



Aplicação de enzimas degradadoras da parede celular vegetal na extração de óleo essencial de alecrim

Application of plant cell wall degrading enzymes in the extraction of rosemary essential oil

Patrick Rosa do Nascimento¹
Viviane da Silva Lobo²

RESUMO

O avanço tecnológico mundial está estimulando a utilização de enzimas em práticas biotecnológicas. A extração de óleos essenciais tem raízes antigas, atravessando diversas culturas. A planta do Mediterrâneo, o alecrim, conhecida por suas aplicações culinárias, de proteção e medicinais, é destacada. O uso de enzimas como etapa preliminar na extração de óleos essenciais desperta interesse na indústria biotecnológica, pois desempenham uma função importante em várias indústrias e práticas, desde a aromaterapia, medicina alternativa, indústria de cosméticos, alimentícia, farmacêutica, entre outras. A utilização de enzimas tem como objetivo aumentar o rendimento, reduzir o tempo de extração, controlar as condições de extração, etc. Este estudo avalia enzimas celulolíticas comerciais no rendimento do óleo essencial de alecrim, investigando condições de aplicação em comparação com a extração tradicional. Foram feitas extrações convencionais e com pré-tratamento enzimático utilizando celulase e hemicelulase comerciais, ao qual a enzima celulase mostrou melhor desempenho em relação a hemicelulase e ao método tradicional de extração. Parâmetros como tempo de contato, pré-tratamento, tempo de extração e concentração do extrato serão avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: alecrim; celulase; enzimas; hemicelulase; óleos essenciais.

ABSTRACT

Global technological advances are stimulating the use of enzymes in biotechnological practices. The extraction of essential oils has ancient roots, crossing different cultures. The Mediterranean plant, rosemary, known for its culinary, protective and medicinal applications, is highlighted. The use of enzymes as a preliminary step in the extraction of essential oils arouses interest in the biotechnology industry, as they play an important role in several industries and practices, from aromatherapy, alternative medicine, cosmetics, food and pharmaceutical industries, among others. The use of enzymes aims to increase yield, reduce extraction time, control extraction conditions, etc. This study evaluates commercial cellulolytic enzymes on the yield of rosemary essential oil, investigating application conditions in comparison with traditional extraction. Conventional extractions and enzymatic pretreatment were carried out using commercial cellulase and hemicellulase, in which the cellulase enzyme showed better performance in relation to hemicellulase and the traditional extraction method. Parameters such as contact time, pre-treatment, extraction time and extract concentration will be evaluated.

KEYWORDS: rosemary; cellulase; Enzymes; hemicellulase; essential oils.

INTRODUÇÃO

Nos países desenvolvidos, apesar do uso de medicamentos sintéticos continuar sendo comum, tem havido um aumento na procura por fitoterápicos pelos consumidores nas últimas décadas. Além disso, a pesquisa nessa área tem despertado um renovado

¹Patrick Rosa do Nascimento.Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo,Paraná,Brasil.E-mail:patrickrosa@alunos.utfpr.edu.br.IDLattes: **5373475874081994**

²Viviane da Silva Lobo.Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo,Paraná,Brasil.E-mail:loboviviane@gmail.com. IDLattes: **3219620885362801**



interesse, impulsionado pelas inovações em equipamentos e técnicas que permitem obter mais informações sobre esses produtos naturais (CUNHA, 2012).

O alecrim (*Rosmarinus Officinale*) é uma planta mediterrânea adaptada a condições secas e frias, com folhas lineares, usado na culinária para dar sabor a pratos e como planta medicinal contra fungos e insetos. (MELO, 2011).

Existem métodos eficazes na extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação e o arraste a vapor. No entanto, esses métodos têm desafios, como baixa eficiência e perda de compostos devido à longa duração, levando a custos elevados de energia e produtos finais mais caros. 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) 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). Por exemplo, a extração enzimática de óleos vegetais evita a necessidade de solventes, resultando em uma redução do consumo de energia e, por consequência, diminuindo o custo do processo de extração (BARRIOS, 1990). 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).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram usadas amostras de folhas de alecrim colhidas em Toledo - PR, localizado nas seguintes coordenadas: -24.737234, -53.757784. Foram colhidas plantas saudáveis e desenvolvidas, preferindo-se as folhas mais verdes e frescas. Essas amostras foram armazenadas em sacos plásticos a vácuo e mantidas em temperatura a 3°C até o momento da extração.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS AMOSTRAS DE ALECRIM

Antes de começar as extrações, foi realizado o monitoramento da umidade da planta por meio de uma amostra de 1g de alecrim. Essa amostra foi analisada utilizando uma balança que determina a umidade através do infravermelho (Marca: BEL Engineering, Modelo: I-thermo 621). A análise de umidade foi realizada em três repetições para garantir a precisão dos resultados. 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).

TESTE PRELIMINAR NA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM

É uma etapa importante para avaliar a eficiência do processo de extração. Nessa etapa, foi realizada a escolha das enzimas adequadas para a quebra da parede celular da matéria-prima vegetal. Para isso, é necessário avaliar o tipo de enzima que será utilizado, sua concentração e temperatura ideais para a ação enzimática. O objetivo é encontrar a



combinação ideal desses fatores para maximizar a liberação do óleo essencial. Após o teste preliminar, é possível avaliar a eficiência da ação enzimática na extração do óleo essencial. Caso seja observado um aumento significativo no rendimento da extração, pode-se prosseguir com a aplicação das enzimas em escala maior. Caso contrário, é necessário ajustar os parâmetros de extração e testar diferentes combinações de enzimas e temperatura até encontrar a melhor condição para o processo.

EXTRAÇÃO DE OEA

As amostras de alecrim foram submetidas a dois tipos de extração. No primeiro tipo, as folhas foram submetidas diretamente ao processo de hidrodestilação, sem qualquer tratamento prévio. Esse método será utilizado como controle para comparar os resultados obtidos pela extração com o uso de enzimas, cada extração contendo 100g de alecrim. Cada extração teve duração de três horas, a extração dos óleos essenciais foi realizada por meio do aparelho de Clevenger, que é um método padrão para a extração de óleos essenciais de plantas (SANTOS, E. 2008). Nesse método, a amostra é colocada em um balão de fundo redondo com capacidade de 2L, em seguida é adicionado 1L de água destilada com os 100g de alecrim e aquecida por uma manta de aquecimento (Heating Mantle) a uma temperatura constante. O vapor liberado durante o aquecimento é condensado e no tubo do clevenger fica o hidrolato que é a mistura de água e OE, logo a água que é mais densa fica no fundo e na superfície se encontra o óleo essencial (WASICKY, 1963). Após a coleta do OE é necessário remover a água residual utilizando Sulfato de Sódio (Na_2SO_4) Anidro (INOCENTINNI, 2000).

No segundo tipo de extração, foi utilizado enzimas comerciais celulase e hemicelulose. Nessa etapa foram feitas várias aplicações afim de avaliar o melhor tempo de contato, o melhor tempo para o pré-tratamento enzimático, e melhor concentração de extrato enzimático, sendo que cada aplicação foi feita em triplicata, além de fazer o teste de teor de umidade para cada amostra. Primeiro, se pesou 100g de alecrim, adicionado a um becker com capacidade de 2L contendo 1L de água destilada com variações de 0,05%, 0,1% e 0,001% de concentração de extrato enzimático em relação a massa de planta utilizada, foi feito o pré-tratamento variando o tempo de contato entre 30,60 e 90 minutos, variando também a temperatura de 40, 30, 50°C, após isso, se realizou a extração por três horas iniciando a contagem com o decair da primeira gota de óleo essencial. Depois de todas as extrações feitas, foi avaliado o melhor tempo de contato, a temperatura de contato e a concentração enzimática para fazer uma nova extração, afim de determinar se esses parâmetros determinam o melhor rendimento final. Esse processo foi feito tanto para celulase, quanto para hemicelulase.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente, o teor de umidade foi avaliado para determinar qual das amostras seria melhor para as extrações, depois dessa conclusão foi usado somente amostras de



matéria do grupo Amostra 3, já que as outras tiveram maior teor de umidade e que esse fator interferiu no rendimento final, como mostra no Quadro 1.

Quadro 1 – Rendimento do OEA *in natura*

<i>In natura</i>	Peso das amostras (g)	Porcentagem de umidade (%)	Média em % da umidade	Rendimento de OE (mL)	Desvio padrão
Amostra 1	100,225g	61,09%	61,08%	0,528 mL	0,00111
		60,46%			
		61,69%			
Amostra 2	100,034g	60,90%	60,96%	0,523 mL	0,00106
		59,65%			
		62,32%			
Amostra 3	100,125g	59,88%	60,06%	0,549 mL	0,00112
		59,86%			
		60,45%			

Fonte: Autoria própria

Essa extração foi realizada para ter base de rendimento afim de comparar com as extrações com enzima.

Pode-se observar que a amostra 3 mostrou melhor rendimento em relação às demais, sendo que esta apresenta menor variação de teor de umidade e menor quantidade de matéria orgânica submetida a extração, mostrando que o fator umidade interfere diretamente no resultado final da extração.

As primeiras extrações foram feitas com a enzima comercial celulase, em seguida a hemicelulase, ambas da marca Sigma Aldrich. Os parâmetros investigados compreenderam o período de interação entre a enzima e o alecrim, a temperatura associada a esse período e a concentração da enzima. Cada procedimento de remoção teve uma duração fixa de três horas, com o decair da primeira gota de OE. Nas três primeiras extrações, foi variado o tempo de contato, conforme indicado no Quadro 2 e 3. Em seguida, nas duas extrações seguintes, foi utilizado o tempo de contato mais eficaz juntamente com a temperatura ideal. Por fim, nas duas últimas extrações da tabela, foi aplicado a concentração enzimática mais adequada.

Quadro 2 – Rendimento de OEA utilizando celulase variando o tempo de contato, a melhor temperatura e a melhor concentração enzimática.



Cellulase	Peso das amostras (g)	Porcentagem de umidade (%)	Média em % da umidade	t (min)	T (°C)	[μ] enz.	Rendimento de OE (mL)	Desvio padrão
Amostra 3.1	100,036	58,70%	58,90%	30	40	0,05%	0,589 mL	0,00313
		58,90%						
		59,10%						
Amostra 3.2	100,026	58,10%	58,30%	60	40	0,05%	0,598	0,00368
		58,30%						
		58,50%						
Amostra 3.3	100,038	59,30%	59,50%	90	40	0,05%	0,593 mL	0,00297
		59,50%						
		59,70%						
Amostra 3.4	100,018	59,90%	60,10%	60	30	0,05%	0,578	0,00289
		60,10%						
		60,30%						
Amostra 3.5	100,036	61,10%	61,30%	60	50	0,05%	0,596	0,00342
		61,30%						
		61,50%						
Amostra 3.6	100,014	61,70%	61,87%	60	40	0,01%	0,601 mL	0,00401
		61,90%						
		62,00%						
Amostra 3.7	100,1	58,15%	58,35%	60	40	0,001%	0,576 mL	0,00269
		58,35%						
		58,55%						

Fonte: Autoria própria

Quadro 3 – Rendimento de OEA utilizando hemicelulase variando o tempo de contato, a melhor temperatura e a melhor concentração enzimática.

Hemicelulase	Peso das amostras (g)	Porcentagem de umidade (%)	Média de % da umidade	t (min)	T (°C)	[μ] enz.	Rendimento de OE (mL)	Desvio padrão
Amostra 3.7	100,003	59,35%	59,55%	30	40	0,05%	0,582	0,00360
		59,55%						
		59,75%						
Amostra 3.8	100,016	59,95%	60,15%	60	40	0,05%	0,579 mL	0,00109
		60,15%						
		60,35%						
Amostra 3.9	100,046	60,55%	60,75%	90	40	0,05%	0,576 mL	0,00280
		60,75%						
		60,95%						
Amostra 3.10	100,014	59,25%	58,38%	30	30	0,05%	0,589	0,00203
		58,00%						
		57,90%						
Amostra 3.11	100,1	60,20%	59,03%	60	50	0,05%	0,580	0,00216
		58,35%						
		58,55%						
Amostra 3.12	100,013	60,52%	60,42%	30	40	0,01%	0,594	0,003025
		59,64%						
		61,10%						
Amostra 3.13	100,16	60,00%	61,27%	60	50	0,001%	0,583	0,002160
		65,25%						
		58,55%						

Fonte: Autoria própria

Nessa etapa, foi utilizada a enzima hemicelulase e conduziu a avaliar os mesmos parâmetros para fins de comparação com os resultados da celulase. No Quadro 3, observa-se as três primeiras extrações, onde foi variado o tempo de contato. Em seguida, é aplicado o tempo de contato mais eficaz juntamente com a temperatura ideal, e, por fim, utilizado a concentração enzimática mais adequada.

Baby & Ranganathan *et. al* 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.

Comparando com essa e outras literaturas, é comprovado que o pré-tratamento é uma etapa crucial para favorecer o rendimento final de óleo essencial garantindo que seus componentes característicos não sejam perdidos.

CONCLUSÃO

A partir das extrações efetuadas, finaliza-se que a aplicação de enzimas comerciais para otimizar o tempo e o rendimento final de óleo essencial de alecrim foi plausível, conclui-se também que a enzima celulase apresenta maior desempenho comparado a hemicelulase mas que essa comparação não é extravagante, além disso, determinou-se neste trabalho que a quantidade de água presente nas amostras de alecrim contribuíram com o resultado final de cada uma. Com isso, futuramente, é necessário a busca por outros parâmetros, além dos que foram apresentados, para alcançar melhores resultados na extração de óleo essencial de alecrim.

Agradecimentos

Os meus agradecimentos à minha professora orientadora, à Fundação Araucária pela bolsa e pelos recursos dados para a conclusão deste trabalho e ao Biopark pela disponibilização do espaço para nosso laboratório.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- ARO, N., PAKULA, T., PENTTILÄ, M. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** *FEMS Microbiology Reviews*, v.29, p.719– 739, 2005.
- BABY, K. C.; RANGANATHAN, T. V. **Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton.*) volatile oil.** *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 200-206, 2016.
- BARRIOS, V. A., OLMOS, D. A., NOYOLA, R. A., and LOPEZ-MUNGUÍA, C. A. **Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction.** *Oleagineux*, v.45, p.35-42, 1990.
- CUNHA, A. P., et al. (2012). **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**, Lisboa.
- GOMES, C. Embrapa. **Extração aquosa enzimática de óleo de soja.** Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br/imprcon.htm> Acesso em: 23/03/2023.
- MELO, M. T. P.; RIBEIRO, J. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. **Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita.** *Ciência Rural*, vol.41, n.7, p.1166-1169, 2011.
- SKRUBIS, B. G. **The drying of laurel leaves.** *Perfumer & Flavorist*, v. 7, n. 5, p.37-40, 1982.