição química indicou aumento da proporção relativa de eugenol no óleo obtido com pré-tratamento, passando de 66,72% para 96,10%. Na atividade antioxidante, o pré-tratamento aumentou a resposta no ensaio ABTS, de $88,79 \pm 0,25\%$ para $94,75 \pm 0,19\%$, enquanto os ensaios DPPH e β -caroteno-ácido linoleico não apresentaram diferença significativa entre os óleos. No FRAP, observou-se maior resposta para o óleo obtido sem pré-tratamento. Os resultados demonstram que a integração entre fermentação em estado sólido, pré-tratamento enzimático e extração assistida por micro-ondas constitui uma alternativa tecnológica eficiente para aumentar o rendimento e modificar o perfil químico do óleo essencial de *Pimenta dioica* L.

Palavras-chave: Pimenta-da-Jamaica. Processo sustentável. Compostos bioativos.

* Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco e Coorientadora: Dr^a. Fabiane Neves Silva.

OLIVEIRA, C. A. DE. “Application of enzymatic extract obtained by solid-state fermentation for microwave-assisted extraction of essential oil from *Pimenta dioica*.” Itapetinga – BA: UESB, 2026. (Dissertation – Master’s Degree in Food Engineering and Science – Area of concentration in Food Science)*

ABSTRACT

The search for more efficient and sustainable extraction methods has driven the development of technologies aimed at the valorization of natural resources, especially for obtaining bioactive ingredients. In this study, the application of an enzymatic extract obtained by solid-state fermentation was evaluated as a strategy to increase the extraction of *Pimenta dioica* L. essential oil by microwave-assisted hydrodistillation. The crude enzymatic extract was produced by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* 1004 and applied as a pretreatment to the plant matrix for 10 min. The application conditions of this pretreatment were defined using a Doehlert experimental design, in which the variables pH and enzymatic extract volume were evaluated. The optimal condition, corresponding to pH 6 and an extract volume of 433.5 mL, promoted an approximately 50% increase in essential oil yield, reaching $0.75 \pm 0.07\%$, compared with the process without pretreatment, which yielded $0.50 \pm 0.03\%$. The essential oil obtained with and without the enzymatic extract was characterized in terms of yield, chemical composition by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and antioxidant activity using the ABTS, DPPH, β -carotene–linoleic acid, and FRAP methods. The chemical composition indicated an increase in the relative proportion of eugenol in the oil obtained with pretreatment, from 66.72% to 96.10%. Regarding antioxidant activity, the pretreatment increased the response in the ABTS assay, from $88.79 \pm 0.25\%$ to $94.75 \pm 0.19\%$, while the DPPH and β -carotene–linoleic acid assays showed no significant difference between the oils. In the FRAP assay, a higher response was observed for the oil obtained without pretreatment. The results demonstrate that the integration of solid-state fermentation, enzymatic pretreatment, and microwave-assisted extraction constitutes an efficient technological alternative to increase the yield and modify the chemical profile of *Pimenta dioica* L. essential oil.

Keywords: Allspice. Sustainable process. Bioactive compounds.

* Advisor: Prof. Dr. Marcelo Franco e Co-advisor: Dr^a. Fabiane Neves Silva.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários vegetais, constituídas principalmente por terpenos, terpenoides, fenilpropanoides e compostos fenólicos, cuja composição química está associada a diferentes propriedades biológicas e aplicações industriais. Devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano, esses compostos têm despertado interesse nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (Ogunwande *et al.*, 2019; Cimino *et al.*, 2021; Bolouri *et al.*, 2022). Nas áreas cosmética e farmacêutica, tais propriedades podem contribuir para a proteção contra processos oxidativos e inflamatórios, incluindo a ação sobre radicais livres e a modulação de mediadores inflamatórios. Na indústria de alimentos, os óleos essenciais têm sido estudados como ingredientes naturais e agentes bioativos, especialmente em sistemas de conservação e em embalagens ativas ou bioplásticos, com o objetivo de prolongar a vida útil dos produtos e auxiliar na preservação de suas características de qualidade (Ni *et al.*, 2021; Bolouri *et al.*, 2022).

A pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica* L.) é uma especiaria nativa da América Central, pertencente à família *Myrtaceae* que possui características além do sabor, fragrância e seu uso em diversos preparos de alimentos (Tavares *et al.*, 2024; Ni *et al.*, 2021). Devido às moléculas bioativas presentes em seu óleo essencial, a *Pimenta dioica* L. é conhecida por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas, podendo ser aplicada em tratamentos de doenças crônicas e respiratórias. O eugenol é o composto majoritário presente no óleo essencial e responsável, em grande parte, pelas atividades biológicas associadas à planta (Tavares *et al.*, 2024).

Entretanto, um dos principais desafios relacionados ao uso dos óleos essenciais está na etapa de extração, que impacta diretamente o rendimento e a qualidade dos compostos obtidos. Um dos métodos mais tradicionais utilizados é a hidrodestilação, que emprega o arraste do óleo pelo vapor da água, seguido de condensação. Apesar de eficiente, esse processo pode resultar na perda de compostos devido ao longo tempo de extração por degradação térmica (Hammouda *et al.*, 2014). Como alternativa, o uso de micro-ondas tem se mostrado promissor por permitir um aquecimento mais rápido e controlado. Quando associada a enzimas produzidas por fermentação em estado sólido, essa tecnologia tem o potencial de aumentar a eficiência do processo de extração (Hammouda *et al.*, 2014; Tavares *et al.*, 2024).

O uso de enzimas hidrolíticas surge como uma estratégia para aumentar o rendimento do processo, uma vez que atuam na degradação de componentes estruturais da matriz vegetal, facilitando a liberação do óleo essencial (Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Khruengsai *et al.*, 2023).

A produção dessas enzimas por fermentação em estado sólido (FES) apresenta vantagens, como baixo consumo de água, elevada concentração de enzimas no extrato bruto e maior compatibilidade com substratos sólidos de origem vegetal. Além disso, a FES permite o uso de resíduos agroindustriais como substratos fermentativos, contribuindo para a redução de custos e para a adoção de práticas alinhadas aos princípios da sustentabilidade e da economia circular (Silva *et al.*, 2025; Tavares *et al.*, 2024). Dentre os microrganismos utilizados na FES, o fungo filamentoso *Aspergillus niger* destaca-se pela reconhecida capacidade de produzir um amplo espectro de enzimas hidrolíticas, empregadas em processos industriais (E *et al.*, 2002; Santos Da Silva Quinto *et al.*, 2025). A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo deste fungo não apenas viabiliza a produção enzimática, como também agrega valor a materiais que seriam descartados. Dessa forma, a casca da amêndoa de cacau, subproduto abundante da cadeia produtiva do cacau no Brasil, apresenta-se como um substrato promissor para a produção de extratos enzimáticos, devido à sua composição lignocelulósica e ampla disponibilidade (Almeida Lessa *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024).

Sendo assim, a integração entre FES, produção de extrato enzimático a partir de resíduos agroindustriais e extração assistida por micro-ondas representa uma abordagem inovadora para a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L.. Essa estratégia contribui para a redução do tempo de processamento, aumento do rendimento e preservação da qualidade dos compostos bioativos, além de minimizar impactos ambientais negativos e custos operacionais. Assim, o presente estudo fortalece a aplicação de tecnologias emergentes no setor de alimentos e de ingredientes naturais, ao incorporar a biotecnologia, sustentabilidade e inovação tecnológica, ampliando as possibilidades de aplicação industrial e contribuindo para o avanço técnico-científico da área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O tópico apresenta os fundamentos teóricos para o desenvolvimento desta dissertação. Primeiramente, discutem-se os conceitos básicos sobre óleos essenciais, como a origem, composição química e propriedades da pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica* L.). Em seguida, revisam-se as metodologias clássicas e modernas de extração desses óleos, com ênfase nos pré-tratamentos aplicados às amostras antes do processo extrativo. Também se detalham os princípios do aquecimento dielétrico por micro-ondas e seus parâmetros operacionais críticos. Por fim, descrevem-se os métodos de avaliação do óleo extraído e os fundamentos das enzimas hidrolíticas obtidas por fermentação em estado sólido, destacando seus mecanismos de ação e importância para a estratégia proposta.

2.1 Óleo essencial

Os óleos essenciais (OEs) são definidos pela Organização Internacional de Normalização (ISO) como produtos obtidos de material vegetal por destilação a vapor, processos mecânicos aplicados ao epicarpo de frutos cítricos ou destilação a seco após a separação da fase aquosa (ISO, 2021). Embora essa definição destaque o método de obtenção, atualmente a natureza volátil e os multicomponentes presentes nessas substâncias também são levados em consideração. Esses são formados em diversas partes vegetais, como flores e raízes, constituindo o metabolismo secundário das plantas (Jain; Patel; Desai, 2022). A composição dos óleos essenciais é complexa, geralmente, dois ou três constituintes estão presentes em maior quantidade, enquanto os outros compostos são encontrados em níveis mais baixos (Dhifi *et al.*, 2016). Em contrapartida, esses diferentes componentes favorecem as ações biológicas, uma vez que moléculas de baixa massa molar e o caráter lipofílico permitem uma rápida passagem pelas membranas biológicas, distribuindo-se com facilidade nos tecidos (Durczyńska; Żukowska, 2024).

Fazem parte da estrutura dos OEs, principalmente, terpenos e terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos), além dos compostos fenólicos, álcoois, cetonas alifáticas e ésteres (Durczyńska; Żukowska, 2024; Raut; Karuppayil, 2014). Esses grupos são responsáveis pelas atividades bioativas, como antimicrobianas, anti-inflamatórias e pelas propriedades físico-químicas: cor, hidrofobicidade, baixa solubilidade em água e alta em álcoois e solventes orgânicos de média polaridade (Cimino *et al.*, 2021). A avaliação da composição é realizada por meio de técnicas cromatográficas que possibilitam a identificação de traços de compostos minoritários e estabelecem o perfil químico de cada óleo. A variabilidade dos componentes

presentes no óleo pode estar relacionada com a origem botânica, à sazonalidade e às condições de processamento e armazenamento (Durczyńska; Żukowska, 2024).

Apesar das vantagens sensoriais e biológicas, os OEs podem ser quimicamente instáveis e perdem a atividade ao longo do armazenamento. Hidrólise, oxidação, volatilização são alguns dos fenômenos que limitam seu uso, bem como a degradação pela presença de luz, calor, pH extremo e presença de oxigênio (Cimino *et al.*, 2021). Entre as alternativas utilizadas para contornar esses fatores estão a microencapsulação, complexação com ciclodextrinas e incorporação em matrizes lipídicas que agem diminuindo, principalmente, a ação dos fatores abióticos, além de modular a liberação controlada dos constituintes ativos (Bajpai; Baek; Kang, 2012). Sendo assim, a preservação química dos OEs é necessária para a manutenção das propriedades bioativas.

2.2 *Pimenta dioica* L.: origem, perfil químico e usos

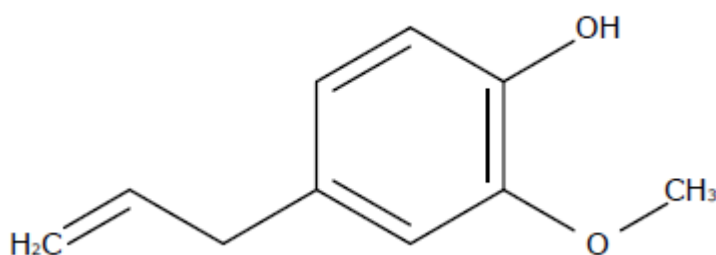
A *Pimenta dioica* (L.) Merr., originária da América Central e das Índias Ocidentais, tem sua maior produção concentrada na Jamaica e, por isso, é popularmente conhecida como “pimenta-da-Jamaica”. Também recebe os nomes de “pimenta-gorda”, em razão do formato arredondado dos frutos (Figura 1), e “allspice”, pelas notas aromáticas que remetem a outras especiarias, como cravo, canela e noz-moscada (Mérida-Reyes *et al.*, 2020; Montalvo Lopez; Molina Torres; Montalvo Hernández, 2021). Tradicionalmente, todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular para o tratamento de constipação, cólicas menstruais, gastralgia, dores musculares e outras enfermidades (Zhang; L. Lokeshwar, 2012). No Brasil, o cultivo concentra-se nos estados do Espírito Santo e da Bahia, com colheita entre dezembro e fevereiro (Agrospice, 2023).

Figura 1. *Pimenta dioica* L. (Merr.) em grãos.



Fonte: Autoria própria.

O principal produto comercializado da espécie é o óleo essencial, extraído principalmente de folhas e frutos, cujo uso se justifica pela versatilidade química e pelas possibilidades de aplicação nos setores alimentício, farmacêutico, cosmético e agroindustrial (Avila *et al.*, 2022). Do ponto de vista fitoquímico, *P. dioica* L. destaca-se pelo elevado teor de eugenol, que pode ultrapassar 70% da composição total (Tavares *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2025). O eugenol (Figura 2), composto majoritário também no cravo-da-índia, é um fenilpropanoide de natureza fenólica, denominado quimicamente 4-alil-2-metoxifenol, cuja estrutura apresenta um anel aromático substituído por um grupo hidroxila, um grupo metoxi e uma cadeia alílica (NCBI, [s. d.]). Essa estrutura está associada às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, além de contribuir para o aroma característico (Chandrashekhar Kamble, 2024; Wu *et al.*, 2025). Em razão dessas propriedades, o eugenol e os óleos essenciais ricos nesse composto apresentam potencial de aplicação como aromatizantes, conservantes naturais, ingredientes bioativos, potencial aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. Outros compostos relevantes incluem metileugenol, mirceno e β -Z-ocimeno e, em menores proporções, ocorrem 1,8-cineol, α -felandreno, terpinoleno e α -humuleno (Tavares *et al.*, 2024). Esses constituintes contribuem para as atividades bioativas do óleo. Estudos descrevem efeito imunomodulador, com aumento de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos humanos, e ação nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus*, agente da murcha-do-pinheiro, uma praga florestal (Lorenzo-Leal *et al.*, 2019; Martinez-Velazquez *et al.*, 2011).

Figura 2. Estrutura química do eugenol

Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2026).

Comercialmente, o óleo essencial de pimenta-da-Jamaica é valorizado por propriedades sensoriais e funcionais. Na indústria alimentícia, os frutos secos e moídos são utilizados como condimento, conferindo sabor marcante a diversos pratos regionais e internacionais (Tavares *et al.*, 2024). Nas indústrias de perfumaria e cosméticos, integra formulações de fragrâncias, loções e cremes (Montalvo Lopez; Molina Torres; Montalvo Hernández, 2021). Já na área farmacêutica, o alto teor de eugenol justifica o uso em produtos analgésicos, antissépticos e odontológicos (Contreras-Moreno, 2018; Oliveira *et al.*, 2009). Dessa forma, *P. dioica* constitui matéria-prima de elevado valor econômico e funcional para diversos setores industriais.

2.3 Tecnologias clássicas de extração de óleos essenciais

Os métodos tradicionais de extração de óleos essenciais representam técnicas amplamente aplicadas ao longo da história, com adaptações para atender às demandas industriais contemporâneas. A extração a vapor destaca-se como um dos processos mais usados, abrangendo 93% das extrações (Bouguerra *et al.*, 2021). Nesse método, o calor aplicado rompe as células do material vegetal, liberando os compostos voláteis que se condensam ao entrar em contato com superfícies frias, permitindo a recuperação do óleo essencial por separação da fase oleosa em relação à fase aquosa (Souiy *et al.*, 2022). Uma de suas vantagens é evitar a degradação por hidrólise, já que não há contato direto entre o material vegetal e a água, garantindo uma melhor preservação das características químicas do óleo (Souiy, 2024). Apesar disso, o tempo prolongado de processamento e a necessidade de controle preciso de temperatura e pressão podem limitar sua eficiência energética e a produtividade.

Outro método tradicional, a hidrodestilação, também utiliza vapor, mas o material vegetal é imerso em água. Este processo é particularmente vantajoso para produtos insolúveis em água e com altos pontos de ebulição, permitindo sua extração em temperaturas mais baixas

(Murti *et al.*, 2023). Embora a hidrodestilação seja eficiente para materiais duros ou pulverizados, como raízes e cascas, sua principal desvantagem é a potencial degradação térmica de compostos mais sensíveis e a necessidade de retificação para corrigir odores indesejados causados pela exposição prolongada ao calor (Souiy *et al.*, 2022). Já a hidrodifusão, variante que combina vapor e água, é ideal para materiais delicados como flores, por operar com temperaturas e pressões mais baixas, minimizando danos às estruturas moleculares (Murti *et al.*, 2023).

Para materiais específicos, métodos como a prensagem a frio e o enfleurage oferecem soluções alternativas. A prensagem a frio, utilizada para cascas de cítricos, por exemplo, consiste em rasgar mecanicamente o pericarpo para liberar o óleo essencial, resultando em uma emulsão aquosa posteriormente centrifugada (Bousbia, 2011; Souiy, 2024). Esse processo evita o uso de calor, preservando aldeídos sensíveis presentes nos cítricos. Por outro lado, o enfleurage, um método ancestral, utiliza gorduras para capturar os compostos aromáticos de flores frescas, como o jasmim. Apesar de sua eficácia em preservar fragrâncias delicadas, o alto custo e a complexidade operacional tornaram essa técnica quase obsoleta, limitada a nichos específicos como a perfumaria (Stratakos, 2016; Souiy *et al.*, 2022).

A extração com solvente orgânico é outra técnica empregada, especialmente para materiais termolábeis, como flores que não suportam as altas temperaturas dos métodos de destilação. Neste processo, o material vegetal é submerso em um banho de solvente, e lavagens sucessivas capturam os compostos aromáticos. A emulsão obtida é filtrada e submetida à destilação para isolar o óleo essencial (Souiy, 2024). Apesar de ser rápida e eficaz, essa técnica apresenta limitações, como resíduos de solventes no produto final, que inviabilizam sua aplicação em alimentos, exceto quando se utiliza álcool de grau alimentício. Além disso, preocupações com custo, toxicidade e impacto ambiental restringem o uso dessa abordagem, que é mais comum na indústria de perfumes devido ao alto rendimento obtido e à preservação das características sensoriais (Souiy, 2024; Stratakos, 2016). Este conjunto de métodos tradicionais demonstra como as abordagens históricas continuam a influenciar o desenvolvimento e a seleção de tecnologias modernas, destacando os desafios associados à busca por maior eficiência e sustentabilidade na extração de óleos essenciais.

2.4 Novas tecnologias para extração de óleo essencial

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de métodos mais eficientes e sustentáveis para a extração de óleos essenciais, superando as limitações das técnicas tradicionais. Entre esses métodos, destaca-se a extração assistida por ultrassom (EAU),

que combina eficiência com preservação da qualidade. Esse método utiliza ondas ultrassônicas para criar cavitação nas células vegetais, promovendo a penetração do solvente e a liberação dos compostos voláteis. Estudos demonstram que a EAU reduz o tempo de extração e o consumo de energia, além de manter a composição dos óleos essenciais, por ser um processo não térmico (Richa *et al.*, 2020). Segundo Chen *et al.* (2021), a extração de óleos de *Cinnamomum cassia* apresentou altos níveis nos primeiros 30 minutos, com eficiência diretamente relacionada ao ajuste de parâmetros, como potência e tempo de aplicação, resultando em um rendimento 27% maior quando comparado o uso de EAU (2,14%) com método clássico de hidrodestilação (1,68%). Assim, a EAU se consolida como uma técnica que combina alta produtividade com menores impactos ambientais.

Outro método amplamente explorado é a extração por fluido supercrítico (EFS), que utiliza fluidos em condições supercríticas, como o dióxido de carbono, para extração seletiva de compostos voláteis. Essa técnica se destaca por sua eficácia em baixas temperaturas e por evitar o uso de solventes orgânicos prejudiciais, contribuindo para práticas mais sustentáveis (Yousefi *et al.*, 2019). Estudos mostram que, ao ajustar variáveis como pressão e temperatura, é possível otimizar a extração de componentes bioativos. Salinas *et al.* (2020) observaram que o maior rendimento foi obtido a 60 °C e 40 MPa, devido ao aumento da solvatação do CO₂. Além disso, a SFE oferece vantagens como maior atividade antioxidante e menor viscosidade do produto final, aspectos fundamentais para aplicações farmacêuticas e alimentícias (Rassem; Abdurahman; Rosli M, 2016). A versatilidade desse método o torna uma escolha preferida para matrizes sensíveis ao calor e para aplicações que exigem alta pureza.

A extração sem solvente assistida por micro-ondas (ESSAM) também se destaca como uma alternativa sustentável. Essa técnica utiliza aquecimento por micro-ondas em destilação a seco, sem a necessidade de solventes ou água adicional. Comparada à hidrodestilação e à destilação a vapor, a ESSAM é mais eficiente em termos de tempo e energia, produzindo óleos com perfis aromáticos semelhantes em períodos mais curtos, podendo reduzir 50 a 75% do período de extração (Araujo *et al.*, 2021).

Entre as técnicas baseadas em micro-ondas, a destilação a vapor assistida por micro-ondas (DAVAM) e a destilação com ar comprimido assistida por micro-ondas (DACAM) representam avanços significativos. A DAVAM combina os princípios da destilação a vapor com o aquecimento eficiente das micro-ondas, sendo eficaz na extração de óleos essenciais de flores, como lavanda (Chemat; Abert-Vian; Fernandez, 2013). Já a DACAM utiliza ar comprimido como meio de extração, eliminando a necessidade de vapor e reduzindo os custos

energéticos. O processo envolve um sistema integrado de compressor, forno de micro-ondas e condensador, permitindo extrações rápidas e com menor impacto ambiental (Souiy, 2024).

Por fim, a hidrodestilação assistida por micro-ondas (HDAM) é uma técnica que utiliza a energia de micro-ondas para gerar calor diretamente nas moléculas polares das células vegetais, promovendo a ruptura das paredes celulares e a liberação de compostos voláteis (Boudraa *et al.*, 2021). A HDAM é uma técnica simples que combina eficiência com sustentabilidade, reduzindo o tempo de extração, em alguns casos, até seis vezes; o consumo de energia e a degradação térmica dos compostos. A técnica é capaz de produzir óleos essenciais com maior quantidade de compostos oxigenados, responsáveis por atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, a adaptação do método para espécies como *Pimenta dioica* L. abre novas possibilidades para sua aplicação em plantas aromáticas e especiarias (Joco *et al.*, 2023).

2.5 Micro-ondas na extração de compostos bioativos

As micro-ondas são baseadas no princípio do aquecimento dielétrico, no qual a energia eletromagnética é convertida em energia térmica. Este fenômeno ocorre quando a radiação interage com moléculas polares, como a água presente na matriz vegetal. As micro-ondas possuem componentes de campo elétrico e campo magnético, sendo o campo elétrico alternado o principal responsável pelo aquecimento durante a extração vegetal (Fordos *et al.*, 2025). O aquecimento dielétrico ocorre principalmente por dois mecanismos simultâneos: a rotação dipolar e a condução iônica. Na rotação dipolar, moléculas polares tentam se alinhar ao campo elétrico oscilante, gerando calor devido ao atrito molecular. Já na condução iônica, íons presentes no meio migram sob ação do campo elétrico alternado, produzindo calor devido às colisões intermoleculares e à resistência ao movimento iônico (Fordos *et al.*, 2025). Como as micro-ondas penetram diretamente no material, o calor é gerado internamente na amostra, promovendo rápido aumento da temperatura e pressão intracelular, ruptura das estruturas celulares e maior liberação dos compostos bioativos (Hossain *et al.*, 2024; Karbuz; Tugrul, 2021; Wei *et al.*, 2019). Esse rápido aumento de temperatura promove o “efeito de explosão celular”, ou seja, a ruptura das estruturas celulares devido ao aumento da pressão interna, facilitando a liberação dos compostos bioativos. Além disso, a capacidade de absorção de micro-ondas pela água presente na matriz é um aspecto determinante para a eficiência do método, pois o calor é gerado internamente da amostra, minimizando perdas térmicas (Farhat *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2022). Esta característica também contribui para uma distribuição mais

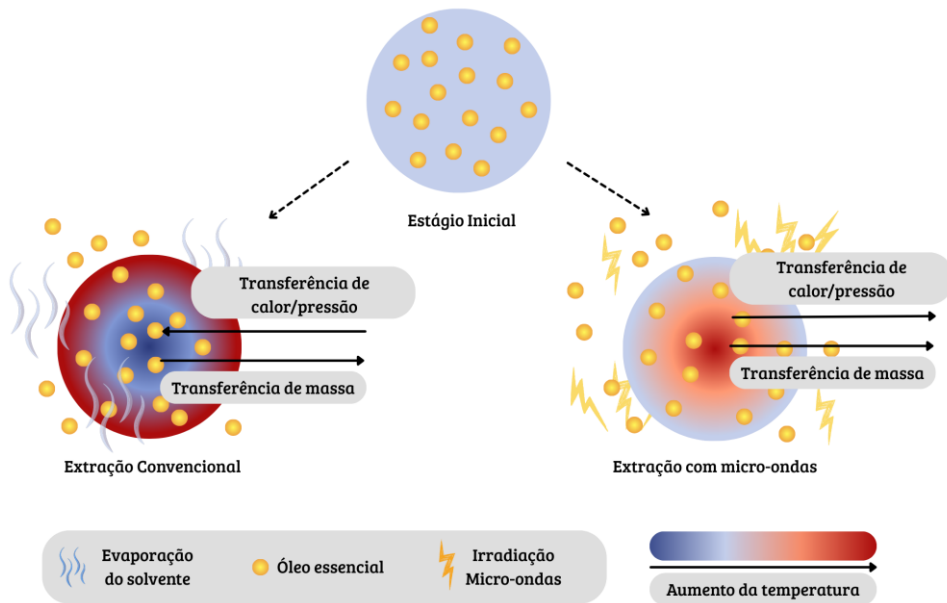
uniforme da temperatura no material, permitindo uma extração homogênea e rápida dos compostos ativos.

Entre os parâmetros críticos do uso de micro-ondas estão a potência, tempo, proporção sólido/água e umidade. Potências muito elevadas podem levar à degradação dos compostos alvo, resultando em menores rendimentos devido à exposição excessiva ao calor intenso (Kusuma; Mahfud, 2016). Por outro lado, potências muito baixas podem ser insuficientes para romper as estruturas celulares. Portanto, um controle da potência é essencial para aumentar o rendimento ou acelerar o processo, preservando a integridade química do produto extraído. Além disso, o tempo de extração também desempenha um papel crucial. Tempos curtos podem comprometer a eficiência da extração, enquanto tempos excessivos não produzem melhorias substanciais na recuperação dos bioativos, tornando o processo menos econômico (Fan *et al.*, 2022).

A proporção material vegetal/água é outro parâmetro importante para a eficiência da extração assistida por micro-ondas. Uma razão inadequada pode afetar a transferência de massa entre a matriz vegetal e o solvente, resultando em menor recuperação de compostos bioativos (Hossain *et al.*, 2024; Ponmurugan *et al.*, 2017; Vathsala *et al.*, 2024). Geralmente, razões maiores, com maior quantidade de solvente em relação ao sólido, favorecem a dissolução e a difusão dos compostos, porém elevam o custo devido ao maior volume de solvente utilizado. A umidade inicial da matriz vegetal também é um fator determinante para o sucesso da extração com micro-ondas. A presença de água desempenha papel crucial na absorção e conversão da energia de micro-ondas em calor, permitindo rápida elevação da temperatura interna da amostra. Uma quantidade adequada de umidade melhora a transferência de calor e facilita a rápida ruptura celular, acelerando a liberação dos bioativos desejados (Song *et al.*, 2022).

Dentre as vantagens do uso de micro-ondas estão o aquecimento uniforme das fases líquida e sólida, o que diminui o consumo energético do processo (López-Salazar *et al.*, 2023). Quando associada a outras tecnologias, como a hidrodestilação e a destilação a vapor assistida, essa técnica possibilita uma extração mais rápida de óleos essenciais, sem a necessidade de longas etapas de purificação, preservando o perfil sensorial dos extratos (Feng; Zhang, 2020). A maior rapidez ocorre porque o aquecimento inicia-se no interior da matriz vegetal, elevando a pressão e acelerando a transferência de massa. Nos métodos convencionais, o aquecimento ocorre de fora para dentro, o que torna essa transferência mais lenta, como demonstrado na Figura 2 (Song *et al.*, 2022).

Figura 3. Diferenças na transferência de calor, pressão e massa na extração com micro-ondas e convencional



Fonte: Adaptado de Song *et al.*, 2022.

O aquecimento controlado inibe reações indesejáveis, como oxidação, hidrólise ou transesterificação, que comprometem a qualidade em processos térmicos prolongados, garantindo maior estabilidade e valor funcional aos compostos obtidos (Flórez; Conde; Domínguez, 2015). Estudos comparativos demonstram rendimentos iguais ou superiores aos obtidos por métodos convencionais, porém em tempos menores (Hossain *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2019). Hossain *et al.* (2024) obtiveram um rendimento maior de 27,9% ao usarem a radiação quando comparados ao método de hidrodestilação tradicional. Ademais, as micro-ondas possibilitam a diminuição ou eliminação do uso de solventes tóxicos (Sanli; Ozkan; Şahin-Yeşilçubuk, 2025). A tabela 1 apresenta alguns trabalhos que utilizam micro-ondas para extração de óleo essencial em diferentes matrizes vegetais.

Tabela 1. Exemplos de trabalhos que utilizaram micro-ondas para extração de óleo essencial.

Espécies	Material vegetal	Modelo do aparelho	Rendimento	Referências
Cananga-do-japão (<i>Kaempferia galanga</i> L.)	Frutos	M1-L213B, MIDEA	5,26%	Zhang <i>et al.</i> , 2025

Manjeriç�o (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Folhas	NEOS-GR, Milestone	0,527%	Rana <i>et al.</i> , 2025b
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Folhas	NEOS-GR, Milestone	0,639%	Rana <i>et al.</i> , 2025b
Or�eg�o turco (<i>Origanum onites</i> L.)	Folhas	-	2,0%	Kıtır Ően; Duran, 2023
Canforeiro (<i>Cinnamomum camphor</i>)	Casca	-	7,52 mL / kg	Zhang <i>et al.</i> , 2024
Lima comum (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Folhas	NEOS-GR, Milestone	3,1%	Rana <i>et al.</i> , 2025a
S�lvia (<i>Salvia fruticosa</i>)	Folhas	-	1%	Dogan, 2024
<i>Citrus limon</i>	Folhas	NEOS-GR, Milestone	2,5%	Yeasmin <i>et al.</i> , 2024
Jamel�o (<i>Syzygium cumini</i>)	Folhas	NEOS-GR, Milestone	0,722%	Rana <i>et al.</i> , 2025c
<i>Chrysanthemum indicum</i> var. <i>aromaticum</i>	Folhas	Galanz modelo P70D20N	7,22 mL/kg	Li; Chen; Zhou, 2023

1P-G5				
Erva-cidreira (<i>Mellissa officinalis</i> L.)	Folhas	M1-l213B, Midea	0,21%	Ye <i>et al.</i> , 2023
Salsão (<i>Apium graveolens</i> L.)	Sementes	MWD 119 WH, Whirlpool, China,	-	Nouioura <i>et al.</i> , 2024
Canela-da-indonésia (<i>Cinnamomum burmannii</i>)	Folhas	P70D20N 1P-G5, Galanz	12,35 mL/kg	Wang <i>et al.</i> , 2023
<i>Citrus medica</i> L. var. <i>arcodactylis</i>	Cascas	-	1,65%	Wei <i>et al.</i> , 2023
<i>Thlaspi arvense</i> L	Folhas e sementes	P70D20N 1P-G5 (W0), Galanz	0,77 mg/g (Folhas) 2,69 mg/g (Semente)	Zhao <i>et al.</i> , 2022
Cardamomo Grande (<i>Amomum subulatum</i>)	Sementes	-	3,35%	Mande; Sekar, 2021
Jambu (<i>Acmella oleracea</i> L.)	Frutos	Milestone ETHOS X	0,47%	Spinozzi <i>et al.</i> , 2021
Pinheiro anão siberiano (<i>Pinus pumila</i>)	Espinho	P70D20N 1P-G5, Galanz	12,00 mL/kg	Peng <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Autoria própria.

A análise dos estudos apresentados na Tabela 1 mostra a ampla aplicabilidade da extração assistida por micro-ondas para a obtenção de óleos essenciais a partir de diferentes

matrizes vegetais, incluindo folhas, frutos, sementes, cascas e espinhos. Observa-se que os rendimentos reportados variam, refletindo não apenas as características intrínsecas de cada espécie e da parte vegetal utilizada, mas também as condições operacionais e o tipo de equipamento empregado. Este pode ser realizado por meio de adaptações de equipamentos domésticos, como nos estudos voltados à extração de óleo essencial de *Kaempferia galanga* L. e *Melissa officinalis* L., ou ainda com o uso de equipamentos específicos e dedicados a esse fim, como observado nos trabalhos com *Acmella oleracea* L. e *Syzygium cumini*. Dessa forma, há uma tendência no uso de sistemas de micro-ondas dedicados à extração, como os equipamentos das plataformas Milestone, os quais oferecem maior controle de potência, tempo e segurança operacional em comparação a sistemas convencionais, Galanz e Midea. Embora os rendimentos sejam expressos em diferentes unidades, os resultados demonstram que a tecnologia de micro-ondas é capaz de alcançar extrações eficientes em tempos reduzidos, preservando compostos voláteis e bioativos.

2.6 Pré-tratamento para extração de óleo essencial

A extração de óleos essenciais pode ser aperfeiçoada por meio do uso de pré-tratamentos que promovem alterações nas propriedades físicas e químicas do material vegetal. A alteração no tamanho das partículas do material vegetal é um fator determinante para a eficiência da extração. A redução do diâmetro das partículas, por corte ou moagem, aumenta a área de superfície exposta, reduzindo a resistência à transferência de massa e otimizando a transferência de calor. Essa estratégia simples, porém eficaz, melhora o rendimento de óleos essenciais, independentemente do método de extração empregado (Mohideen *et al.*, 2021). Além disso, a secagem, por exemplo, é um método amplamente utilizado para melhorar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais. Estudos demonstram que amostras secas em estufas apresentam rendimentos superiores em relação às amostras frescas, com uma média de 1,07%, enquanto amostras frescas apresentam apenas 0,2% (Kamal *et al.*, 2011). O controle da temperatura durante a secagem é fundamental, pois temperaturas acima de 40 °C podem danificar os tricomas foliares, locais onde os óleos são armazenados, levando à volatilização dos constituintes químicos, como monoterpenos, enquanto temperaturas mais amenas favorecem a retenção desses compostos (Khangholi; Rezaeinodehi; Sefidkon, 2006). Assim, a escolha do método de secagem deve equilibrar o rendimento do óleo com a preservação de suas características químicas.

Ademais, o pré-tratamento com as micro-ondas é uma abordagem que combina eficiência e sustentabilidade. Esse método utiliza radiação para interagir com as moléculas de polissacarídeos e a umidade presentes nas paredes celulares, causando sua ruptura e permitindo uma extração mais rápida (Joco *et al.*, 2023). Estudos apontam que amostras submetidas a apenas três minutos de exposição a micro-ondas, apresentaram rendimento de óleo significativamente maior em comparação com amostras não tratadas (Che Radzi; Kasim, 2020). O uso de enzimas, como pré-tratamento, na extração também contribui para a eficiência da etapa, pois atuam hidrolisando os constituintes da parede celular do material vegetal e, consequentemente, facilitando a liberação do óleo essencial. Quando combinadas com as micro-ondas, intensificam a ruptura das estruturas celulares, o rendimento do óleo essencial pode ser ainda mais elevado devido aos efeitos sinérgicos das duas técnicas (Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2022). Dessa forma, a escolha de métodos de pré-tratamento deve, portanto, considerar o equilíbrio entre eficiência, custos e preservação da qualidade do óleo essencial.

2.7 Fermentação em estado sólido e uso das enzimas no pré-tratamento para o processo de extração de óleo essencial

A fermentação em estado sólido (FES) é reconhecida pela produção de enzimas, utilizando substratos sólidos como suporte e fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Esse processo é vantajoso por oferecer alta concentração de enzimas e maior estabilidade do produto final (Sadh; Duhan; Duhan, 2018). Além disso, a FES permite a utilização de resíduos agroindustriais como substratos, contribuindo para o reaproveitamento de materiais que seriam descartados, agregando valor econômico e ambiental (Fasiku; Bello; Odeniyi, 2023). Esse método transforma resíduos em recursos para aplicações biotecnológicas, como a extração de óleos essenciais e outros produtos de interesse industrial (Santos Da Silva Quinto *et al.*, 2025; Souza; Magalhães, 2010). No contexto de extração de óleos essenciais, a FES é relevante, pois o uso de enzimas pode melhorar os processos de ruptura celular, resultando em maior eficiência na liberação de compostos bioativos (Tavares *et al.*, 2024).

Dentre os resíduos agroindustriais usados como substratos na FES, destacam-se os subprodutos da indústria de beneficiamento do cacau, amplamente disponíveis em países produtores, como o Brasil, e frequentemente subutilizados. A casca da amêndoa de cacau apresenta natureza lignocelulósica, com teores expressivos de celulose, hemicelulose e lignina, características que favorecem sua utilização como suporte físico e fonte de carbono para o

crescimento de fungos filamentosos e a produção de enzimas hidrolíticas (Silva et al., 2025). A composição estrutural desse resíduo é compatível com a ação de complexos enzimáticos lignocelulolíticos, eficientes na modificação da parede celular vegetal (Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Tavares *et al.*, 2024). Sendo assim, a casca da amêndoa do cacau destaca-se como uma alternativa promissora para utilização como substrato fermentativo em processos biotecnológicos, evidenciando sua viabilidade para a produção de extratos enzimáticos e sua contribuição para estratégias de valorização de subprodutos agroindustriais (Almeida Lessa *et al.*, 2023; Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2024).

A produção de enzimas por FES é influenciada por diversos fatores, incluindo o tipo de substrato, as características do microrganismo empregado e as condições de fermentação, como temperatura, tempo e umidade (Tavares *et al.*, 2024). Diferentes microrganismos, como fungos e bactérias, são utilizados, sendo os gêneros *Aspergillus* e *Bacillus* frequentemente destacados pela sua eficiência na produção de enzimas hidrolíticas (Fasiku; Bello; Odeniyi, 2023; Morsy; Hammad, 2021). Dentre estes, o *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso conhecido por produzir metabólitos, ácidos orgânicos e enzimas, que são reconhecidas como seguras (GRAS) de acordo com a Food and Drug Administration (FDA) e, dessa forma, integra processos na indústria biotecnológica, como a sacarificação, degradação de corantes, extração de compostos bioativos (E. *et al.*, 2002; Santos Da Silva Quinto *et al.*, 2025; Silva *et al.*, 2025; Tavares *et al.*, 2024; Zhursinali; Kurmanbaev, 2020). A composição enzimática pode ser ajustada conforme o substrato e os objetivos da aplicação, aumentando a eficiência do processo (Silva et al., 2025). Estudos demonstram que os extratos enzimáticos, compostos por celulasas, hemicelulasas e pectinases, apresentam maior eficácia no pré-tratamento para a extração de óleos essenciais em comparação com enzimas isoladas, devido à ação sinérgica ou complementar dessas enzimas (Tavares *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2020).

Essas enzimas atuam na degradação da parede celular, rompendo estruturas compostas por celulose, hemicelulose, xilana, pectina e lignina (Morsy; Hammad, 2021; Zhang *et al.*, 2020). A quebra das ligações internas das fibras celulares ocorre por meio da ação combinada de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases, que trabalham de maneira sequencial e sinérgica (Tavares *et al.*, 2024). Análises microscópicas demonstram que essa ação enzimática facilita a liberação de óleos essenciais sem causar alterações indesejáveis nos compostos químicos, como mudanças em compostos termolábeis (Costa *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2024).

De modo geral, o pré-tratamento enzimático da matriz vegetal à etapa de extração constitui uma estratégia eficiente para potencializar o processo de obtenção de óleos essenciais.

A literatura relata aumentos expressivos no rendimento e reduções no tempo de extração quando comparados aos processos conduzidos sem o uso de enzimas, sendo esses efeitos atribuídos à modificação estrutural da parede celular promovida pela ação hidrolítica sobre celulose, hemicelulose e pectina. Morsy e Hammad (2020), por exemplo, observaram aumento de aproximadamente 45% no rendimento do óleo essencial de *Ocimum canum*, associado à redução substancial do tempo de hidrodestilação, sem prejuízos à qualidade do óleo obtido. De forma semelhante, Zhang *et al.* (2020) demonstraram que a aplicação de *blends* enzimáticos promoveu maior liberação de óleo essencial de *Artemisia argyi* em comparação ao uso de enzimas isoladas, evidenciando o efeito sinérgico entre diferentes carboidrases na ruptura da matriz vegetal. Sendo assim, os resultados do estudo indicam que o uso individual de enzimas, como hemicelulase e pectinase, resultou em rendimentos menores de aproximadamente 2,6 mg/g e 2,8 mg/g, respectivamente. Em contraste, a aplicação de um blend enzimático composto por celulase, pectinase e papaína promoveu um aumento expressivo do rendimento, alcançando $5,01 \pm 0,21$ mg/g, superando inclusive o melhor desempenho observado para a papaína isolada ($\sim 4,3$ mg/g).

Além disso, estudos indicam que extratos enzimáticos brutos produzidos por FES apresentam vantagens técnicas e econômicas em relação a enzimas comerciais purificadas, uma vez que contêm conjuntos multienzimáticos naturalmente balanceados, capazes de atuar simultaneamente sobre diferentes componentes estruturais da parede celular (Dos Santos Reis *et al.*, 2020). Ademais, a aplicação dessas enzimas como pré-tratamento não ocasiona alterações indesejáveis no perfil químico dos óleos essenciais, preservando compostos voláteis e termolábeis, conforme evidenciado por análises cromatográficas e microscópicas (Costa *et al.*, 2022). Assim, o uso de enzimas produzidas por FES configura-se como uma abordagem promissora para maior eficiência da extração de óleos essenciais, conciliando aumento de rendimento, preservação da qualidade e viabilidade tecnológica.

2.8 Avaliação analítica do óleo essencial

A análise dos compostos presentes no óleo essencial é realizada por cromatografia gasosa (CG), técnica que separa os compostos voláteis e, em seguida, são conduzidos ao detector. Para identificação estrutural, a CG é acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM), permitindo a identificação dos compostos por meio da comparação dos espectros de massas com bibliotecas de referência e da confirmação pelo índice de retenção, quando disponível (Nabi *et al.*, 2025; Sadgrove; Padilla-González; Phumthum, 2022). Usando essa técnica,

Hassanein *et al.* (2020) mostraram que o perfil químico do óleo essencial de *Origanum majorana* varia conforme o método de extração: as frações de sabineno e γ -terpineno passaram de 2,9 % e 9,0 % na hidrodestilação convencional para 5,2 % e 14,2 % na extração assistida por micro-ondas, respectivamente, enquanto cis- β -terpineol e trans- β -terpineol diminuíram de 18,9 % para 10,8 % e de 5,4 % para 2,4 %. Esses resultados evidenciam a utilidade da CG-EM na comparação do perfil químico de óleos essenciais obtidos por diferentes métodos de extração.

Outros métodos analíticos são realizados para investigar a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos óleos essenciais. O teor de compostos fenólicos costuma ser estimado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, no qual os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico do reagente oxidam fenóis, formando um cromóforo azul quantificável por espectrofotometria; os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico (Michiu *et al.*, 2022). Para a determinação individual de fenólicos, emprega-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Em sementes de coentro, a hidrodestilação assistida por micro-ondas elevou o teor de fenólicos totais para 0,1895 mg GAE/100 g, comparado a 0,164 mg GAE/100 g obtidos pela hidrodestilação convencional (Ghazanfari *et al.*, 2020). Para o óleo essencial de *Thymus mastichina*, contudo, os diferentes métodos de extração resultaram em valores equivalentes de fenólicos totais (Araujo *et al.*, 2021).

A capacidade antioxidante é frequentemente avaliada pela capacidade de neutralizar radicais estáveis como 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) (Araujo *et al.*, 2021) ou 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺•). No ensaio ABTS, o cátion radical pré-formado é reduzido pelos antioxidantes da amostra, e a descoloração observada é proporcional ao poder redutor (Feng; Zhang, 2020). Para *T. mastichina*, a concentração inibitória média (IC₅₀) no ensaio ABTS foi de 1,69 mg equivalentes de ácido gálico g⁻¹ na destilação a vapor e 2,44 mg equivalentes de ácido gálico g⁻¹ na extração assistida por micro-ondas, evidenciando a maior eficiência antioxidante do óleo obtido por micro-ondas (Araujo *et al.*, 2021).

Ademais, outros métodos empregados para complementar a avaliação da atividade antioxidante incluem o ensaio de Poder Antioxidante de Redução Férrica (FRAP) e o teste de branqueamento do β -caroteno-ácido linoleico. O ensaio FRAP baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes presentes na amostra em reduzir o íon férrico (Fe³⁺) a íon ferroso (Fe²⁺) em meio ácido. A formação do complexo ferroso com o reagente cromogênico resulta em coloração azul intensa, cuja absorbância é proporcional ao poder redutor da amostra. Assim, quanto maior a capacidade de doação de elétrons, maior será o valor de FRAP, indicando maior

potencial antioxidante por mecanismo de transferência de elétrons (Munteanu; Apetrei, 2021; Xiao *et al.*, 2020). Em óleo essencial de *Euphorbia calyptrata* L., por exemplo, foi observado valor de EC_{50} de $80,25 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$, evidenciando atividade redutora significativa (El Kamari *et al.*, 2024). Para cultivares de *Citrus aurantium* L., os valores de FRAP variaram entre $20,62 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ e $55,92 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, demonstrando diferenças no potencial antioxidante em função da variabilidade química entre as amostras (Badalamenti *et al.*, 2022).

Para avaliar a capacidade antioxidante em sistemas lipídicos, é realizado o ensaio de branqueamento do β -caroteno-ácido linoleico. Nesse teste, o ácido linoleico sofre oxidação, gerando radicais livres que promovem a descoloração do β -caroteno. A presença de antioxidantes na amostra retarda esse processo, atuando como barreira protetora contra a peroxidação lipídica (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2020). Dessa forma, quanto maior o tempo necessário para a perda de coloração ou maior o percentual de inibição do branqueamento, maior é o efeito protetor do óleo essencial sobre o sistema lipídico. No estudo com *Euphorbia calyptrata* L., foi registrada inibição de $94,83 \pm 2,11\%$ no teste de branqueamento do β -caroteno, indicando elevada eficiência na proteção contra a oxidação. Para cultivares de *Citrus aurantium* L., os valores de IC_{50} variaram de $15,46 \mu\text{g/mL}$ (cultivar ‘Fasciata’) a $55,72 \mu\text{g/mL}$ (cultivar ‘Crispifolia’), reforçando a influência da composição química na atividade antioxidante observada (Badalamenti *et al.*, 2022; El Kamari *et al.*, 2024). Esses ensaios complementam métodos como DPPH• e ABTS⁺•, pois permitem avaliar diferentes mecanismos de ação antioxidante, incluindo transferência de elétrons (FRAP) e proteção contra oxidação lipídica (β -caroteno-ácido linoleico), proporcionando uma análise mais abrangente do potencial bioativo dos óleos essenciais.

3 REFERÊNCIAS

- AGROSPICE. Pimenta-da-jamaica. Agrospace; 2023. Disponível em: http://www.agrospace.com.br/ver_produto.asp?cod=51. Acesso em: 20 jul. 2025
- ALMEIDA LESSA, Ozana *et al.* Structural alteration of cocoa bean shell fibers through biological treatment using *Penicillium roqueforti*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, v. 53, n. 9, p. 1154–1163, 3 out. 2023.
- ARAÚJO, André R. T. S. *et al.* Solvent-Free Microwave Extraction of Thymus mastichina Essential Oil: Influence on Their Chemical Composition and on the Antioxidant and Antimicrobial Activities. Pharmaceuticals, v. 14, n. 8, p. 709, 22 jul. 2021.
- BADALAMENTI, Natale *et al.* Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Essential Oils, and Their Combinations, Obtained from Flavedo By-Product of Seven Cultivars of Sicilian Citrus aurantium L. Molecules, v. 27, n. 5, p. 1580, 27 fev. 2022.
- BAJPAI, Vivek K.; BAEK, Kwang-Hyun; KANG, Sun Chul. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Research International, v. 45, n. 2, p. 722–734, mar. 2012.
- BOLOURI, Parisa *et al.* Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. Molecules, v. 27, n. 24, p. 8999, 16 dez. 2022.
- BOUDRAA, Hayet *et al.* Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from fennel seeds: Optimization using Plackett–Burman design and response surface methodology. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, v. 23, p. 100307, maio 2021.
- BOUGUERRA ASMA; AGGOUNE RANIA; SAADI NOURELHOUDA. Étude comparative des méthodes d'extraction des huiles essentielles dans les plantes. Algeria: Université Mohamed Boudiaf M'Sila. [S.l.: S.n.].
- BOUSBIA, Nabil. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. [S.d.].
- CHANDRASHEKHAR KAMBLE, Dr. Meghla. A Comprehensive review of Clove (Syzygium aromaticum) with special references of Ayurvedic and Modern Sciences. International Journal of Pharmaceutical Research and Applications, v. 09, n. 06, p. 700–704, jun. 2024.
- CHE RADZI, Nurhaslina; KASIM, Filzah Anati. Effect of Microwave Pretreatment on Gaharu Essential Oil Using Hydrodistillation Method. Indonesian Journal of Chemistry, v. 20, n. 4, p. 960, 10 jun. 2020.
- CHEMAT, A.; ABERT-VIAN, M.; FERNANDEZ, X. Microwave-assisted extraction of essential oils and aroma. Berlin, Germany: Springer Science & Business Media, 2013.
- Chemical Composition of Essential Oil of Genus Pimenta (Myrtaceae): Review. In: CONTRERAS-MORENO, Billmary Zuleyma (Ed.). Potential of Essential Oils. [S.l.]: InTech, 2018.

CHEN, Guanghui *et al.* Enhanced extraction of essential oil from *Cinnamomum cassia* bark by ultrasound assisted hydrodistillation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 36, p. 38–46, ago. 2021.

CIMINO, Cinzia *et al.* Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 3, p. 327, 3 mar. 2021.

COSTA, Matheus Andrade Rocha *et al.* Application crude multienzyme extract from *Aspergillus niger* as a pretreatment for the extraction of essential oil from *Croton argyrophyllus* leaves. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 69, n. 5, p. 1843–1856, out. 2022.

DHIFI, Wissal *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, v. 3, n. 4, p. 25, 22 set. 2016.

DOGAN, Habib. Extraction of essential oil from *Salvia fruticosa* using a newly developed microwave-assisted distillation system for industrial applications. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 39, p. 101626, jun. 2024.

DOS SANTOS REIS, Nadabe *et al.* Enzyme extraction by lab-scale hydrodistillation of ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe): Chromatographic and micromorphological analyses. *Industrial Crops and Products*, v. 146, p. 112210, abr. 2020.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 446–452, jun. 2006.

DURCZYŃSKA, Zofia; ŻUKOWSKA, Grażyna. Properties and Applications of Essential Oils: A Review. *Journal of Ecological Engineering*, v. 25, n. 2, p. 333–340, 1 fev. 2024.

E., Schuster *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 1 jan. 2002.

EL KAMARI, Fatima *et al.* Chemical Profiling and Antioxidant, Antimicrobial, and Hemolytic Properties of *Euphorbia calypttrata* (L.) Essential oils: *in Vitro* and *in Silico* Analysis. *ChemistryOpen*, v. 13, n. 8, p. e202300243, ago. 2024.

Essential Oil Extraction Process. *In: SOUIY, Zoubeida (Ed.). Biochemistry. [S.l.]: IntechOpen, 2024.*

FAN, Rui *et al.* The Pulsed Electric Field Assisted-Extraction Enhanced the Yield and the Physicochemical Properties of Soluble Dietary Fiber From Orange Peel. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, p. 925642, 22 jul. 2022.

FARHAT, Asma *et al.* Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, v. 125, n. 1, p. 255–261, mar. 2011.

FASIKU, Samuel Adedayo; BELLO, Mobolaji Akeem; ODENIYI, Olubusola Ayoola. Production of xylanase by *Aspergillus niger* GIO and *Bacillus megaterium* through solid-state fermentation. *Access Microbiology*, v. 5, n. 6, 1 jun. 2023.

FENG, Yan-Ni; ZHANG, Xi-Feng. Polysaccharide extracted from *Huperzia serrata* using response surface methodology and its biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 157, p. 267–275, ago. 2020.

FLÓREZ, Noelia; CONDE, Enma; DOMÍNGUEZ, Herminia. Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 590–607, abr. 2015.

FORDOS, Summaia *et al.* Saponins: Advances in extraction techniques, functional properties, and industrial applications. *Applied Food Research*, v. 5, n. 2, p. 101146, dez. 2025.

GHAZANFARI, Negin *et al.* Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, v. 6, n. 9, p. e04893, set. 2020.

HAMMOUDA, Fm *et al.* Evaluation Of The Essential Oil Of *Foeniculum Vulgare* Mill (Fennel) Fruits Extracted By Three Different Extraction Methods By Gc/Ms. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 11, n. 2, p. 277, 1 jul. 2014.

HASSANEIN, Heba D. *et al.* Profiling of essential oil chemical composition of some Lamiaceae species extracted using conventional and microwave-assisted hydrodistillation extraction methods via chemometrics tools. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 35, n. 3, p. 329–340, maio 2020.

HOSSAIN, Md. Murad *et al.* Microwave and ultrasound assisted extraction techniques with citric acid of pectin from Pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Measurement: Food*, v. 13, p. 100135, mar. 2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Aromatic natural raw materials — Vocabulary. Geneva: [S.n.].

JAIN, Preeti L. B.; PATEL, Sanjaykumar R.; DESAI, Meghal A. Patchouli oil: an overview on extraction method, composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, v. 34, n. 1, p. 1–11, 2 jan. 2022.

JOCO, Randy A. *et al.* Recent Development on the Extraction Process of Plants Essential Oil and its Effect on Chemical Composition: A Review. *Advanced Journal of Graduate Research*, v. 14, n. 1, p. 9–20, 14 out. 2023.

KAMAL, G. M. *et al.* Yield and chemical composition of citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. v. 18, n. 4, p. 1275–1282, 2011.

KARBUZ, Pinar; TUGRUL, Nurcan. Microwave and ultrasound assisted extraction of pectin from various fruits peel. *Journal of Food Science and Technology*, v. 58, n. 2, p. 641–650, fev. 2021.

KHANGHOLI, S.; REZAEINODEHI, A.; SEFIDKON, F. Effect of drying methods on essential oil content and composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Planta Medica*, v. 72, n. 11, 24 ago. 2006.

KHRUENGSAI, Sarunpron *et al.* Optimization of enzyme-assisted microwave extraction of *Zanthoxylum limonella* essential oil using response surface methodology. *Scientific Reports*,

v. 13, n. 1, p. 12872, 8 ago. 2023.

KITIR ŞEN, Nurgül; DURAN, Ahmet. A new approach on essential oil production of *Origanum onites* L.: Microbial fertilization and microwave extraction. *Heliyon*, v. 9, n. 9, p. e20211, set. 2023.

KUSUMA, Heri Septya; MAHFUD, Mahfud. Preliminary Study: Kinetics of Oil Extraction from Sandalwood by Microwave-assisted Hydrodistillation. *ASEAN Journal of Chemical Engineering*, v. 15, n. 2, p. 62, 19 abr. 2016.

LI, Shuang; CHEN, Lifei; ZHOU, Yunwei. Essential oil obtained from *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* leaf using solvent-less microwave irradiation-induced hydrodistillation and extraction in situ. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 36, p. 101259, dez. 2023.

LÓPEZ-SALAZAR, Herminia *et al.* Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review. *BioResources*, v. 18, n. 3, 14 jun. 2023.

LORENZO-LEAL, Ana Cecilia *et al.* Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils. *BioMed Research International*, v. 2019, p. 1–8, 7 maio 2019.

MANDE, Prashant; SEKAR, Nagaiyan. Comparative study of chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of essential oils isolated from the seeds of *Amomum subulatum* by using microwave extraction and hydro-distillation methods. *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 98, n. 11, p. 100201, nov. 2021.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, Moises *et al.* Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v. 108, n. 2, p. 481–487, fev. 2011.

MÉRIDA-REYES, Max Samuel *et al.* Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Pimenta dioica* (L.) Merr. from Guatemala. *Medicines*, v. 7, n. 10, p. 59, 23 set. 2020.

Methods for Extracting Essential Oils. *In*: STRATAKOS, Alexandros Ch; KOIDIS, Anastasios (Eds.). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 31–38.

MICHIU, Delia *et al.* Implementation of an Analytical Method for Spectrophotometric Evaluation of Total Phenolic Content in Essential Oils. *Molecules*, v. 27, n. 4, p. 1345, 16 fev. 2022.

MOHIDEEN, Mazlin *et al.* A review on extraction methods of essential oil from kaffir lime (*citrus hystrix*) leaves. *Journal of Academia*, p. 173–184, 2021.

MOLLAELI, Saeed *et al.* Extraction of essential oils of *Ferulago angulata* with microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, v. 137, p. 43–51, out. 2019.

MONTALVO LOPEZ, Isis; MOLINA TORRES, Jorge; MONTALVO HERNÁNDEZ, Domingo. Diversity of Volatile Organic Compounds in leaves of *Pimenta dioica* L. Merrill at

Different Developmental Stages from Fruiting and no-fruited Trees. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 65, n. 3, 1 jul. 2021.

MORSY, Nashwa F. S.; HAMMAD, Karima S. M. Extraction of essential oil from methyl cinnamate basil (*Ocimum canum* Sims) with high yield in a short time using enzyme pretreatment. *Journal of Food Science and Technology*, v. 58, n. 7, p. 2599–2605, jul. 2021.

MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021.

MURTI, Yogesh *et al.* Innovative methods for extraction of essential oils from medicinal plants. *International Journal of Secondary Metabolite*, v. 10, n. 2, p. 190–230, 16 jun. 2023.

NABI, Md. Hassan Bin *et al.* Essential oils: Advances in extraction techniques, chemical composition, bioactivities, and emerging applications. *Food Chemistry Advances*, v. 8, p. 101048, set. 2025.

National Center For Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 3314, Eugenol*. PubChem. Bethesda: National Library of Medicine, [s. d.]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>. Acesso em: 27 maio 2026.

NI, Zhi-Jing *et al.* Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, v. 110, p. 78–89, abr. 2021.

NOUIOURA, Ghizlane *et al.* Exploring the essence of celery seeds (*Apium graveolens* L.): Innovations in microwave-assisted hydrodistillation for essential oil extraction using in vitro, in vivo and in silico studies. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 17, n. 5, p. 105726, maio 2024.

OGUNWANDE, Isiaka A. *et al.* Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 232, p. 188–192, 25 mar. 2019.

OLIVEIRA, Rosilene Aparecida De *et al.* Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 771–775, set. 2009.

PENG, Xiaojin *et al.* Essential oil extraction from fresh needles of *Pinus pumila* (Pall.) Regel using a solvent-free microwave-assisted methodology and an evaluation of acetylcholinesterase inhibition activity in vitro compared to that of its main components. *Industrial Crops and Products*, v. 167, p. 113549, set. 2021.

PONMURUGAN, K. *et al.* Ultrasound assisted pectic polysaccharide extraction and its characterization from waste heads of *Helianthus annuus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 173, p. 707–713, out. 2017.

RANA, G. M. Masud *et al.* Assessment of the essential oil extracted from *Citrus aurantifolia* leaves using solvent-free microwave extraction technique. *Food Chemistry Advances*, v. 6, p. 100913, mar. 2025a.

RANA, G. M. Masud *et al.* Microwave-assisted extraction of essential oils from basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) and coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.): A comparative study

on chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Applied Food Research*, v. 5, n. 1, p. 100977, jun. 2025b.

RANA, G. M. Masud *et al.* Solvent-free microwave extraction and hydrodistillation extraction of essential oils from *Syzygium cumini* leaves: Comparative analysis of chemical constituents, in vitro and in silico approaches. *LWT*, v. 228, p. 118074, jul. 2025c.

RASSEM, Hesham HA; ABDURAHMAN, H. Nour; ROSLI M, Yunus. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *Techniques for extraction of essential oils from plants: a review.*, p. 117–127, 2016.

RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunni Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250–264, dez. 2014.

RICHA, Rishi *et al.* Ultrasound assisted essential oil extraction technology: New boon in food industry. *Ultrasound assisted essential oil extraction technology: New boon in food industry*, 2020.

SADGROVE, Nicholas; PADILLA-GONZÁLEZ, Guillermo; PHUMTHUM, Methee. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants*, v. 11, n. 6, p. 789, 16 mar. 2022.

SADH, Pardeep Kumar; DUHAN, Surekha; DUHAN, Joginder Singh. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, n. 1, dez. 2018.

SALINAS, Francisca *et al.* Supercritical fluid extraction of chañar (*Geoffroea decorticans*) almond oil: Global yield, kinetics and oil characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 161, p. 104824, jul. 2020.

SANLI, Ilayda; OZKAN, Gulay; ŞAHIN-YEŞİLÇUBUK, Neşe. Green extractions of bioactive compounds from citrus peels and their applications in the food industry. *Food Research International*, v. 212, p. 116352, jul. 2025.

SANTOS DA SILVA QUINTO, Alisson *et al.* Valorization of agri-food by-products for laccase oxidative multienzyme extract production and dye degradation: A sustainable biodegradation approach. *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 102, n. 6, p. 101717, jun. 2025.

SILVA, Fabiane N. *et al.* Sustainable Sugar Syrup Production from Rice Husk Using *Aspergillus niger* Carbohydrase. *ACS Omega*, v. 10, n. 29, p. 32161–32173, 29 jul. 2025.

SONG, Zhanlong *et al.* Study on the microwave extraction process and product distribution of essential oils from citrus peel. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, v. 171, p. 108726, jan. 2022.

SOUYI, Zoubeida *et al.* Nutritional, physical, microbial, and sensory characteristics of gluten- and sugar-free cereal bar enriched with spirulina and flavored with neroli essential oil. *LWT*, v. 169, p. 113955, nov. 2022.

SOUZA, Márcio da Silva *et al.* Fermented cocoa bean shell by-product as an enhanced adsorbent for dye of the textile industry. *Biomass Conversion and Biorefinery*, jul. 2024.

SOUZA, Paula Monteiro De; MAGALHÃES, Pérola De Oliveira E. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 850–861, dez. 2010.

SPINOZZI, Eleonora *et al.* Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Industrial Crops and Products*, v. 172, p. 114027, nov. 2021.

TAVARES, Iasnaia Maria De Carvalho *et al.* Improving the extraction yield of essential oil from *Pimenta dioica* (L.) Merr. using *Aspergillus niger* ATCC 1004 enzyme blend. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, p. bab.2658, 20 ago. 2024.

TEIGISEROVA, Dominika Alexa *et al.* A step closer to circular bioeconomy for citrus peel waste: A review of yields and technologies for sustainable management of essential oils. *Journal of Environmental Management*, v. 280, p. 111832, fev. 2021.

VATHSALA, V. *et al.* Ultrasound-assisted extraction (UAE) and characterization of citrus peel pectin: Comparison between pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) and sweet lime (*Citrus limetta* Risso). *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 37, p. 101357, fev. 2024.

WANG, Zehao *et al.* Solvent-free microwave extraction of essential oil and hydrosol from fresh leaves of *Cinnamomum burmannii* (Nees et T. Nees) Blume after screw extrusion treatment and evaluation of pancreatic lipase inhibitory activities in vitro compared to its main components. *Industrial Crops and Products*, v. 202, p. 116983, out. 2023.

WEI, Enwei *et al.* Microwave-assisted extraction releases the antioxidant polysaccharides from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 280–290, fev. 2019.

WEI, Liang *et al.* Optimization of solvent-free microwave extraction of essential oil from the fresh peel of *Citrus medica* L. var. *arcodactylis* Swingle by response surface methodology, chemical composition and activity characterization. *Scientia Horticulturae*, v. 309, p. 111663, fev. 2023.

WU, Huan *et al.* Chemical profiles of allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) water and ethanol extracts and their antivirus and radical scavenging activities. *Food Research International*, v. 205, p. 115950, mar. 2025.

XIAO, Fan *et al.* Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, v. 1, n. 1, p. 60–69, mar. 2020.

YE, Rumeng *et al.* Extraction process optimization of essential oil from *Melissa officinalis* L. using a new ultrasound-microwave hybrid-assisted Clevenger hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, v. 203, p. 117165, nov. 2023.

YEASMIN, Mst. Sarmina *et al.* Optimization of green microwave-assisted extraction of essential oil from lemon (*Citrus limon*) leaves: Bioactive, antioxidant and antimicrobial potential. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, v. 8, p. 100413, 2024.

YOUSEFI, Mohammad *et al.* Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, p. 182–193, set. 2019.

ZHANG, Lei; L. LOKESHWAR, Bal. Medicinal Properties of the Jamaican Pepper Plant *Pimenta dioica* and Allspice. *Current Drug Targets*, v. 13, n. 14, p. 1900–1906, 31 dez. 2012.

ZHANG, Qiang *et al.* Aqueous enzyme-ultrasonic pretreatment for efficient isolation of essential oil from *Artemisia argyi* and investigation on its chemical composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, v. 158, p. 113031, dez. 2020.

ZHANG, Qingfen *et al.* Optimized essential oil extraction method based on salt solution-enhanced homogenization pretreatment and microwave extraction for *Kaempferia galanga* L. *Microchemical Journal*, v. 213, p. 113661, jun. 2025.

ZHANG, Xiaonan *et al.* Essential oil was extraction from *Cinnamomum camphor* peel using microwave as an aid and study of their inhibitory effect on *Pseudocercospora psidii* fungi. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 105643, mar. 2024.

ZHAO, Ru *et al.* Essential oil obtained from *Thlaspi arvense* L. leaves and seeds using microwave-assisted hydrodistillation and extraction in situ by vegetable oil and its antifungal activity against *Penicillium expansum*. *LWT*, v. 165, p. 113718, ago. 2022.

ZHURSINALI, A. B.; KURMANBAEV, A. A. Biologically Active Substances of Fungus *Aspergillus Niger*. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, n. 1, 10 jan. 2020.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Otimizar as condições do pré-tratamento enzimático para a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L. por hidrodestilação assistida por micro-ondas, utilizando extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido da casca da amêndoa de cacau com *Aspergillus niger* 1004.

2. Objetivos Específicos

- Extrair e quantificar o extrato enzimático bruto por fermentação em estado sólido da casca da amêndoa de cacau utilizando *Aspergillus niger*, seguindo as condições de Silva *et al.*, 2025).
- Determinar as condições ótimas do pré-tratamento enzimático para aumentar o rendimento do óleo essencial de *Pimenta dioica* L., avaliando os efeitos do pH e do volume de extrato enzimático bruto.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático bruto no rendimento do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. obtido por hidrodestilação assistida por micro-ondas.
- Comparar a composição química do óleo essencial obtido por hidrodestilação assistida por micro-ondas, com e sem pré-tratamento enzimático, a fim de verificar das proporções relativas entre as condições.
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial obtido por hidrodestilação assistida por micro-ondas, com e sem pré-tratamento enzimático.

CAPÍTULO III

ARTIGO: OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA HIDRODESTILAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE *PIMENTA DIOICA* L.: EFEITOS SOBRE O RENDIMENTO, A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL

Otimização do pré-tratamento enzimático para hidrodestilação assistida por micro-ondas de *Pimenta dioica* L.: efeitos sobre o rendimento, a composição química e a atividade antioxidante do óleo essencial

Caio A. de Oliveira¹, Marla R. M. F. Ramos², Geovanna S. L. Reis², Júlia L. Nascimento², Yane N. Valadares¹, Erik G. P. Silva², Grazielly S. de Jesus², Manuela B. do Nascimento³, Paulo Roberto R. Mesquita³, Fabiane N. Silva⁴, Marcelo Franco²

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BR-415, km 04, s/n, Itapetinga, Bahia, 45700-000, Brasil.

² Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Km 16, Ilhéus, Bahia, 45662-900, Brasil.

³ Laboratório de Alimentos, Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, 40170110, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, 39404-547.

Resumo

Este estudo avaliou o efeito do pré-tratamento enzimático na extração do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. por hidrodestilação assistida por micro-ondas, bem como a otimização do processo e seus efeitos sobre rendimento, composição química e atividade antioxidante. O extrato enzimático bruto foi obtido por fermentação em estado sólido da casca da amêndoa de cacau com *Aspergillus niger* ATCC 1004, e as condições operacionais foram otimizadas por delineamento de Doehlert. A condição ótima (pH 6, 433,5 mL de extrato e 50 °C) resultou em rendimento de $0,75 \pm 0,07\%$, com aumento de 50% em relação ao controle. O eugenol foi o composto majoritário, elevando-se de 66,72% para 96,1% após o pré-tratamento. A atividade antioxidante variou conforme o método, com aumento no ABTS, comportamento semelhante no DPPH e β -caroteno/ácido linoleico, e redução no FRAP.

Palavras-chave: Pimenta-da-Jamaica; Allspice; Fermentação em estado sólido; Eugenol

1.Introdução

A *Pimenta dioica* L. é pertencente à família *Myrtaceae*, nativa da América Central, e possui sua maior produção na Jamaica, onde essa especiaria representa 90% das especiarias exportadas, segundo *Agricultural Commodities Regulatory Authority* (JACRA, 2024). Popularmente, é conhecida como pimenta-da-Jamaica, pimenta-gorda e “allspice”, em razão das suas notas aromáticas remeterem a outras especiarias, como o cravo-da-índia, noz-moscada. Essa semelhança está associada, principalmente, ao fato de que ambas possuem o mesmo composto majoritário, o eugenol, substância relacionada às propriedades analgésicas e antioxidantes descritas das espécies (Montalvo Lopez; Molina Torres; Montalvo Hernández, 2021; Tavares *et al.*, 2024). No entanto, a composição química da *P. dioica* L. pode variar conforme a região de cultivo, as condições climáticas e outros fatores ambientais, influenciando não só o teor de eugenol, mas também dos constituintes minoritários (Pacheco-Hernández *et al.*, 2025).

O óleo essencial de *P. dioica* L., é um produto de alto valor agregado, que pode ser aplicado na culinária, na indústria cosmética e em aplicações farmacológicas. No entanto, sua obtenção ainda enfrenta limitações importantes, sobretudo relacionadas à dificuldade de extração imposta pela própria organização estrutural da matriz vegetal. (Mérida-Reyes *et al.*, 2020; Mohideen *et al.*, 2022; Panda *et al.*, 2025). Essa limitação decorre da composição da parede celular, formada majoritariamente por celulose, hemicelulose e pectina, que conferem rigidez e resistência mecânica às células, atuando como uma barreira física à liberação dos metabólitos voláteis (Silva *et al.*, 2025). Ademais, métodos convencionais de extração, como a hidrodestilação, embora amplamente utilizados, apresentam baixa eficiência operacional, demandando longos períodos de processamento e elevado consumo energético. Sendo assim, há a necessidade de estratégias mais eficientes, capazes de aumentar o rendimento de extração, preservar a qualidade do óleo essencial e reduzir custos energéticos e operacionais, tornando o processo mais competitivo e sustentável (Yu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, diferentes estratégias de pré-tratamento de materiais vegetais têm sido exploradas. Métodos convencionais, como secagem e moagem, ainda são amplamente utilizados, porém apresentam limitações quanto à eficiência de extração (Kamal *et al.*, 2011; Mohideen *et al.*, 2021). Em contrapartida, abordagens mais recentes, como o uso de enzimas, têm se mostrado promissoras por promoverem a desestruturação dos polissacarídeos da parede celular vegetal, facilitando a liberação de compostos de interesse, como óleos essenciais. No entanto, o elevado custo das enzimas comerciais constitui um entrave para aplicação em escala

industrial. Como alternativa tecnicamente viável e economicamente atrativa, a fermentação em estado sólido (FES) permite a obtenção de extratos enzimáticos a partir da valorização de resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca da amêndoa de cacau, subproduto do processamento do cacau (López-Gómez; Venus, 2021; Sath; Duhan; Duhan, 2018). Nesse cenário, o fungo *Aspergillus niger* destaca-se pela elevada capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, eficientes na ruptura das barreiras estruturais da matriz vegetal (Costa *et al.*, 2022; Fasiku; Bello; Odeniyi, 2023; Silva *et al.*, 2025; Tavares *et al.*, 2024).

Além disso, a integração do pré-tratamento enzimático com tecnologias emergentes de extração, como a assistida por micro-ondas, potencializa ainda mais a eficiência do processo. A radiação micro-ondas promove aquecimento rápido do material, elevando a temperatura e a pressão no interior dos tecidos vegetais, o que favorece sua ruptura e a liberação dos compostos voláteis. Essa abordagem integrada resulta em maior rendimento de extração, com redução do tempo de processamento e do consumo energético (Araujo *et al.*, 2021; Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2024).

No caso de *P. dioica* L., a literatura descreve a composição química e algumas propriedades biológicas de seu óleo essencial, bem como o potencial de tecnologias de extração e de estratégias enzimáticas aplicadas a outras matrizes vegetais (Costa *et al.*, 2022; Dos Santos Reis *et al.*, 2020; Morsy; Hammad, 2018; Stewart; Lowe; Watson, 2016). Entretanto, são limitados os estudos que avaliam, de forma conjunta, os efeitos dessa integração sobre o rendimento, o perfil químico e a atividade antioxidante do óleo essencial, evidenciando uma lacuna relevante na literatura. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do pré-tratamento enzimático, obtido por FES da casca de amêndoa do cacau pelo fungo *Aspergillus niger*, na extração do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. por hidrodestilação assistida por micro-ondas, bem como otimizar as condições do processo e avaliar seus impactos no rendimento, na composição química e na atividade antioxidante do óleo essencial obtido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Os frutos secos de *Pimenta dioica* L. (pimenta-da-Jamaica) foram adquiridos no comércio local de Itabuna, Bahia (Brasil). As amostras foram trituradas em moinho de facas no Horto Florestal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

2.2. Resíduo agroindustrial

O resíduo agroindustrial utilizado como substrato na fermentação em estado sólido (FES) foi a casca da amêndoa do cacau (*Theobroma cacao* L.), obtida na forma seca por meio de parcerias com indústrias da região sul da Bahia. O material foi moído até atingir tamanho de partícula inferior a 2 mm, homogeneizado e armazenado, em frascos hermeticamente fechados, à temperatura ambiente, até a sua utilização.

2.3. Micro-organismo e preparo do inóculo

O micro-organismo utilizado, *Aspergillus niger* ATCC 1004, foi fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil). Para o preparo do inóculo, a cepa foi cultivada por sete dias a 26 °C, em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio Batata Dextrose Ágar (PDA; Vetec) suplementado com Ágar-Ágar (Vetec). O meio foi esterilizado em autoclave vertical (modelo CS30, Prismatec, São Paulo, Brasil) a 121 °C por 15 min. Após o período de incubação, os esporos foram recuperados pela adição de esferas de vidro estéreis aos frascos, seguida de leve agitação para seu desprendimento. Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi diluída em tubo de ensaio estéril, e a contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio binocular (modelo BA310, Motic, Xangai, China), a fim de ajustar a concentração do inóculo para os ensaios fermentativos.

2.4. Fermentação em estado sólido e obtenção do extrato bruto enzimático

A FES foi conduzida segundo os protocolos descritos por Silva et al. (2025), com adaptações. Em erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 10 g da casca da amêndoa do cacau previamente preparada, seguida da inoculação de *Aspergillus niger* ATCC 1004 a uma concentração de 10^8 esporos·mL⁻¹. A umidade inicial do substrato foi ajustada para 60%, por meio da adição de água destilada autoclavada. Em seguida, os frascos foram incubados a 28 °C por 96 horas sob condições estáticas.

Após o período de incubação, foram adicionados 100 mL de água destilada a cada erlenmeyer contendo o material fermentado. Os frascos foram então transferidos para um agitador orbital (modelo Q816M22, Quimis, Diadema, Brasil) e mantidos a 30 °C e 200 rpm por 30 minutos. Em seguida, a fase líquida foi separada por prensagem mecânica, e o material obtido foi submetido à centrifugação (modelo LIF510, Labinfarma, São Paulo, Brasil) a 3.000

rpm por 10 minutos para remoção de partículas sólidas. O sobrenadante, correspondente ao extrato enzimático bruto, foi coletado e armazenado em frascos hermeticamente fechados. Posteriormente, os extratos foram mantidos sob congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises e aplicações experimentais.

2.5. Ensaios enzimáticos

A caracterização do extrato bruto enzimático das enzimas exoglucanase, endoglucanase, β -mananase e invertase foi realizada como descrito previamente por Da Silva Nunes *et al.* (2020), Oliveira *et al.* (2018), Karahalil *et al.* (2020) e Ohara *et al.* (2015), respectivamente. Os resultados foram apresentados em U/mL, sendo uma unidade enzimática definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μmol de substrato por minuto, nas condições do ensaio.

2.6. Planejamento experimental (Doehlert) do pré-tratamento enzimático e hidrodestilação de óleo essencial da *Pimenta dioica* L. mediados por micro-ondas

Os parâmetros para o pré-tratamento enzimático da *P. dioica* L. antes da hidrodestilação foram definidos por meio do delineamento experimental do tipo Doehlert, com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis independentes pH (A) volume de extrato enzimático (B) sobre o rendimento (%) do óleo essencial. O tempo foi mantido fixo em 10 minutos, com base em estudos preliminares e na otimização operacional do processo. O pH foi avaliado em cinco níveis (4, 5, 6, 7 e 8), enquanto o volume de extrato enzimático em três níveis (25,5; 229,5 e 433,5 mL), distribuídos conforme a matriz característica do delineamento do Doehlert (Tabela 1).

Tabela 1 Matriz experimental do delineamento Doehlert aplicada à otimização do pré-tratamento enzimático para a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L.

Experimentos	Vol. extrato (mL) - A	pH - B	Rendimento (%)
1	229,5 (0)	8 (+1)	0,64
2	433,5 (+0,866)	7 (+0,5)	0,77
3	229,5 (0)	4 (-1)	0,78

4	25,5 (-0,866)	5 (-0,5)	0,59
5	25,5 (-0,866)	7 (+0,5)	0,46
6	433,5 (+0,866)	5 (-0,5)	0,79
7*	229,5 (0)	6 (0)	0,71
8*	229,5 (0)	6 (0)	0,68
9*	229,5 (0)	6 (0)	0,70

O delineamento resultou em 9 experimentos, três repetições no ponto central. Os resultados foram analisados por ANOVA ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica® 12 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Adicionalmente, foi realizada uma extração controle, sem pré-tratamento enzimático (OES), na condição ótima definida pelo planejamento, nas mesmas condições de temperatura e tempo.

Para hidrodestilação assistida por micro-ondas do óleo essencial da *P. dioica* L., foram pesados 75 g da especiaria seca e moída, os quais foram imersos em 225 mL de água destilada, mantendo-se a razão amostra:solvente de 1:3 (m/v), como sugerido pelo manual do equipamento FlexiWAVE (Microwave Flexible Synthesis System, Milestone, Sorisole, Itália). A mistura permaneceu em repouso por 30 min. Em seguida, adicionou-se o volume de extrato enzimático bruto previamente descongelado, conforme definido no planejamento experimental, completando-se o volume total para 1,5 L com água destilada. O pH foi ajustado de acordo com os valores estabelecidos no planejamento, utilizando pHmetro (modelo TEC-5, Tecnal, Piracicaba, Brasil). As amostras foram submetidas ao sistema de micro-ondas FlexiWAVE (Microwave Flexible Synthesis System, Milestone, Sorisole, Itália) a 50 °C pelo tempo experimental determinado. Após essa etapa, o módulo de fragrâncias foi acoplado ao sistema, e a hidrodestilação assistida por micro-ondas foi conduzida com uma rampa de aquecimento a 1500 W por 6 min e, após este período, foi utilizado o parâmetro de 600 W por 70 minutos. O óleo essencial foi separado por partição líquido-líquido e desidratado com sulfato de sódio anidro. O rendimento (%) foi calculado pela Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo essencial}}{\text{massa amostra de } P.dioica \text{ L.}} \times 100 \quad (1)$$

Os óleos foram armazenados a 4 °C até o momento das análises.

2.7. Caracterização do óleo essencial de *Pimenta dioica* L.

2.7.1 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Alíquotas de 10 mg das amostras dos óleos essenciais de *P.dioica* L., com e sem pré-tratamento enzimático, foram diluídas em 1 mL de diclorometano, de acordo com a metodologia descrita por Marques et al. (2022). O volume de injeção utilizado foi de 1 µL. Os voláteis foram separados e identificados por GC-MS em um cromatógrafo gasoso G3540A GC System (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) equipado com um detector seletivo de massa 5977B (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) usando injeção splitless, hélio como gás de arraste (0,8 mL/min) e uma coluna HP-5MS (5% - fenilmetilpolissiloxano, 30,0 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm, Restek®, Bellefonte, EUA). O tempo e a temperatura foram programados para iniciar a partir de 60 °C, seguido de uma rampa de 180 °C (3,5 °C/min) até 280 °C (25,0 °C/min) durante 5 min, totalizando uma corrida de 43,286 minutos. As linhas de injeção e transferência foram mantidas a 250 °C. A corrente iônica total (70 eV) foi registrada na faixa de massa de m/z 35 a 350 (modo de varredura). As análises foram realizadas em triplicata.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa com a biblioteca NIST e por meio do índice de retenção linear (IRL), determinado utilizando uma série homóloga de n-alcanos (C7–C30).

2.7.2 Ensaios antioxidantes

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* L. foi avaliada por diferentes metodologias *in vitro*, incluindo os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e β-caroteno/ácido linoleico. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. As médias das amostras com (OEP) e sem (OES) pré-tratamento enzimático foram comparadas por meio do teste t de Student, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS.

Ensaio ABTS

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método de descoloração do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺), conforme descrito por Rufino *et al.* (2007), com adaptações para matrizes lipofílicas. Foram avaliadas as duas amostras de óleos essenciais de *P dioica* L., OEP e OES, em triplicata. As amostras foram

previamente solubilizadas em etanol, preparando-se uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL (10 mg de óleo essencial em 10 mL de etanol), a qual foi utilizada diretamente no ensaio (sem diluições adicionais). A atividade antioxidante foi calculada como percentual de inibição do radical ABTS⁺ em relação ao controle, e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

Ensaio DPPH

O ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi conduzido conforme Fukumoto; Mazza. (2000), adaptado para microplacas segundo Cardador-Martínez et al. (2006), com modificações. Foram avaliadas as duas amostras de óleos essenciais de *P. dioica* L., (OEP) e (OES), em triplicata. Os óleos essenciais foram previamente solubilizados em etanol, preparando-se uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL (10 mg de óleo essencial em 10 mL de etanol). A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas (1:2) em etanol etílico absoluto, obtendo-se as seguintes concentrações finais: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 e 0,015625 mg/mL. Os resultados foram expressos como IC₅₀ (mg/mL), definido como a concentração necessária para promover 50% de sequestro do radical DPPH.

Ensaio FRAP

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de redução férrica (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*), conforme Urrea-Victoria et al. (2016). Foram avaliadas as duas amostras de óleos essenciais de *P. dioica* L, OEP e OES, em triplicata. Os óleos essenciais foram previamente solubilizados em álcool etílico absoluto, preparando-se uma solução estoque a 1 mg/mL, a partir da qual foi obtida a diluição de trabalho de 0,125 mg/mL. A quantificação foi realizada por meio de curva de calibração com FeSO₄ (Fe²⁺), construída sob as mesmas condições experimentais, e os resultados foram expressos em µM Fe²⁺ equivalentes.

Ensaio β-caroteno-ácido linoleico

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de descoloração do β-caroteno em sistema β-caroteno/ácido linoleico, conforme Marco (1968) e Velioglu et al. (1997), adaptado para microplacas segundo Cardador-Martínez et al. (2006), com modificações. Inicialmente, foi preparada uma emulsão contendo β-caroteno, ácido linoleico e Tween 20. Foram avaliadas duas amostras de óleos essenciais de *P. dioica* L., (OEP) e (OES), em triplicata. As amostras foram preparadas a partir de solução estoque do óleo essencial a 1 mg/mL, utilizando álcool

etílico absoluto como solvente, e então diluídas para a concentração final de 0,125 mg/mL. O controle consistiu na emulsão sem adição de antioxidante. A atividade antioxidante foi calculada como percentual de proteção (percentual de inibição da degradação do β -caroteno) em relação ao controle, e os resultados foram expressos como percentual de proteção/inibição da oxidação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planejamento experimental tipo Doehlert do pré-tratamento enzimático e hidrodestilação de óleo essencial da *Pimenta dioica* L. mediados por micro-ondas

O modelo estatístico apresentou significância ($p < 0,01$), elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,995$) e ausência de falta de ajuste ($p = 0,814$), conforme demonstrado na Tabela 2, indicando que o modelo descreve adequadamente os efeitos das variáveis pH e volume de extrato enzimático obtido por FES sobre o rendimento do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. Essa capacidade foi confirmada experimentalmente pela repetição do ponto central em triplicata, a qual resultou em rendimento médio de $0,75\% \pm 0,07$, com nível de confiança de 95%, evidenciando a robustez e a reprodutibilidade do sistema na região experimental avaliada.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert aplicado à otimização do pré-tratamento enzimático para a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L.

Fator	SQ	Gl	QM	p	R ²
Modelo de regressão	0,0885	5	0,0177	$p < 0,01$	0,99461
Falta de ajuste	0	1	0	0,814	
Erro puro	0,0005	2	0,0002		
Total	0,0890	8	0,0111		

Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (Gl), quadrado médio (QM), valor de p (p), coeficiente de determinação (R^2)

O gráfico de Pareto (Figura 1) evidenciou que o volume de extrato enzimático bruto apresentou o maior efeito significativo sobre o rendimento do óleo essencial, tanto no termo

linear quanto no quadrático, em comparação ao pH e à interação entre as variáveis. Esse resultado pode ser associado à maior disponibilidade de um sistema multienzimático no extrato bruto, composto por enzimas como endoglucanases (0,47 U/mL), exoglucanases (0,01 U/mL), invertases (1,52 U/mL), β -mananase (0,04 U/mL), produzidas durante a FES.

O aumento da concentração desse complexo enzimático favorece a ação sinérgica sobre os polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal, promovendo a desorganização da matriz lignocelulósica e, conseqüentemente, facilitando a liberação do óleo essencial durante a extração (Costa *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2024). Estudos relatam que extratos multienzimáticos apresentam maior eficiência na desestruturação da parede celular quando comparados à aplicação de enzimas isoladas, reforçando o volume do extrato bruto como variável determinante para o processo. No gengibre, o uso de complexos multienzimáticos aumentou o rendimento de óleo essencial em 47,95%, por atuarem em diferentes componentes da parede vegetal: celulose, hemicelulose e pectina (Dos Santos Reis *et al.*, 2020). Já no estudo com o óleo essencial de *Artemisia argyi*, o uso de um blend enzimático promoveu um aumento de aproximadamente 79% no rendimento de extração em comparação com enzimas isoladas (Zhang *et al.*, 2020).

Figura 1. Gráfico de Pareto do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert, mostrando a magnitude e a significância dos efeitos do volume de extrato (A), pH (B), seus termos quadráticos e de interação sobre a resposta. A linha vertical indica $p = 0,05$.

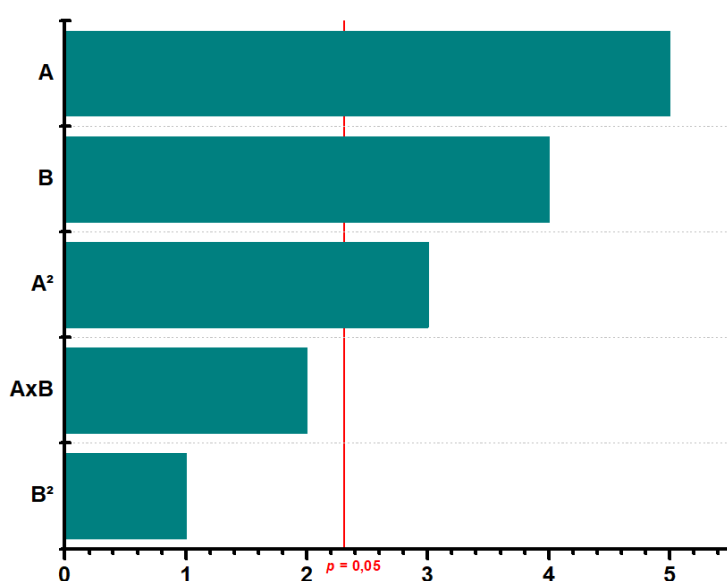
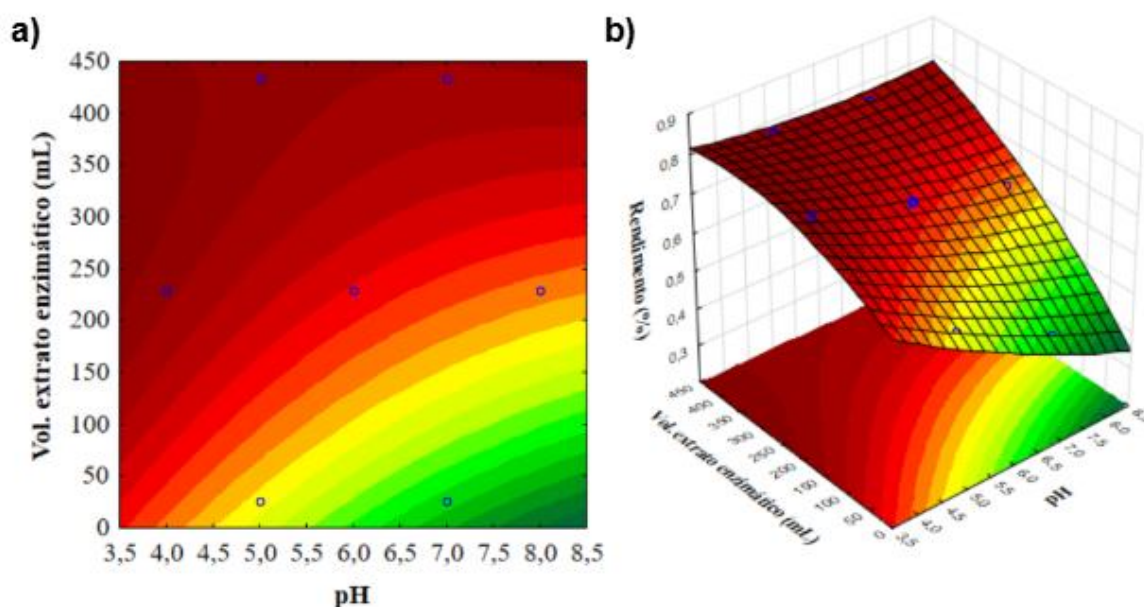


Figura 2. (a) Gráfico de contorno e (b) superfície de resposta tridimensional do modelo quadrático obtido pelo delineamento Doehlert, mostrando o efeito combinado do pH e do volume de extrato enzimático sobre o rendimento de óleo essencial de *Pimenta dioica* L.



De acordo com o modelo matemático, o rendimento no ponto ótimo predito foi de $0,75\% \pm 0,07$, alcançado nas condições de pH 6 e 433,5 mL de volume de extrato enzimático bruto a 50°C , conforme apresentado na Figura 2. Em comparação, o grupo controle apresentou rendimento de $0,5\% \pm 0,03$, que resultou em um aumento de 50% na condição otimizada. Os gráficos de contorno e a superfície de resposta tridimensional confirmam a presença de um ponto ótimo em regiões de pH levemente ácido, associado ao maior volume de extrato enzimático. Esse comportamento indica que o pH levemente ácido favorece a atividade catalítica do extrato bruto enzimático, contribuindo para o aumento do rendimento do processo (Silva *et al.*, 2025).

Em conjunto com o pré-tratamento enzimático, a hidrodestilação assistida por micro-ondas contribui para a eficiência do processo de extração. As micro-ondas convertem a energia eletromagnética em energia térmica por meio da interação com moléculas polares, promovendo atrito intermolecular e, consequentemente, um rápido aumento da temperatura e elevação da pressão interna na parede celular de *Pimenta dioica* L., o que leva à ruptura das estruturas celulares e facilita a liberação de compostos bioativos (Hossain *et al.*, 2024; Karbuz & Tugrul, 2021; Song *et al.*, 2022). O estudo de Liu *et al.* (2021) corrobora os resultados obtidos. A combinação de complexos multienzimáticos e extração assistida por micro-ondas resultou em um rendimento de 7.60 ± 0.13 mg/g, valor superior ao registrado tanto ao uso isolado das micro-

ondas (7.25 ± 0.10 mg/g) quanto para a hidrodestilação convencional (7.17 ± 0.16 mg/g), reforçando o efeito sinérgico entre a ação multienzimática e do aquecimento por micro-ondas (Liu *et al.*, 2021).

Sendo assim, os resultados (Tabela 1) indicam que o pré-tratamento enzimático foi fundamental na preparação da matriz vegetal de *Pimenta dioica* L. para a etapa seguinte de hidrodestilação assistida por micro-ondas. A ação multienzimática promoveu a desestruturação parcial da parede celular, reduzindo a resistência física da matriz e aumentando sua permeabilidade, o que potencializou os efeitos das micro-ondas durante a extração (Dos Santos Reis *et al.*, 2020b; Tavares *et al.*, 2024). Dessa forma, a aplicação de micro-ondas sobre uma matriz previamente desestruturada favoreceu a rápida conversão da energia eletromagnética em energia térmica, intensificando o aumento da pressão interna e a ruptura celular, resultando em maior liberação do óleo essencial (Song *et al.*, 2022). Essa sinergia entre pré-tratamento enzimático e aquecimento por micro-ondas evidencia que a integração dessas estratégias constitui uma abordagem eficiente para aumentar o rendimento de óleos essenciais, permitindo a operação sob condições mais brandas e aumentando a reprodutibilidade do processo.

3.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Tabela 3. Composição relativa (%) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados nos óleos essenciais de *Pimenta dioica* L. obtidos sem (OES) e com (OEP) pré-tratamento enzimático.

No.	Composto	tR (min)	IRL ^b _{EX} P	IRL ^c _{LI} T	OES	OEP
1	1-Octen-3-ol	7,618	990,7	986	0,84	-
2	Linalol	11,778	1113	1113	1,51	0,15
3	(Z)-p-Menth-2-en-1-ol	12,627	1136,9	1139	0,05	0,01

4	(-)- Terpinen-4- ol	14,79 1	1191,3	1182	1,72	0,18
5	p-Cimen-8- ol	15,11	1198,6	1199	0,17	0,02
6	Anetol	19,03	1298,7	1301	-	0,01
7	Carvacrol 9	19,64 9	1315,8	1317	0,09	0,01
8	α - Cubebeno 8	21,54 8	1366,1	1356	0,05	-
9	Eugenol 7	21,97 7	1376,8	1376	66,72	96,1
10	Acetato de geranila 1	22,90 1	1399,3	1392	-	0,01
11	Metileugen ol	23,77	1424,1	1428	1,59	0,13
12	Dodecanal 2	23,89 2	1427,5	1420	0,04	-
13	Trans- isoeugenol	25,38	1468	1465	0,06	-

14	σ -Cadineno	27,50 2	1526,2	1524	0,25	0,01
15	β - Calacoreno	28,81 2	1563,6	1564	0,06	0,02
16	(+)- Spatulenol	30,04 8	1597,5	1594	0,07	0,01
17	α -cadinol	32,64 5	1675,6	1673	0,51	0,04

tR (min) = tempo de retenção; IRL^b_{EX} = índice de retenção linear experimental; IRL^c_{LIT} = índice de retenção linear da literatura; OES = sem pré-tratamento enzimático; OEP = com pré-tratamento enzimático; “—” = não detectado.

A análise por GC-MS mostrou que o eugenol foi o composto majoritário em ambos os óleos essenciais, com aumento de sua proporção relativa de 66,72% no OES para 96,1% no OEP, acompanhado da redução relativa dos constituintes minoritários. Esse resultado pode ser associado à maior eficiência do pré-tratamento enzimático na obtenção de um óleo essencial com maior enriquecimento relativo de eugenol, uma vez que, em *Pimenta dioica* L., esse composto é descrito como o principal constituinte do óleo essencial, enquanto compostos como metileugenol, mirceno, linalol, 1,8-cineol e outros terpenoides ocorrem em menores proporções (Amma *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2023; Tavares *et al.*, 2024).

No estudo de Tavares *et al.* (2024), o pré-tratamento enzimático aumentou o rendimento do óleo essencial de *P. dioica* L. e a proporção de eugenol de 70,8 para 77,3%, sem descaracterizar o perfil químico, o que foi atribuído à ação conjunta de enzimas como endoglucanase, exoglucanase e invertase sobre os polissacarídeos estruturais da parede celular. Esse efeito favorece a desorganização da matriz vegetal e amplia o acesso das estruturas secretoras ao meio extrator, o que também foi corroborado pelas alterações morfológicas observadas por microscopia eletrônica (Tavares *et al.*, 2024). Entretanto, diferentemente do estudo de Tavares *et al.* (2024), a matéria-prima no presente trabalho foi submetida a uma moagem prévia, etapa que aumenta a superfície de contato e, consequentemente, favorece a

ação catalítica do extrato enzimático bruto sobre a matriz, contribuindo para a recuperação dos compostos voláteis retidos. Além disso, a composição do óleo essencial de *P. dioica* L. pode variar em função da região de cultivo, das condições climáticas, do estado do material vegetal, da secagem e, principalmente, das condições de extração empregadas. Desse modo, o maior enriquecimento relativo de eugenol observado no OEP, em comparação a valores reportados na literatura, reforça o padrão característico da espécie, no qual esse composto se destaca como constituinte majoritário do óleo essencial (Amma *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2023; Jarquin-Enriquez *et al.*, 2021; Stewart; Lowe; Watson, 2016).

Como ambas as amostras foram obtidas por hidrodestilação assistida por micro-ondas, essa etapa deve ser interpretada como uma condição comum do processo, capaz de contribuir para a eficiência global da extração, mas não como a causa direta da diferença composicional entre OES e OEP. Assim, a maior proporção relativa de eugenol observada no OEP sugere principalmente um efeito de enriquecimento relativo desse constituinte durante a extração, sem evidência de sua formação no processo, mantendo-se o perfil geral do óleo dentro da variabilidade química já descrita para a espécie (Jarquin-Enriquez *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2022; Stewart; Lowe; Watson, 2016). Quando comparado ao estudo de Tavares *et al.* (2024), o uso do pré-tratamento enzimático aliado à hidrodestilação assistida por micro-ondas sugere um enriquecimento relativo mais pronunciado em eugenol do que o observado com o pré-tratamento enzimático seguido de hidrodestilação convencional. Entretanto, é importante considerar que, entre os estudos, existem diferenças adicionais no preparo da matéria-prima e nas condições operacionais, o que não permite atribuir esse efeito exclusivamente ao uso das micro-ondas.

3.3 Ensaios antioxidantes

Tabela 4. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* L. obtidos com (OEP) e sem (OES) pré-tratamento enzimático, determinada pelos ensaios ABTS, DPPH, FRAP e sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Amostras	ABTS	DPPH	FRAP	β -caroteno
	(% inibição)	(IC ₅₀ mg/mL)	(μ M Fe ²⁺ eq.)	(% proteção)
OEP	94,75a $\pm$ 0,19	0,137a $\pm$ 0,003	1009,2b $\pm$ 10,5	72,02a $\pm$ 0,83

OES	88,79b $\pm$ 0,25	0,132a $\pm$ 0,002	1171,2a $\pm$ 15,69	69,52a $\pm$ 1,42
-----	-------------------	--------------------	---------------------	-------------------

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software SAS.

A capacidade antioxidante dos óleos variou conforme o ensaio empregado, indicando que o pré-tratamento enzimático modulou a resposta antioxidante de forma dependente do método avaliado (Tabela 4). Esse comportamento é esperado em óleos essenciais, cuja atividade antioxidante pode ser influenciada por alterações na composição química, observadas pelas análises do CG-EM, pelas condições de extração e pela sensibilidade de cada ensaio aos diferentes mecanismos de ação dos antioxidantes (Olascuaga-Castillo *et al.*, 2024).

No ensaio de ABTS, o OEP apresentou maior inibição do radical ($94,75 \pm 0,19\%$) em comparação ao OES ($88,79 \pm 0,25\%$), com diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Esse resultado indica maior capacidade de sequestro do radical ABTS•+ após o pré-tratamento e sugere que a hidrólise enzimática da matriz vegetal pode ter contribuído para alterações no perfil químico do óleo, especialmente pelo enriquecimento relativo do eugenol, reconhecido pela sua capacidade antioxidante. Além do efeito do composto majoritário, a resposta observada também pode refletir interações entre os constituintes do óleo, porque a atividade antioxidante de matrizes complexas não depende exclusivamente de um único componente, mas também da contribuição conjunta entre compostos majoritários e minoritários. Esse comportamento é compatível com o potencial antioxidante descrito para espécies da família *Myrtaceae* e para óleos ricos em eugenol (Nenadis; Papapostolou; Tsimidou, 2021; Tavares *et al.*, 2024).

Já no ensaio de DPPH, os valores de IC₅₀ foram muito próximos entre OEP ($0,137 \pm 0,003$ mg/mL) e OES ($0,132 \pm 0,002$ mg/mL), sem diferença significativa ($p > 0,05$), indicando que o pré-tratamento não alterou significativamente a potência antirradicalar nesse sistema. A ausência de diferença, mesmo diante do maior desempenho do OEP no ABTS, reforça que os ensaios não são equivalentes e podem responder de forma distinta à mesma matriz, em função das diferenças entre os radicais, do meio reacional e da cinética de interação com os compostos presentes no óleo (Abu Bakar *et al.*, 2022; Frumuzachi *et al.*, 2025). Em comparação com a literatura, Morsy e Hammad (2018) relataram para o óleo essencial de *P. dioica* L. um IC₅₀ de 0,480 mg/mL, valor superior ao observado no presente estudo, o que corrobora o potencial antioxidante das amostras avaliadas. Segundo esses autores, essa resposta não depende

exclusivamente do constituinte majoritário do óleo, mas também da contribuição conjunta de compostos presentes em menores proporções, o que reforça a natureza multifatorial da atividade antioxidante dessa matriz (Morsy; Hammad, 2018).

Em contraste, no ensaio de FRAP, o OEP apresentou menor resposta ($1009,2 \pm 10,5 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ eq.}$) do que o OES ($1171,2 \pm 15,69 \mu\text{M Fe}^{2+} \text{ eq.}$), com diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. Esse resultado indica que o pré-tratamento, embora tenha favorecido a capacidade de sequestro de radicais no ABTS, reduziu a resposta associada ao poder redutor férrico. Considerando o perfil cromatográfico, essa redução possivelmente está associada à diminuição relativa de vários constituintes minoritários oxigenados, no OEP, como linalol (1,51 para 0,15%), (-)-terpinen-4-ol (1,72 para 0,18%), metileugenol (1,59 para 0,13%), α -cadinol (0,51 para 0,04%) e 1-octen-3-ol (0,84%), além da ausência relativa de alguns compostos detectados no OES, como dodecanal e trans-isoeugenol. Como o ensaio FRAP se baseia em reações de transferência de elétrons, sua resposta é influenciada pela estrutura química dos compostos redutores presentes na matriz; em compostos fenólicos, essa resposta depende do tipo, número e posição de substituintes, especialmente grupos hidroxila e outros grupos oxigenados, que modulam sua facilidade de oxidação (Sacchi *et al.*, 2019). Dessa forma, o enriquecimento relativo em eugenol no OEP não foi suficiente, isoladamente, para maximizar a resposta no FRAP, sugerindo que compostos minoritários reduzidos em termos relativos após o pré-tratamento também possam contribuir para o mecanismo de transferência de elétrons avaliado nesse ensaio e para o poder redutor da matriz (Pires Costa *et al.*, 2025; Tavares *et al.*, 2024).

No sistema β -caroteno/ácido linoleico, o OEP apresentou valor numericamente superior ao OES ($72,02 \pm 0,83\%$ e $69,52 \pm 1,42\%$, respectivamente), porém sem diferença significativa ($p > 0,05$). Esse resultado indica que, nas condições avaliadas, o pré-tratamento enzimático não alterou de forma expressiva a capacidade do óleo essencial em retardar a oxidação em modelo emulsificado. Esse ensaio é relevante para óleos essenciais, pois avalia a proteção frente à oxidação lipídica em um modelo mais próximo de sistemas alimentares. Em matrizes ricas em eugenol, essa atividade tem sido associada à neutralização de radicais gerados durante a oxidação do ácido linoleico, reduzindo o branqueamento do β -caroteno (Shende, 2024). Assim, os resultados obtidos reforçam que ambos os óleos mantiveram considerável potencial antioxidante nesse modelo, ainda que o efeito do pré-tratamento não tenha sido estatisticamente confirmado.

Em conjunto, os resultados demonstram que o pré-tratamento enzimático aumentou significativamente a resposta do OEP no ensaio ABTS, não alterou a atividade avaliada por DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, e reduziu a resposta no FRAP. Dessa forma, o efeito do pré-tratamento sobre o perfil antioxidante do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. depende do mecanismo avaliado em cada ensaio e reforça a necessidade de interpretação integrada dos resultados, sem que um único método seja utilizado isoladamente para representar o perfil de resposta antioxidante da amostra (Frumuzachi *et al.*, 2025; Olascuaga-Castillo *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2025).

4. CONCLUSÃO

O uso do pré-tratamento enzimático associado à hidrodestilação assistida por micro-ondas mostrou-se uma alternativa eficaz para a extração do óleo essencial de *Pimenta dioica* L., aumentando o rendimento e o enriquecimento relativo em eugenol. Além disso, a otimização das condições operacionais por meio do delineamento de Doehlert permitiu identificar os parâmetros que potencializam o processo, evidenciando a eficiência da abordagem integrada. Embora o efeito sobre a atividade antioxidante tenha sido dependente do ensaio utilizado, o óleo obtido manteve elevado potencial antioxidante. Sendo assim, os achados reforçam o potencial do uso de extrato enzimático bruto produzido por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus niger* e, como substrato, a casca da amêndoa do cacau, como alternativa para o aumento do processo extrativo. Adicionalmente, estudos complementares devem ser realizados para avaliar a aplicação do processo em maior escala e compreender seus efeitos sobre a estabilidade e as propriedades do óleo essencial.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PPG-ECAL/UESB) pelo apoio acadêmico, e ao Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela infraestrutura e suporte técnico para o desenvolvimento deste trabalho.

6. FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

7. REFERÊNCIAS

- ABU BAKAR, Izza Nadira *et al.* Characterization of asiaticoside concentration, total phenolic compounds, and antioxidant activity of different varieties of *Centella asiatica* (L.) and essential oil extraction using hydro-distillation with enzyme assisted. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 44, p. 102474, set. 2022.
- AMMA, K. P. Padmakumari *et al.* Comparative chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of essential oil isolated from the leaves of *Cinnamomum tamala* and *Pimenta dioica*. *Natural Product Research*, v. 27, n. 3, p. 290–294, 1 fev. 2013.
- ANDRADE, Bruna Fernandes *et al.* Allspice (*Pimenta Dioica* Lindl) leaves essential oil as a potential antioxidant and antimicrobial source for use in mechanically deboned poultry meat. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 26, p. e2022125, 2023.
- ARAUJO, André R. T. S. *et al.* Solvent-Free Microwave Extraction of *Thymus mastichina* Essential Oil: Influence on Their Chemical Composition and on the Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 8, p. 709, 22 jul. 2021.
- CARDADOR-MARTÍNEZ, Anaberta *et al.* Relationship Among Antimutagenic, Antioxidant and Enzymatic Activities of Methanolic Extract from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 61, n. 4, p. 161–168, dez. 2006.
- COSTA, Matheus Andrade Rocha *et al.* Application crude multienzyme extract from *Aspergillus niger* as a pretreatment for the extraction of essential oil from *Croton argyrophyllus* leaves. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 69, n. 5, p. 1843–1856, out. 2022.
- DA SILVA NUNES, Nájila *et al.* Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. *BioEnergy Research*, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, dez. 2020.
- DOS SANTOS REIS, Nadabe *et al.* Enzyme extraction by lab-scale hydrodistillation of ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe): Chromatographic and micromorphological analyses. *Industrial Crops and Products*, v. 146, p. 112210, abr. 2020.
- FASIKU, Samuel Adedayo; BELLO, Mobolaji Akeem; ODENIYI, Olubusola Ayoola. Production of xylanase by *Aspergillus niger* GIO and *Bacillus megaterium* through solid-state fermentation. *Access Microbiology*, v. 5, n. 6, 1 jun. 2023.
- FRUMUZACHI, Oleg *et al.* Enhancing the phenolic profile and antioxidant activity in corn silk via solid-state fermentation with *Aspergillus niger*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 105, p. 104239, out. 2025.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 3597–3604, 1 ago. 2000.

HOSSAIN, Md. Murad *et al.* Microwave and ultrasound assisted extraction techniques with citric acid of pectin from Pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Measurement: Food*, v. 13, p. 100135, mar. 2024.

JAMAICA AGRICULTURAL COMMODITIES REGULATORY AUTHORITY (JACRA). About Spices. [S. l.]: JACRA, [s. d.]. Disponível em: <https://jacra.org/divisions/spices/about-spices/>. Acesso em: 19 mar. 2026.

JARQUIN-ENRIQUEZ, Lorenzo *et al.* Pimenta dioica: a review on its composition, phytochemistry, and applications in food technology. *International Food Research Journal*, v. 28, n. 5, p. 893–904, 1 out. 2021.

KAMAL, G. M. *et al.* Yield and chemical composition of citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. v. 18, n. 4, p. 1275–1282, 2011.

KARAHALIL, Ercan *et al.* Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 10, n. 4, p. 1189–1205, dez. 2020.

KARBUZ, Pınar; TUGRUL, Nurcan. Microwave and ultrasound assisted extraction of pectin from various fruits peel. *Journal of Food Science and Technology*, v. 58, n. 2, p. 641–650, fev. 2021.

LIU, Zaizhi *et al.* Efficient extraction of essential oil from *Cinnamomum burmannii* leaves using enzymolysis pretreatment and followed by microwave-assisted method. *LWT*, v. 147, p. 111497, jul. 2021.

LÓPEZ-GÓMEZ, José Pablo; VENUS, Joachim. Potential Role of Sequential Solid-State and Submerged-Liquid Fermentations in a Circular Bioeconomy. *Fermentation*, v. 7, n. 2, p. 76, 11 maio 2021.

MARQUES, Clara Suprani *et al.* Comparative chemical evaluation and antibacterial activity of pimenta dioica essential oil obtained by different extraction methods. *In: Open Science Research III*. 1. ed. [S. l.]: Editora Científica Digital, 2022. p. 242–255.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 45, p. 594-598, 1968.

MÉRIDA-REYES, Max Samuel *et al.* Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Pimenta dioica* (L.) Merr. from Guatemala. *Medicines*, v. 7, n. 10, p. 59, 23 set. 2020.

MOHIDEEN, Mazlin *et al.* a review on extraction methods of essential oil from kaffir lime (*Citrus hystrix*) leaves. *Journal of Academia*, p. 173–184, 2021.

MOHIDEEN, Mazlin *et al.* Antibacterial Properties of Essential Oil Extracted from Kaffir Lime (*Citrus Hystrix*) Peel. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 15, n. 1, p. 179–186, 31 mar. 2022.

MONTALVO LOPEZ, Isis; MOLINA TORRES, Jorge; MONTALVO HERNÁNDEZ, Domingo. Diversity of Volatile Organic Compounds in leaves of *Pimenta dioica* L. Merrill at

Different Developmental Stages from Fruiting and no-fruited Trees. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 65, n. 3, 1 jul. 2021.

MORSY, Nashwa F. S.; HAMMAD, Karima S. M. Volatile Constituents, Radical Scavenging and Cytotoxic Activities of Mexican allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill) Berries Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 21, n. 4, p. 859–868, 4 jul. 2018.

NENADIS, Nikolaos; PAPAPOSTOULOU, Maria; TSIMIDOU, Maria Z. Suggestions on the Contribution of Methyl Eugenol and Eugenol to Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.) Essential Oil Preservative Activity through Radical Scavenging. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2342, 17 abr. 2021.

OHARA, André *et al.* Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 645–652, out. 2015.

OLASCUAGA-CASTILLO, Karyn Alicia *et al.* Extraction of essential oils by hydrodistillation of four aromatic species: Conditioning, extraction conditions, yield and chemical composition. *Scientia Agropecuaria*, v. 15, n. 3, p. 385–408, 18 jun. 2024.

OLIVEIRA, P. C. *et al.* Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 18, n. 3, p. 777–787, 1 set. 2018.

PACHECO-HERNÁNDEZ, Yesenia *et al.* Chemical Variation and Biological Properties of the Essential Oil and Main Volatiles of *Pimenta dioica* Harvested in the Northern Highlands of Puebla, Mexico. *Chemistry & Biodiversity*, v. 22, n. 4, p. e202402843, abr. 2025.

PANDA, Soumya Swarup *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial, anti-tyrosinase and anti-proliferative activities of the leaf essential oil of Allspice (*Pimenta dioica*) grown in the coastal plains of Eastern India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 28, n. 6, p. 1227–1241, 2 nov. 2025.

PIRES COSTA, Eduarda *et al.* Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Eugenol, Biseugenol, and Clove Essential Oil: An In Vitro Study. *ACS Omega*, v. 10, n. 28, p. 31033–31045, 22 jul. 2025.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, 2007. Comunicado Técnico, 128.

SACCHI, Rafaela *et al.* A Procedure for Assessment of the Reducing Capacity of Plants-Derived Beverages Based on the Formation of the FeII/2,2'-Bipyridine Complex. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2019.

SADH, Pardeep Kumar; DUHAN, Surekha; DUHAN, Joginder Singh. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, n. 1, dez. 2018.

SHENDE, Sneha. Evaluation of antioxidant potential of clove extracts: antioxidant potential of clove. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, p. 113–120, 12 set. 2024.

SILVA, Fabiane N. *et al.* Sustainable Sugar Syrup Production from Rice Husk Using *Aspergillus niger* Carbohydrase. ACS Omega, v. 10, n. 29, p. 32161–32173, 29 jul. 2025.

SONG, Zhanlong *et al.* Study on the microwave extraction process and product distribution of essential oils from citrus peel. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, v. 171, p. 108726, jan. 2022.

STEWART, Toni-Moy A.; LOWE, Henry IC; WATSON, Charah T. Quantification and characterization of *Pimenta dioica* (Allspice) essential oil extracted via hydrodistillation, solvent and super critical fluid extraction methodologies. 2016.

TAVARES, Iasnaia Maria De Carvalho *et al.* Improving the extraction yield of essential oil from *Pimenta dioica* (L.) Merr. using *Aspergillus niger* ATCC 1004 enzyme blend. Biotechnology and Applied Biochemistry, p. bab.2658, 20 ago. 2024.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

URREA-VICTORIA, Vanessa *et al.* Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. 2016.

WU, Longkun *et al.* Effects of microwave-assisted enzymatic treatment on the quality characteristics of sunflower seed oil: A comprehensive investigation based on Lipidomics and volatile flavor compound profiling. Food Chemistry, v. 491, p. 145217, nov. 2025.

YU, Fen *et al.* Effects of ultrasound and microwave pretreatments on hydrodistillation extraction of essential oils from Kumquat peel. Food Science & Nutrition, v. 9, n. 5, p. 2372–2380, maio 2021.

ZHANG, Qiang *et al.* Aqueous enzyme-ultrasonic pretreatment for efficient isolation of essential oil from *Artemisia argyi* and investigation on its chemical composition and biological activity. Industrial Crops and Products, v. 158, p. 113031, dez. 2020.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do estudo permitiu compreender os desafios envolvidos na extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L., especialmente quanto ao rendimento, à eficiência operacional e à preservação dos compostos obtidos. A espécie estudada é reconhecida por seu perfil químico e pelas propriedades bioativas associadas ao seu óleo essencial, com potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Nesse sentido, as limitações dos métodos clássicos, como longo tempo de processamento, possibilidade de perda de compostos, baixo rendimento, alto custo e dificuldade operacional, demonstram a necessidade de alternativas mais eficientes e viáveis para sua obtenção.

A hidrodestilação assistida por micro-ondas mostrou-se adequada para intensificar a extração e aumentar o rendimento. A ação das micro-ondas promove a agitação das moléculas polares presentes no material vegetal, gerando atrito intermolecular, aumento de temperatura e elevação da pressão no interior das células. Esses efeitos contribuem para a ruptura celular e facilitam a liberação dos compostos voláteis. De forma complementar, o pré-tratamento enzimático também contribuiu para o desempenho do processo, uma vez que as enzimas presentes no extrato enzimático bruto podem atuar sobre componentes estruturais da parede celular, favorecendo a desorganização da estrutura vegetal. A obtenção desse extrato por fermentação em estado sólido, utilizando casca da amêndoa de cacau como substrato e *Aspergillus niger* 1004 como microrganismo secretor, reforçou a proposta biotecnológica do estudo, ao associar o aproveitamento de um subproduto agroindustrial à aplicação de enzimas em uma tecnologia de extração assistida por micro-ondas.

Nas condições avaliadas, o pré-tratamento enzimático influenciou positivamente o rendimento do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. A condição otimizada, definida em pH 6 e volume de extrato enzimático de 433,5 mL, resultou em rendimento de $0,75 \pm 0,07\%$, enquanto a extração sem pré-tratamento apresentou $0,50 \pm 0,03\%$. Esse aumento indica que a associação entre o extrato enzimático bruto e a hidrodestilação assistida por micro-ondas favoreceu a obtenção do óleo, possivelmente pela maior desorganização da estrutura vegetal e consequente facilidade de liberação dos compostos voláteis.

A avaliação da composição química permitiu caracterizar o óleo essencial e relacionar os resultados ao perfil esperado para a espécie. Quanto à atividade antioxidante, observou-se que o efeito do pré-tratamento variou conforme o método utilizado. No ensaio ABTS, o óleo obtido com pré-tratamento apresentou maior capacidade de sequestro do radical quando comparado ao óleo sem pré-tratamento. Por outro lado, no ensaio FRAP, a amostra sem pré-tratamento apresentou maior poder redutor. Já nos ensaios DPPH e β -caroteno/ácido linoleico,

não foram observadas diferenças significativas entre os óleos. Esses resultados demonstram que a atividade antioxidante deve ser interpretada de forma integrada, uma vez que cada ensaio avalia mecanismos distintos de ação.

De modo geral, os resultados indicam que a extração do óleo essencial de *Pimenta dioica* L. foi favorecida pela combinação entre a transferência de energia promovida pelas micro-ondas e a modificação da estrutura vegetal proporcionada pelo pré-tratamento enzimático. A atuação conjunta dessas abordagens demonstrou ser tecnicamente adequada para melhorar o rendimento e reforça a importância da integração entre tecnologias de extração e ferramentas biotecnológicas.

Sendo assim, o uso de micro-ondas associado ao pré-tratamento enzimático, com extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido, constitui uma alternativa promissora para a extração de óleo essencial de *Pimenta dioica* L. A proposta desenvolvida nesta dissertação contribui para o avanço de processos mais eficientes e para a valorização de resíduos agroindustriais, demonstrando o potencial dessa associação na obtenção de produtos naturais de interesse industrial.