

APLICAÇÃO DE ENZIMA COMERCIAL CELULASE NA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM

Patrick R. Nascimento¹; Rafael M. Pires²; Alexandre H. G. Souza³; Mauricio F. Rosa^{3,4}; Viviane S. Lobo^{1,2,3}

1. *Tecnologia em Processos Químicos, UTFPR Toledo;*

2. *Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UTFPR Toledo;*

3. *Pós-Graduação Stricto sensu Mestrado em Biociências, UTFPR Toledo;*

4. *Química, Unioeste Toledo.*

Palavras-Chave: rendimento, composição química, metabólito secundário.

Introdução

A progressão global da tecnologia está cada vez mais seguindo em direção aos procedimentos biotecnológicos, os quais envolvem a utilização de enzimas para substituir os processos químicos tradicionais. Esse movimento se deve à tendência inegável da prevalência das políticas ambientais (COELHO, 2001). A utilização de ingredientes provenientes de fontes naturais tem ganhado um grande destaque em escala global, resultando em uma ampla aplicação em indústrias de diferentes ramos: bebidas; alimentos; higiene e limpeza; medicamentos; cosméticos, entre outras. (MIRANDA, 2016).

Os óleos essenciais, produtos naturais extraídos de plantas, têm sido muito desejado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de ciências sanitárias, em substituição aos produtos sintéticos, que têm impactos negativos à saúde humana e ao meio ambiente. Os óleos essenciais são compostos secundários produzidos pelas plantas, cuja composição e quantidade variam de acordo com vários fatores externos. Embora existam diferentes métodos padrões de extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação e o arraste a vapor, esses podem apresentar desvantagens, como baixo rendimento, longa duração e alto consumo energético.

O uso de enzimas, como pré-tratamento na extração de óleos essenciais, tem despertado interesse devido à possibilidade de aumento do rendimento, sem alteração significativa da composição química do óleo. O processo de rompimento das paredes celulares vegetais antes da extração do óleo pode facilitar a saída do produto final. Isso tem atraído olhares de pesquisadores a fim de obter maior rendimento de extração, contribuindo para aumento do valor agregado do produto. (GOMES, 2002). Entretanto, o uso das enzimas requer um estudo da parede celular de cada espécie de planta que vai ser utilizada, na medida em que é constituída de distintos polissacarídeos, assim a solução de enzimas deve conter especificamente a função desejada. (COSGROVE, 2012; FREITAS, 1996).

A utilização de enzimas na extração de óleos vegetais, visando o aumento do rendimento de produção, tem apresentado resultados promissores quando combinada com métodos mecânicos convencionais (GOMES, 2002). A quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular das plantas é um processo complexo que requer a atuação sinérgica de diversas enzimas do complexo celulolítico (ARO, 2005). Após a quebra da parede celular com a ajuda de enzimas específicas, a extração de óleos vegetais é facilitada, resultando em um aumento na eficiência e na velocidade do processo. Além disso, isso permite a utilização de métodos de extração mais econômicos e menos prejudiciais ao meio ambiente (SKRUBIS, 1982).

O presente estudo teve como objetivo analisar o potencial da enzima comercial degradadora da celulose presente na parede das folhas na variação do rendimento e da composição do óleo essencial de alecrim (CHEUNG; TAI, 2007). Foram avaliadas as condições de aplicação (tempo, temperatura e porcentagem em massa da enzima), comparando o rendimento entre a extração convencional e a extração com o uso de enzima celulolítica, utilizando hidrodestilação com um aparelho de Clevenger. Também foram avaliadas as mesmas condições de extração, comparando com a composição química dos óleos essenciais obtidos.

Material e Métodos

As amostras da planta utilizadas foram folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), colhidas na região de Toledo-PR (24,73716 S, 53,75614 O), sempre no período da manhã nos meses de fevereiro até o final de abril. As amostras foram coletadas a partir de plantas saudáveis e bem desenvolvidas, e foram escolhidas as folhas mais verdes e frescas. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos a vácuo e mantidas em temperatura a 3°C até o momento da extração.

Antes de começar cada extração, foi realizado o monitoramento da umidade da planta por meio de uma amostra de 1,0 g de folha de alecrim. Essa amostra foi analisada utilizando uma balança que determina a umidade através do infravermelho (BEL Engineering - I-thermo 62I). Esse processo tem como objetivo garantir o controle da umidade da planta durante as extrações, uma vez que o teor de umidade influencia diretamente no rendimento do óleo essencial obtido (DE MORAIS, 2009).

As extrações do óleo essencial foram realizadas por meio da hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger. As amostras de alecrim foram submetidas a dois tipos de extração.

- No primeiro tipo, as folhas in natura foram submetidas diretamente ao processo de hidrodestilação, aparelho de Clevenger, sem qualquer tratamento prévio. Esse método foi utilizado como controle para comparar os resultados obtidos pela extração com o uso de enzimas. Cada extração utilizou 100,0 g de alecrim, com duração de três horas (SANTOS, 2008). A amostra era colocada em um balão de fundo redondo com capacidade de 2,0 L, em seguida é adicionado 1,0 L de água destilada com os 100 g de alecrim e aquecida por uma manta de aquecimento (Heating Mantle) a uma temperatura constante. Após o tempo de extração, o OE era separado da água e purificado.
- No segundo tipo de extração, foi utilizada enzima comercial celulase (Sigma Aldrich) no pré-tratamento. Nessa etapa foram realizadas várias condições a fim de avaliar o melhor tempo de contato no pré-tratamento enzimático (30, 60 e 90 min), a melhor temperatura de extração (40, 50 e 60 °C) e melhor concentração de extrato enzimático (0,05, 0,1, 0,01 e 0,001 % em massa). Primeiro, se pesou 100 g de alecrim, adicionado a um becker com capacidade de 2,0 L contendo 1,0 L de água destilada, no qual era adicionada a quantidade de enzima, matendo à temperatura desejada pelo tempo definido. Após o pré-tratamento, se realizou a extração em cada condição, por três horas.

A quantificação do rendimento do óleo essencial extraído foi obtida pela divisão do volume de óleo essencial extraído pela quantidade de massa da planta utilizada na extração.

A análise da composição química do OE de alecrim, obtido pelos diferentes métodos, foi realizada utilizando a técnica Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC/FID) (Perkin Elmer - Clarus 680). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) na UTFPR campus Toledo, conforme a metodologia de Bizzo *et al.* (2020).

Resultados e Discussão

Inicialmente as plantas foram coletadas no período da manhã, levadas ao laboratório para serem separadas, lavadas e armazenadas a 3 °C. As amostras foram separadas em sacos a vácuo com 100,0 g, e eram retiradas da refrigeração no momento a serem utilizadas para o procedimento de extração do óleo essencial.

Antes de todos os processos de extração de OE, era determinada a umidade da amostra, a fim de verificar a quantidade de água presente. A cada processo a umidade era medida em triplicata, mantendo-se em umidade próxima a 60 %.

Para os processos, nos quais foram utilizados a planta *in natura*, diretamente ao aquecimento para a extração, a umidade manteve-se próxima a $61 \pm 0,0258$ % e o rendimento de OEA obtido foi aproximadamente 0,52 %. Pode-se observar que os maiores rendimentos obtidos dos óleos foram obtidos quando a planta *in natura* apresentava uma menor umidade.

Em seguida, foram realizadas as extrações do OE de alecrim adicionando enzimas celulase em um pré-tratamento. Os parâmetros investigados compreenderam o período de interação entre a enzima e a planta *in natura*, a temperatura associada a esse período e a concentração da enzima, antes da extração do óleo essencial. Após o pré-tratamento, as extrações ocorreram de forma semelhante com uma duração fixa de 3 horas.

A Tabela 1 apresenta os resultados de rendimento obtidos da extração de OEA após o pré-tratamento com a enzima celulase. Pode-se observar os resultados obtidos com as variações das condições do pré-tratamento. O processo foi separado em 3 grupos: o primeiro (amostras 1c, 2c e 3c), onde variou-se apenas o tempo de contato da enzima com a planta; a partir do melhor resultado do 1º grupo, foram realizadas as extrações do grupo 2 (amostras 4c, 5c e 6c), variando-se apenas a temperatura; por fim, utilizando os melhores resultados dos dois primeiros grupos, realizou-se novas extrações variando apenas a concentração de enzima a ser utilizada (amostras 7c, 8c e 9c).

Tabela 1: Rendimento de óleo essencial de alecrim utilizando enzima celulase.

Experimento	Peso das amostras (g)	Média da umidade (%)	t (min)	T (°C)	Concentração da enzima (% em massa)	Volume OEA (mL)	Rendimento (%)
Amostra 1c	100,026	60,61	30	40	0,05%	0,578	0,578
Amostra 2c	100,033	59,85	60	40	0,05%	0,591	0,591
Amostra 3c	100,021	60,57	90	40	0,05%	0,567	0,567



Amostra 4c	100,190	60,37	60	30	0,05%	0,558	0,557
Amostra 5c	100,042	59,26	60	50	0,05%	0,577	0,577
Amostra 6c	100,060	60,29	60	60	0,05%	0,564	0,564
Amostra 7c	100,026	58,22	60	40	0,01%	0,600	0,600
Amostra 8c	100,035	60,07	60	40	0,001%	0,594	0,594
Amostra 9c	100,058	60,19	60	40	0,1%	0,577	0,577

A partir da Tabela 1, pode-se notar que para o menor percentual de umidade, mesmo com mínimo de diferença, obteve-se o maior rendimento de OEA, indiferentemente qual condição estava em variação. De todos os parâmetros avaliados, o tempo de 60 minutos, a temperatura de contato de 40°C e a concentração enzimática de 0,01% (amostras 7c) revelaram ser a melhor opção para o aumento do rendimento de extração de óleo essencial de alecrim.

Ao comparar o rendimento da extração sem utilização de enzima com o rendimento obtido com a utilização da enzima celulase e melhores condições, observa-se um aumento de 9,5 % de OE extraído. Aparentemente pode se considerar um valor baixo, mas industrialmente isso pode indicar um melhor aproveitamento da planta, aumentando o ganho final do processo.

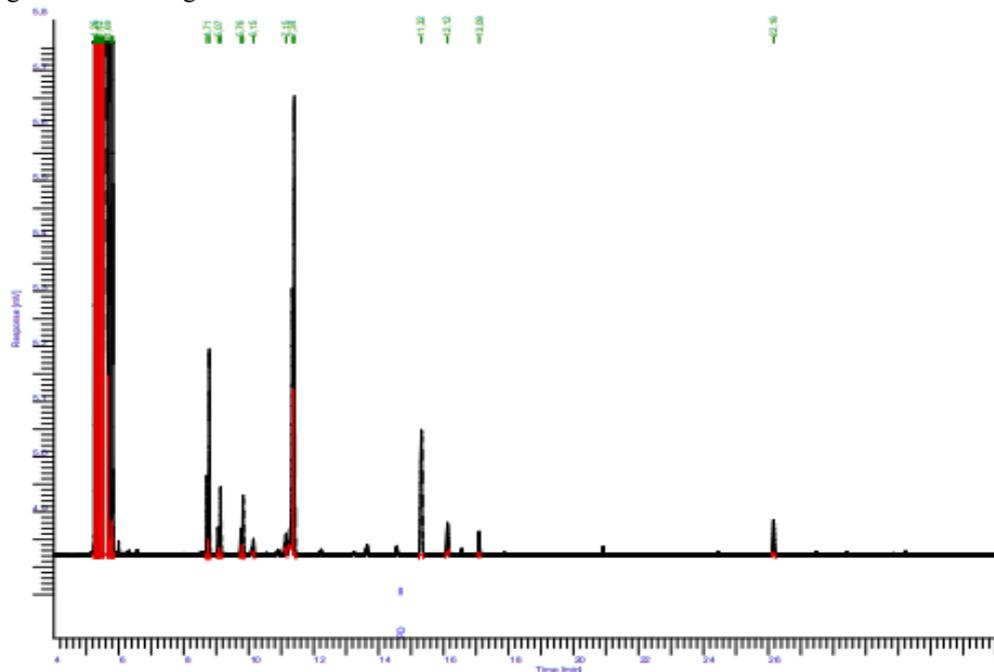
Baby & Ranganathan (2016) utilizaram enzimas comerciais para avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático na extração de óleos essenciais obtidos das sementes de cardamomo. O processo de extração foi realizado por destilação por arraste de vapor durante quatro horas, sendo observado o aumento máximo no teor de óleo de 16%, com um pré-tratamento enzimático de 90 minutos (ALTUN; CETINUS, 2007). Isso indica que os resultados obtidos nesse trabalho estão dentro do esperado e encontrado na literatura para outras plantas.

Reis (2015) otimizou o pré-tratamento com a ajuda de uma matriz de Doehlert que aprimorou as variáveis: volume de extrato, a temperatura e o tempo de contato, as quais aumentaram o rendimento de óleo extraído em qualquer condição aplicável utilizando a matriz. O mesmo utilizou um extrato enzimático não purificado, proveniente da fermentação em estado sólido da palma forrageira através da ação do *Aspergillus niger*, em um processo de pré-tratamento nas folhas da *Mentha arvensis*, resultando em um aumento significativo de 194% na massa do óleo extraído.

Após as obtenções do rendimento para cada condição estipulada, realizou-se a análise de composição química de todos os OE obtidos por cromatografia em fase gasosa (CG/FID). Essa busca foi realizada a fim de verificar se a aplicação do pré-tratamento interferiu de alguma forma na composição do OE, quando comparado com o cromatograma da amostra *in natura*. A diferença está considerando apenas a presença ou não do pico nos espectros, pois não é possível realizar a quantificação de cada substância por falta da análise de massas.

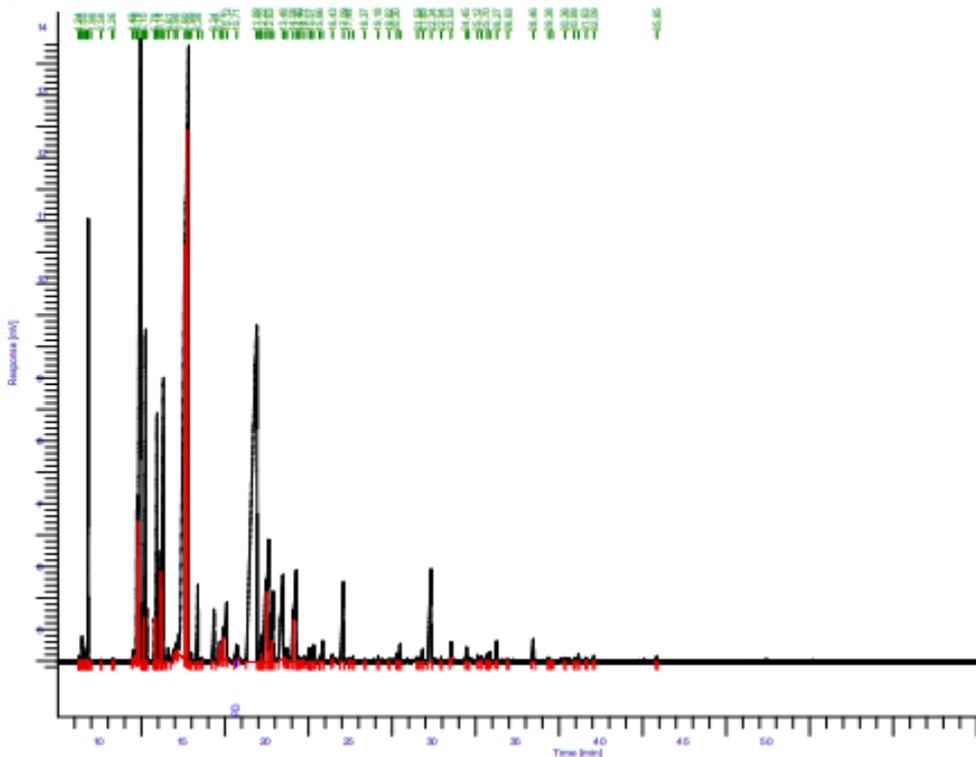
As Figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas das amostras de OE consideradas como melhores condições: amostra 3 *in natura* (FIGURA 1) e amostra 7c, utilizando enzima celulase (FIGURA 2).

Figura 1: Cromatograma amostra de alecrim *in natura*.



Fonte: autoria própria, 2024.

Figura 2: Cromatograma da amostra 7c, alecrim pré-tratado com a enzima celulase.



Fonte: autoria própria, 2024.

Comparando os cromatogramas das 2 amostras (FIGURAS 1 e 2), observa-se claramente que o OE obtido fazendo o pré-tratamento com a enzima celulase apresenta mais substâncias, devido ao maior número de sinais, principalmente em baixo tempo de retenção, além de apresentarem maior área.

Para o OE obtido do alecrim utilizando celulase, em sua composição química pode ser observado a presença de, no mínimo, 83 substâncias com diferentes tempos de retenção até 35,854 min. E, quando é avaliado o cromatograma do OE de alecrim *in natura*, observa-se apenas 12 substâncias diferentes, com tempo de retenção entre 4,712 e 22,162 min.

Esses resultados vêm indicando que o pré-tratamento com a enzima celulase, não só aumenta o rendimento, como também contribui para a extração de diferentes substâncias com baixo tempo de retenção, até 21,846 min, e, também, outras substâncias com tempo de retenção maior. As outras amostras tiveram substâncias identificadas até, aproximadamente, 22 min.

Os sinais presente até, aproximadamente, 1,9 min são referentes ao solvente hexano PA utilizado, mostrando que o mesmo é formado pelos seus isômeros. O sinal em, aproximadamente, 21,6 min é referente ao padrão interno utilizado, octanoato de metila. Ambos sinais foram confirmados pelos resultados das suas análises por cromatografia em fase gasosa, sob a mesma condição de análise (ADAMS, 2015).

Se for comparado os resultados para os OEA obtidos em cada condição com padrões analíticos, é possível indicar a presença dos principais constituintes do OE de alecrim, conforme descrito por Atti-Santos e colaboradores (2004), por aproximação do tempo de retenção. Foram realizadas as análises de cromatografia em fase gasosa para alguns padrões, esses em solução de 2% em hexano, e comparando por aproximação do tempo de retenção (aproximadamente, 4,958 min), pode-se indicar que o OAE obtido com tratamento da celulase apresenta uma grande porcentagem da sua composição de α -pineno em maior quantidade presente nesse OEA. De acordo com a literatura, os constituintes majoritários no OEA *in natura* foram o eucaliptol, cânfora e α -pineno (ROMEIO, 2008).

A utilização de enzimas, na extração de óleos essenciais do alecrim, apresentou potencial para aumentar o rendimento em 9,5 %, sem alteração significativa da composição química. Pelos resultados da cromatografia em estado gasoso realizada, foi possível observar o aumento da concentração de algumas substâncias presentes na composição, quando utilizada a enzima comercial celulase.

Conclusões

A partir dos resultados da pesquisa, pode-se concluir que a aplicação da enzima comercial celulase na extração de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foi eficaz, otimizando o tempo e aumentando o rendimento final. A utilização de celulase facilitou a degradação das paredes celulares das plantas, permitindo um acesso mais eficiente ao óleo essencial. A análise por cromatografia gasosa identificou os principais componentes do óleo, como 1,8-cineol, α -pineno e canfeno, confirmando a qualidade preservada do óleo extraído por enzimas.

A utilização de enzima é ambientalmente amigável, reduzindo a necessidade de solventes químicos agressivos e podendo ser conduzida em condições mais brandas de temperatura e pressão. Isso é particularmente relevante para a indústria de produtos naturais e cosméticos.

O estudo sugere futuras pesquisas para otimizar as condições de aplicação das enzimas, como concentração, tempo e temperatura, visando maximizar o rendimento e a qualidade do óleo essencial. A continuidade desse trabalho pode contribuir para o desenvolvimento de métodos de extração mais eficientes e sustentáveis, consolidando a aplicação da biotecnologia no campo da química de produtos naturais. Os resultados obtidos podem ser aplicados em níveis industriais para aumentar a eficiência e sustentabilidade na produção de óleos essenciais.

Agradecimentos

Agradecimento à UTFPR, ao Biopark e à Fundação Araucária.

Referências

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Pub. Co., USA., 469, 1995.
- ALTUN, G.D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, 100(3), 964-971, 2007.
- ARO, N., PAKULA, T., PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 719– 739, 2005.
- ATTI-SANTOS, A.C. et al. Estudo da qualidade de amostras comercializadas de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revs. Bras. Pl. Med.**, 6(2), 44-47, 2004.
- BABY, K. C.; RANGANATHAN, T. V. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton.*) volatile oil. **Industrial Crops and Products**, 89, 200-206, 2016.
- Bizzo, H. R., Ana Maria, C. H., & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, 32(3), 588–594. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>
- CHEUNG, S.; TAI, J. **Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis***. **Oncology Reports**, 17(6), 1525–1531, 2007.
- COSGROVE, D. C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in Plant Science**, 3, 204.
- DE MORAIS, L. A. S. (2009). **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299- S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/577686>. Acesso em: 19/04/2023..
- FREITAS, S., HARTMAN, L., COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, (32), 29- 32, 1996.
- GOMES, C. Embrapa. **Extração aquosa enzimática de óleo de soja**. Disponível: www.cnpsa.embrapa.br/imprcon.htm em: Acesso em: 23/03/2023.
- MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. **Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas**. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. Revista Ciência Agrônoma, 47(1), 213-220, 2016.
- REIS, N. S.; BRITO, A. R.; COSTA, L. C. B.; SILVA, T. P.; SILVA, E. G. P.; FRANCO, M. Aplicação de extrato multienzimático de *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais de *Mentha arvensis* por hidrodestilação. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, mar. 2015. **Revista de Microbiologia**, 27, 7-9, 1996.
- SKRUBIS, B. G. The drying of laurel leaves. **Perfumer & Flavorist**, 7(5), 37-40, 1982.
- ROMEO, F. V.; LUCA, S.; PISCOPO, A.; POIANA, P. Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, 20, 373-379, 2008.