

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

JAQUELINE DUNCKE

**ESTUDO PRELIMINAR DO USO DE ENZIMA NA EXTRAÇÃO DE
ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2018

JAQUELINE DUNCKE

**ESTUDO PRELIMINAR DO USO DE ENZIMA NA EXTRAÇÃO DE
ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Viviane da Silva Lobo

TOLEDO
2018

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

JAQUELINE DUNCKE

**ESTUDO PRELIMINAR DO USO DE ENZIMA NA EXTRAÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus*)**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus Toledo*, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

O termos de aprovação encontra-se assinado na Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – Campus TOLEDO.

Prof^a Dr^a Viviane da Silva Lobo

Prof^o Dr^o Renato Eising

Prof^a Dr^a Karina Graziella Fiametti

Toledo, junho de 2018

À Delcí, Erno e Danrley

AGRADECIMENTOS

Ao desenvolvimento deste trabalho, gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Viviane Da Silva Lobo, agradeço o auxílio e conhecimento destinado para a realização deste trabalho.

À banca avaliadora deste trabalho de conclusão de curso, professores Renato Eising e Karina Fiametti.

A Letícia Bastian e Andressa Godoy, agradeço toda ajuda prestada no desenvolver deste trabalho.

Aos meus amigos do grupo JITEM: Ivan, Tainá, Evandir e Maicon, pelo companheirismo durante os anos de faculdade.

RESUMO

DUNCKE, Jaqueline. Estudo preliminar do uso de enzima na extração de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). 2018. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

A extração de óleos essenciais de plantas aromáticas é um processo de alto custo, pois, necessita-se de grande quantidade de matéria-prima para obter-se uma pequena quantidade de óleo. Diante disso, novas tecnologias têm sido estudadas a fim de aumentar o rendimento de extração do óleo essencial, tentando-se reduzir o custo de produção. Com intuito de se obter um maior rendimento de óleo essencial de capim limão (*Cymbopogom citratus*), esse trabalho teve como objetivo fazer uma avaliação preliminar da aplicação da enzima comercial celulase (Celluclast 700 U/g, Sigma Aldrich) como catalisador biológico do processo de hidrodestilação. O processo iniciou com um pré-tratamento da planta em solução com a enzima celulase, utilizando 60 gramas de folhas de capim-limão, diferentes concentrações de caldo enzimático 0,1% e enzima e 1,2 litros de água. Em seguida, as misturas foram submetida a aquecimento na temperatura de 50°C por 2 horas. Essa solução foi submetida à hidrodestilação. Ao final observou-se um aumento médio de rendimento de óleo essencial extraído de 71% para a concentração de enzimas igual a 0,1%, comparado ao processo de hidrodestilação do capim limão sem o processo biotecnológico. Esse resultado demonstrou a viabilidade do processo, visto que, outros autores indicam que não há variação na composição química do óleo que foi submetido a procedimento semelhante.

Palavras-chave: Celulase. Hidrodestilação. Capim-limão. Rendimento. Biotecnologia.

ABSTRACT

DUNCKE, Jaqueline. Preliminary study of the use of enzyme in the extraction of essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*). 2018. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

The extraction of essential oils from aromatic plants is a process of high need of high raw material rate to obtain a low yield. In view of this, new technologies were studied to increase the extraction yield of the essential oil, trying to reduce the cost of production. The objective of this work was to evaluate the application of commercial cellulose (Celluclast 700 U/g, Sigma Aldrich) as a biological catalyst for the hydrodistillation process, in order to obtain a higher yield of lemon grass essential oil (*Cymbopogon citratus*). The process started with the pretreatment of the plant in solution with cellulase enzyme, using 0.1% of enzyme and 1.2 liters of water. Then, as the temperatures were warmed to 50 ° C for 2 hours. This solution was subjected to hydrodistillation. An average yield index of 71% for the enzyme concentration was equal to 0.1%, after the hydrodistillation process of lemon grass without the biotechnological process. This result demonstrated a process feasibility, since other authors have departed from a variation in the oil chemistry that was subjected to a similar procedure.

Keywords: Cellulase. Hydrodistillation. Lemon grass. Yield. Biotechnology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de composição de óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , diferenciando técnica utilizada e as diferentes condições de extração	17
Tabela 2: Porcentagem de óleos essenciais obtidos após extração por aparelho Clevenger, por meio de dois métodos: com aplicação de enzima à concentração 0,1% e amostra <i>in natura</i>	25
Tabela 3:	26
Tabela 4: Densidade dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> das amostras com e sem enzima	29
Tabela 5: Índice de refração dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> das amostras com e sem enzima.....	29
Tabela 6: Índice de refração dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> das amostras com e sem enzima.....	31

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS

CCD – Cromatografia em camada delgada

U/g – Unidades de enzima por grama

Rf – Fator de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	11
1.2 JUSTIFICATIVA	11
2 REVISÃO	13
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	13
2.1.1 Métodos de obtenção de óleos essenciais.....	14
2.1.2 Óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	16
2.2 ENZIMAS	17
2.2.1 Tecnologia de extração de óleos essenciais com enzima.....	18
2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	21
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL – CAPIM-LIMÃO	21
3.2 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DAS FOLHAS DE CAPIM-LIMÃO	21
3.3 EXTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	21
3.3.1 Cálculo do rendimento de extração	22
3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO	23
3.4.1 Densidade do óleo essencial de capim-limão	23
3.4.2 Índice de refração do óleo essencial de capim-limão.....	23
3.4.3 Cromatografia em camada delgada do óleo essencial de capim-limão	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO COM APLICAÇÃO DE ENZIMA CELLUCLAST 700 U/g.....	25
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDOS DE CAPIM- LIMÃO	28
4.3 Densidade do óleo essencial de capim-limão	28
4.5 Índice de refração do óleo essencial de capim-limão.....	28
4.5 Cromatografia em camada delgada do óleo essencial de capim-limão	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

As primeiras investigações sistemáticas que se tem registro de constituintes a partir de óleos essenciais são do químico M. J. Dumas (1800-1884), que analisou alguns hidrocarbonetos, oxigênio e constituintes contendo nitrogênio. Desde então, pesquisadores realizaram estudos em prol de obter mais conhecimentos a cerca desse componente oleoso e sua composição química, que era obtido da extração de algumas plantas, até chegar-se ao conceito de óleos essenciais que se conhece atualmente. Com o passar dos anos, passaram a identificar uma ampla gama de plantas que proporcionam óleo essencial (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Os métodos mais utilizados para obtenção de óleos essenciais são: por arraste a vapor, prensagem a frio, extração por solventes e hidrodestilação. O método de extração depende da parte da planta que contém o óleo essencial. Todavia, sua extração e comercialização ainda são processos que possuem um alto valor comercial agregado, devido a equipamentos de alto custo e outras situações (BIASI *et al.*, 2009).

A extração de óleos essenciais de plantas aromáticas é um processo de alto custo, pois necessita de grande quantidade de matéria prima para obter-se um baixo rendimento. Diante disso, novas tecnologias têm sido estudadas a fim de aumentar o rendimento da extração do óleo essencial. (CASSINI, 2010; REIS, 2015; SANTOS, 2008).

Com intuito de elevar o rendimento de óleo essencial aplica-se o tratamento com catalisadores de origem biológica, as enzimas. A utilização de enzimas contribui para o rompimento da parede celular vegetal, e dessa forma, facilita a remoção do óleo essencial. Esse processo de pré-tratamento enzimático minimiza o tempo de extração, podendo aumentar o rendimento de óleo essencial obtido (REIS, 2015).

Enzimas hidrolíticas são as enzimas mais aplicadas no processo de extração de óleos essenciais. O uso dessas enzimas no pré-tratamento da biomassa para extração de óleos vem adquirindo grande interesse pela indústria biotecnológica (CASSINI, 2010). Dessa forma, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma metodologia de tratamento enzimático que possa ser aplicada para a extração de óleo essencial das folhas de capim-limão, avaliando o rendimento da extração do óleo essencial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar avaliação do rendimento da extração de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) após utilização de catalisadores de origem biológica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter o óleo essencial de capim-limão utilizando sistema de hidrodestilação da planta *in natura*;
- Calcular o rendimento da extração do óleo essencial de capim-limão utilizando metodologia em hidrodestilação;
- Aplicar pré-tratamento do capim-limão a uma solução de 0,1% de enzima celulase;
- Extrair o óleo essencial da planta pré-tratada com enzima por hidrodestilação;
- Comparar os resultados obtidos de rendimento do óleo essencial, verificando a aplicabilidade de uma enzima em relação ao aumento do rendimento da extração;
- Avaliar possível alteração química de sua composição do óleo de *Cymbopogon citratus* após a extração com pré-tratamento enzimático.

1.2 JUSTIFICATIVAS

A indústria de extração de óleos essenciais, bem como a demanda de produtos desenvolvidos a partir desses óleos tem crescido nos últimos anos. Entretanto, os métodos de obtenção dos óleos encontrados no mercado ainda apresentam elevado custo por necessitar de um grande volume de matéria prima para um baixo rendimento, como descrito por BIZZO, HOVELL e REZENDE, (2009) e ALMEIDA et al. (2014).

A intenção de se estudar a aplicação das enzimas como catalisadores biológicos das extrações de óleo essencial tem objetivo de aumentar o rendimento

de óleo essencial, e também verificar a viabilidade desse método. Alguns estudos já foram realizados em torno da aplicação das enzimas à extração de óleos essenciais, como nos trabalhos de REIS (2015) e SANTOS (2008), os quais apresentaram resultados satisfatórios para o aumento no rendimento do óleo essencial. Esses resultados são possíveis devido as enzimas hidrolíticas específicas degradarem a parede celular da planta. Assim, busca-se por uma tecnologia enzimática viável para aplicação das enzimas na extração do óleo de capim-limão, sem que altere as propriedades químicas do mesmo, e que possa futuramente ser aplicado a nível industrial.

Devido à especificidade da enzima celulase pela celulose, o presente trabalho irá demonstrar um estudo preliminar da aplicação de enzima celulase comercial na hidrodestilação de capim-limão, para obtenção de maior rendimento de óleo essencial. As condições experimentais do presente estudo (concentração da enzima, temperatura, tempo de pré-tratamento, tempo de hidrodestilação, pH do meio) foram escolhidas, conforme os trabalhos bibliográficos levantados, de forma a realizar uma visualização prévia de resultados esperados. A extração antecedida por processo de pré-tratamento enzimático pode possibilitar a ruptura da parede celular vegetal, pois a enzima atua sobre a superfície do material vegetal causando danos na epiderme foliar, promovendo dessa forma, a extração do óleo essencial (REIS, 2015).

A escolha do processo de hidrodestilação para a realização deste trabalho decorreu pelo método ser mais viável à extração com pré-tratamento enzimático e água. A planta capim-limão foi escolhida pois encontra-se abundante na região e, também, devido a experimento preliminares, verificou-se não precisar realizar alterações de pH para o pré-tratamento, assim sendo possível realizar a extração sem alterar as propriedades o óleo essencial obtido.

2 REVISÃO

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são definidos como misturas complexas com composição química variada, obtidos por meio mecânico ou procedimentos de destilação (BASER; BUCHBAUER, 2010; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009;). Tem-se que os principais óleos essenciais disponíveis são os óleos de citrus, laranja, limão, anis, erva-doce, hortelã, cominho, cravo, gengibre e de alecrim.

O produto final da extração de óleos essenciais resulta em um produto constituído de material resinoso volátil contendo o princípio ativo característico de cada óleo essencial (BASER; BUCHBAUER, 2010). Os óleos essenciais são líquidos à temperatura ambiente, tem coloração clara e, em geral, possuem densidade menor que a da água. São solúveis em álcoois e em solventes orgânicos habituais, são lipossolúveis e muito pouco solúveis em água, sendo arrastáveis por vapor d'água (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura de hidrocarbonetos, denominados terpenos sesquiterpenos. Também, são ricos em concentrações de aromáticos (SANTOS *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais apresentam propriedades inseticidas, nematicida, fungistático, antimicrobiano e antifúngico. Tem-se em vista que as substâncias químicas dos óleos essenciais apresentam compostos capazes de inibir direta ou indiretamente os sistemas enzimáticos bacterianos, mesmo que a maioria dos microrganismos seja ainda desconhecida, apresentando um comportamento semelhante ao dos antibióticos (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

A sua utilização na indústria de processamento de alimentos tem crescido, em substituição aos condimentos na forma natural. Atualmente, têm sido muito utilizados no preparo de alimentos, em virtude do sabor e aroma diferenciado, proporcionando o aumento da vida de prateleira do produto, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e consequente deterioração dos alimentos. (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; SCHERER *et al.*, 2009).

Os produtos obtidos a partir da aplicação dos óleos essenciais também envolvem as indústrias médica e farmacêutica, como descrito por Oliveira *et al.*

(2006). Óleos essenciais podem atuar como inibidores ou intensificadores de propriedades terapêuticas dos medicamentos convencionais, como podem não apresentar nenhuma alteração.

Os óleos essenciais, além de possuírem aplicações na indústria médica, farmacêutica e alimentícia, também estão presentes na composição de uma variada gama de produtos cosméticos e de perfumaria.

2.1.1 Métodos de obtenção de óleos essenciais

Os óleos essenciais são comumente extraídos via destilação a vapor e prensagem a frio, esse último empregado na extração de óleos de frutos cítricos. Além desses, tem-se ainda os métodos da hidrodestilação, enfleurage, extração por solventes e fluídos supercríticos.

- Arraste a vapor

O método de arraste a vapor é o mais utilizado pelas indústrias a nível mundial (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007). Esse processo nada mais é do que submeter o material vegetal à ação do vapor d'água. O vapor d'água atravessa os tecidos da parede vegetal da matéria prima, e leva todo o óleo contido no interior das glândulas da planta. Com o choque térmico, esse óleo é vaporizado, e arrastado pelo vapor até atingir o condensador, onde resfriará e voltará à fase líquida. O último estágio do processo é o separador, que irá separar o óleo do hidrolato (subproduto) por meio das diferenças de polaridade e densidade destas substâncias (PISTELLI; SILVA, 2012).

- Prensagem a frio

O método de prensagem a frio é o mais empregado na extração de óleos essenciais de frutos cítricos. Os frutos são adicionados inteiros e em uma prensa hidráulica, que por meio de esmagamento, faz com que o suco e o óleo essencial da fruta sejam expelidos (WAN; WAKELYN, 1997). Um jato d'água forma uma emulsão, e os detritos são removidos por um ciclone. Após isso, uma sequência de centrífugas realiza a clarificação desse óleo, no qual a fração leve e mais

concentrada de óleo passa por decantação para uma separação final (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007).

- Extração por solvente

A extração por solventes é utilizada aplicando um solvente que preserve a integridade dos compostos do óleo essencial. A planta é misturada ao solvente, e essa mistura é deixada em agitação por um tempo pré-determinado. Posteriormente, os resíduos sólidos da planta são filtrados, e o extrato líquido é submetido ao aparelho rota evaporador para a separação do óleo e do solvente (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007).

- *Enfleurage*

A *enfleurage* foi desenvolvida visando à obtenção de óleos essenciais de matérias primas delicadas, como flores. É um processo lento, complexo e caro. No método clássico, as pétalas eram picotadas e colocadas sobre algumas placas de vidro em contato com uma gordura vegetal ou animal inodora, que funciona como esponja. As pétalas vão sendo substituídas a cada 24 horas, até a “esponja” estar cheia de óleo. A gordura é então filtrada e destilada com álcool (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007).

- Extração por fluidos supercríticos

Na extração por fluidos supercríticos a biomassa é colocada dentro do cilindro que possui uma capa de metal poroso para permitir a circulação do fluido supercrítico. O CO₂ passa pela matéria prima, onde os óleos são dissolvidos. Essa solução gasosa sai do extrator e passa por uma válvula redutora de pressão, causando precipitação dos componentes no separador (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007).

- Hidrodestilação

A hidrodestilação é considerada o método mais usado em escala laboratorial. A matéria prima vegetal é adicionada mergulhada totalmente em água. A destilação ocorre de forma mais lenta e à temperatura de 100°C. Já em escala industrial, é considerado obsoleto (JOSÉ; OLIVEIRA, 2007). O material a ser destilado para obtenção do óleo essencial fica em contato direto com a água.

Quando a água entra em ebulição, arrasta consigo o óleo, e quando condensa, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo. O método dessa extração do óleo essencial por hidrodestilação utiliza o aparelho Clevenger (SILVA *et al.*, 2013).

Na literatura encontram-se vários trabalhos sobre a extração de óleo essencial por diferentes métodos. No entanto, é possível observar que mesmo com os processos utilizados o teor do óleo essencial obtido é baixo (BIASI *et al.*, 2009).

2.1.2 Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

O *Cymbopogon citratus* ou capim-limão, também conhecido popularmente como capim-santo, é uma das espécies mais cultivadas para a produção de óleos essenciais. Pertencente à família *Graminae* é internacionalmente conhecido como “lemongrass” (GOMES, 2001).

Assim como outras plantas originárias do sudeste asiático, são exigentes de calor, umidade e radiação solar. No Paraná, a produção de óleo essencial de capim-limão é numa média de 40 kg de óleo por hectare (GOMES, 2001).

A constituição química de seus óleos essenciais é composta por citral e isômeros geranial e neral. Também contém vários aldeídos, ácido acético, constituintes finos da parte aérea e triterpenoides isolados da cera que recobre suas as folhas. O citral é o principal responsável pelas atividades antibacterianas e antifúngicas deste óleo essencial. Em cosméticos, o citral também é utilizado como fragrância. O mirceno é o componente responsável pela propriedade sedativa e calmante do óleo essencial de capim-limão, muito utilizado na aromaterapia (GRANDI, 2014; SANGWAN, 2001).

Conforme a Tabela 1, abaixo representada, é possível observar a porcentagem dos principais compostos encontrados no óleo essencial de capim-limão. A tabela foi elaborada comparando diferentes métodos de extração e condições aplicadas à planta *Cymbopogon citratus*.

Tabela 1: Tabela de composição de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, diferenciando técnica utilizada e as diferentes condições de extração.

Componentes/Tratamentos	Folhas frescas trituradas, empregando-se a técnica de hidrodestilação*	Folhas frescas não trituradas, empregando-se a técnica de hidrodestilação* ¹	Folhas secas em estufas e trituradas a 1 cm, empregando-se a técnica de hidrodestilação* ²	Material comercial, empregando-se a técnica de arraste a vapor* ³
Mirceno	1,37%	14,6%		13,89%
Neral	30,41%	34,5%	34,55%	32,11%
Geranial	42,92%	43,8%	44,50%	39,53%
Outros	25,3%	7,4%	20,95%	14,47%

Fonte: *PICCOLI *et al.*, 2011; *¹CORREA, *et al.*, 2005; *²LIMA *et al.*, 2008; *³FALCÃO, 2012.

Por meio da tabela acima, é possível observar que os principais componentes do óleo essencial de capim-limão são o mirceno, neral e geranial. Entretanto, sua composição no óleo essencial obtido varia de acordo com o método de extração utilizado, tratamento das folhas e pré-tratamento da biomassa antes da extração, por exemplo. Os outros componentes do óleo essencial de capim-limão correspondem a cerca de cem componentes e funções variadas.

2.2 ENZIMAS

Praticamente todas as reações do metabolismo humano, animal e vegetal são mediados por enzimas. (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006). A maioria das enzimas tem natureza proteica e atuam como catalisadores biológicos nas reações bioquímicas, não sofrendo alterações nesses processos. Em geral apresentam eficiência maior que catalisadores sintéticos e inorgânicos. As enzimas apresentam alta especificidade e funcionam sob boas condições de pH e temperatura (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A atividade catalítica de uma enzima depende da sua conformação estrutural proteica natural.

O princípio catalítico das enzimas ainda é desconhecido, mas uma das suas principais características é a sua especificidade por um substrato. Ou seja, uma enzima, que tem conformação complexa e devido à singularidade do seu sítio ativo, escolherá certa quantidade de compostos que será capaz de atacar (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

2.2.1 Tecnologia de extração de óleos essenciais com enzima

A aplicação de enzimas na extração de óleos essenciais tem sido uma metodologia utilizada em alguns estudos para o aumento de rendimento do processo (CASSINI 2010; REIS, 2015; SANTOS, 2008; SOWBHAGYA; SRINIVAS; KRISHNAMURTHY, 2009; TAVARES, 2012).

O uso de enzimas específicas tem função no processo de romper a parede celular do vegetal, facilitando o processo de extração do óleo contido nas “bolsas”. Dessa forma, espera-se um aumento no rendimento do óleo essencial. Essa extração torna-se viável e promissora quando aplicada simultaneamente a processos hidrodestilação, por exemplo (SANTOS, 2008).

As enzimas, que tem a função específica de acelerar reações químicas por meio de catálise, podem ser utilizadas para facilitar o processo de degradação da parede celular vegetal, composta principalmente por celulose. Assim, para a extração de óleo essencial de uma planta, as principais enzimas, que podem ser utilizadas por atuarem na parede celular vegetal, são a celulase e hemicelulases (CASSINI 2010; FARINAS, 2011; REIS, 2015; SANTOS, 2008; TAVARES, 2012,).

Alguns trabalhos já foram realizados utilizando diferentes plantas (cítricos, frutos ou sementes), em prol de avaliar a capacidade de enzimas celulases e hemicelulases em aumentar o teor de óleo essencial obtido por meio de extração. No entanto, cada trabalho ajustou as condições de aplicação da enzima e condições de extração conforme fosse mais desejável ao seu trabalho, não se obtendo metodologia específica para essa nova rota biotecnológica. Ao analisar as bibliografias existentes, é possível observar que as variáveis do processo influenciam grandemente numa maior ou menor eficácia no aumento do teor de óleo essencial (CASSINI 2010; REIS, 2015; SANTOS, 2008; TAVARES, 2012).

Dentre os trabalhos realizados com óleos essenciais de plantas aromáticas quanto à extração enzimática, tem-se essa aplicação para a obtenção do óleo da casca de mandarina (*Citrus reticulata*) realizado por Mishra *et al.* (2005). Nesta pesquisa foram utilizadas três concentrações diferentes de xilanases para o pré-tratamento enzimático, e realizou-se a extração do óleo por meio de hidrodestilação. Os resultados apresentaram médias de rendimento em óleo maiores nas amostras

pré-tratadas com enzimas, de até 5,33% para concentração de enzimas igual a 0,3%. As amostras, que não foram tratadas com enzimas, produziram um rendimento em óleo de até 4,93%. Na pesquisa foi utilizada concentração de 0,1% a 0,3% de xilanases para o pré-tratamento enzimático, condições de pH igual a 4,5, temperatura do banho de 32°C por três horas e 75 g de planta, sendo posteriormente realizada a extração do óleo por meio de hidrodestilação.

Outro trabalho realizado foi o de Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009), em que realizou-se a extração de óleo volátil de sementes de aipo com aplicação de enzima. No mesmo, concentrações de enzima celulase (4000 U/mL), protease (1100 U/g) e pectinase (300 U/mL), correspondendo à, respectivamente, 0,5%, 1% e 1% de enzima adicionada. O rendimento encontrado por Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009) para as amostras pré tratadas foram de 22% à 27% de teor de óleo a mais que a amostra controle. Os autores utilizaram 200 g de planta, sob condições de pH 5,0 e temperatura de 45°C por 2 horas, sendo, da mesma forma, realizada a extração do óleo essencial por hidrodestilação durante 3 horas.

No trabalho de Santos (2008), o autor aplicou enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* em laboratório na extração de óleos essenciais. O autor obteve com os experimentos um aumento do rendimento de óleos essenciais realizados com *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* demonstrando a eficácia da utilização das enzimas celulasas, xilanases e beta-glicosidase, com um aumento médio de 60% da produção de óleo por *M. divaricatum* e 55% para a *M. spicata*, em relação à extração sem a aplicação das enzimas.

Reis (2015) também apresentou à aplicação de enzimas, essas foram produzidas por *Aspergillus niger* e aplicadas na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis*. O autor obteve o aumento da massa de óleo extraído de até 194%, confirmando a viabilidade do uso dos extratos multienzimáticos (CMcase, FPase, Xilanase, Lacase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Amiloglicosidase) na extração dos óleos essenciais. O mesmo também observou que pré-tratamento preserva a integridade do componente majoritário do óleo.

Em Tavares (2012) foi possível observar produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em estado sólido por *Aspergillus*

niger a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides*. O autor observou que o rendimento dos óleos extraídos após aplicação do extrato bruto enzimático na etapa de pré-tratamento é maior do que o rendimento do óleo extraído sem a utilização dos extratos enzimáticos, obtendo-se até 14,14% de rendimento e, para todos os casos o rendimento é crescente ao passar do tempo de extração.

Os trabalhos acima citados, bem como outros realizados, comprovam a eficácia da utilização de enzima no pré-tratamento de plantas antes da extração de seus óleos essenciais. Além de aumentar o rendimento de óleo produzido, verifica-se que a qualidade do óleo essencial permanece a mesma que a do óleo essencial puro.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL – CAPIM-LIMÃO

Plantas de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) tiveram suas folhas colhidas pela manhã, na cidade de Toledo, sendo então levadas imediatamente ao laboratório da UTFPR – Campus Toledo, para seleção e pesagem.

Inicialmente as folhas foram lavadas e trituradas, e, então, armazenadas para posterior utilização.

Uma amostra de 5 gramas de folhas foi seca para cálculo da umidade foliar. O teste foi realizado por secagem direta em estufa a 105°C.

Todas as amostras produzidas foram realizadas em triplicata.

3.2 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DAS FOLHAS DE CAPIM-LIMÃO

O pré-tratamento enzimático foi realizado utilizando enzima de origem comercial Celluclast 700 U/g da marca Sigma Aldrich.

O pré-tratamento enzimático é realizado em um balão de 2 L de capacidade, utilizando 60 g de substrato (folhas de capim-limão), adicionando-se a essa biomassa a concentração 0,1% de enzima comercial para 1,2 L de água. Dessa forma, utilizou-se 1,2 mL de enzima. A concentração aplicada de enzima, foi definida conforme análise de trabalhos semelhantes, que utilizaram quantidade semelhante de enzima em seu caldo enzimático preparado (MISHRA *et al.*, 2005; SOWBHAGYA; SRINIVAS; KRISHNAMURTHY, 2009).

Cada mistura de biomassa de capim-limão e caldo de enzima foi submetida a um pré-tratamento com banho-maria por 2 horas, a temperatura de 50°C (FRANCO *et al.*, 2015; REIS, 2015). Não foi necessário o ajuste de pH pois, devido a acidez do capim-limão, a água do banho já se encontrava em pH ideal para ativar a enzima (entre 5,0 e 6,0).

3.3 EXTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

O processo escolhido para a extração de óleo essencial foi a hidrodestilação, metodologia Clevenger, visto que as amostras pré-tratadas com a enzima se encontravam em mistura aquosa. Esse sistema consistiu em aquecer a mistura de água e planta em uma manta de aquecimento, até completar 1 hora de destilação de óleo essencial do capim-limão.

A hidrodestilação foi realizada para ambos os sistemas: apenas uso da planta com água; e as misturas de planta pré-tratada com enzima celulase. Esses processos foram necessários para que pudesse comparar o valor final de rendimento da extração de óleo essencial com e sem processo catalítico enzimático.

3.3.1 Cálculo do rendimento de extração

O cálculo do rendimento da extração de óleo essencial, comparando a massa de óleo extraído de cada amostra com a amostra de planta utilizada é dado pela Equação 1 (SANTOS, 2008):

$$\text{Rendimento \%} = \frac{g(\text{massa de óleo extraído})}{g(\text{massa de biomassa foliar utilizada na extração})} \times 100 \quad [1]$$

A comparação entre os valores de rendimento de óleo essencial foi realizada apenas comparando os valores numéricos dos resultados do rendimento de cada processo.

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO

3.4.1 Densidade do óleo essencial de capim-limão

Um dos testes físicos mais importantes a serem realizados com óleos essenciais consiste na análise da densidade do óleo (PADUAN, *et al.*, 2009).

A análise da densidade das amostras de óleo essencial foi realizada pesando os conteúdos de óleos essenciais obtidos e obtendo seus volumes.

Posteriormente, o cálculo da densidade decorreu conforme Equação 2 a seguir: (PADUAN, *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2014).

$$Densidade = \frac{massa (g)}{volume (mL)} \quad [2]$$

Onde: Densidade = densidade do óleo essencial de capim-limão; Massa = massa de óleo essencial obtido; Volume = volume de óleo essencial obtido.

3.4.2 Índice de refração do óleo essencial de capim-limão

Outra análise física importante a ser realizada para garantir a integridade do óleo consiste no índice de refração (PADUAN, *et al.*, 2009).

O índice de refração foi analisado por meio de refratômetro de bancada, disponível no laboratório de Química Geral da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Primeiramente o refratômetro foi zerado com uma amostra padrão, no caso a escolhida foi água. Em seguida, as amostras de óleo essencial foram analisadas e obtiveram-se os índices de refração (PADUAN, *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2014).

3.4.3 Cromatografia em camada delgada do óleo essencial de capim-limão

A análise dos componentes dos óleos essenciais obtidos se torna importante para avaliação da integridade do óleo essencial obtido. Uma análise química prática pode ser realizada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) (SANTOS, 2008).

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura sólido-líquido onde a fase móvel (líquida) migra sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (NETO, 2003).

Para análise de óleos essenciais e a aplicação de enzimas no aumento de rendimento da extração, esta análise se torna importante para identificar a pureza do óleo após o pré-tratamento com enzima Celluclast, fazendo uma comparação entre os resultados obtidos com e sem aplicação de enzima.

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando placa de sílica gel pronta como fase estacionária e diclorometano como fase móvel. O óleo

essencial de *Cymbopogon citratus* foi adicionado a placa de sílica utilizando-se de um tubo capilar, e adicionado a 1 centímetro da margem inferior da placa. A placa de sílica foi adicionada a um béquer contendo 20 mL de diclorometano, e este béquer foi devidamente tampado com um vidro de relógio. A corrida cromatográfica percorreu 6 centímetros da placa de sílica, até alcançar a margem superior (SANTOS, 2008).

A revelação com iodo foi efetuada colocando-se as placas em béquer de vidro contendo cristais de iodo e devidamente fechado com um vidro de relógio. A placa foi retirada do béquer assim que ocorreu a revelação.

O fator de retenção será calculado pela seguinte Equação 3:

$$Rf = \frac{dr}{dm} \quad [3]$$

Onde: Rf= fator de retenção; dr= distância percorrida pela substância; dm= distância percorrida pela fase móvel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO COM APLICAÇÃO DE ENZIMA CELLUCLAST 700 U/g

Primeiramente, uma amostra de folhas utilizadas no pré-tratamento enzimático ou na extração *in natura* passaram por teste de umidade. A amostra de 5 gramas da planta utilizada na extração apresentou umidade de 71%.

As amostras de óleos essenciais *in natura* e pré-tratados com a enzima Celluclast 700 U/g à 0,1% apresentaram as seguintes composições (Tabela 1).

Tabela 2: Porcentagem de óleos essenciais obtidos após extração por aparelho Clevenger, por meio de dois métodos: com aplicação de enzima à concentração 0,1% e amostra *in natura*.

Tratamento	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Desvio Padrão
<i>In natura</i>	0,85%	0,84%	0,85%	0,004714
Celluclast	1,46%	1,47%	1,43%	0,016997

Fonte: Autor.

A porcentagem de óleo essencial obtidos nas amostras *in natura* atingiu uma média igual a 0,84%. Pela metodologia de pré-tratamento descrita, pode-se observar rendimento médio de extração de 1,45% para concentração de 0,1% de enzima aplicada. Os resultados obtidos na elevação do teor de óleo demonstraram que todas extrações realizadas utilizando pré-tratamento, houve aumento da massa de óleo extraído e, portanto, um maior teor de óleo essencial. Com a concentração de enzima aplicada, obteve-se 71% de aumento médio no rendimento da extração em comparação à amostra padrão. Esse resultado encontrado é totalmente favorável frente à metodologia aplicada, demonstrando que os resultados apresentados foram satisfatórios para a extração de óleo essencial utilizando as enzimas.

Uma comparação dos resultados obtidos com resultados obtidos em trabalhos já realizados pode ser observada na Tabela 3:

Tabela 3: Tabela de apresentação dos resultados obtidos da extração de óleo essencial de capim-limão com aplicação de enzima, comparando com trabalhos já existentes.

Tratamento	Extração de óleo essencial de capim-limão com aplicação de enzima Celluclast a 0,1%.*	Extração de óleo volátil de sementes de aipo por hidrodestilação com aplicação de enzimas celulase, protease e pectinase a 0,5%, 1% e 1%* ¹	Caldo enzimático produzido em laboratório e aplicado na extração de óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i> e <i>Mentha spicata</i> por hidrodestilação* ²	Caldo multienzimático produzido por <i>Aspergillus niger</i> e aplicadas na extração do óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> , extraído por hidrodestilação* ³
% de óleo essencial obtido	71%	22% a 27%	60% e 55 %, respectivamente	194%

Fonte: *Autor; *¹Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009); *²Santos, 2008; *³Reis, 2015.

O trabalho de Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009), utilizando enzimas comerciais celulase, protease e pectinase, apresentou 22% à 27% no aumento do teor de óleo volátil de sementes de aipo. A concentração de enzima aplicada foi de 0,5%, 1% e 1% para celulase, protease e pectinase, respectivamente. Em comparação ao trabalho de Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009), tem-se que a aplicação de enzima comercial Cellulase 700 U/g também apresentou-se viável ao aumento do teor de óleo essencial de capim-limão.

Trabalhos realizados apresentaram resultados desejáveis e semelhantes aos discutidos no presente estudo, no entanto, não utilizaram enzima de origem comercial. Em Santos (2008), o trabalho visou à utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* em laboratório na extração de óleos essenciais. O autor obteve com os experimentos um aumento do rendimento de óleos essenciais realizados com *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* demonstrando a eficácia da utilização das enzimas, com um aumento médio de 60% da produção de óleo por *M. divaricatum* e 55% para a *M. spicata*, em relação à extração sem a aplicação das enzimas.

Reis (2015) também apresentou à aplicação de enzimas, essas foram produzidas por *Aspergillus niger* e aplicadas na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis*. O autor obteve o aumento da massa de óleo extraído de até 194%, confirmando a viabilidade do uso dos extratos multienzimáticos (CMcase, FPase, Xilanase, Lacase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Amiloglucosidase) na extração dos óleos essenciais. O mesmo também observou que pré-tratamento

enzimático reduz o tempo de hidrodestilação, preserva a integridade do componente majoritário do óleo, além de apresentar maior quantidade de óleo.

Em Tavares (2012) foi possível observar produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides*. O autor observou que em todos os tempos de extração, o rendimento dos óleos extraídos após aplicação do extrato bruto enzimático na etapa de pré-tratamento é maior do que o rendimento do óleo extraído sem a utilização dos extratos enzimáticos, e para todos os casos o rendimento é crescente ao passar do tempo de extração.

Embora realizando pesquisa sobre óleos essenciais de frutos cítricos, Cassini (2010) utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de *Citrus latifolia* tanaka. A partir desse experimento, a enzima celulase não foi suficiente para ser detectada no processo de hidrodestilação de uma hora, uma vez que não houve aumento de rendimento em óleo. A autora atrela o fato do rendimento em óleo não ter sido alterada podendo ser devido ao impedimento da evaporação do óleo na hidrodestilação pelas próprias camadas internas do tecido da casca, já que estas não estavam trituradas.

Na pesquisa de óleo essenciais de frutos cítricos, Mishra *et al.* (2005) utilizaram complexo enzimático contendo xilanases e obteve resultado satisfatório. O uso de enzimas foi favorável para extração de óleo essencial de *Citrus reticulata*.

Por meio de levantamento bibliográfico realizando, é possível observar a similaridade pela utilização de enzimas específicas. Com isso, pode-se sobressaltar que a utilização da Celluclast, assim como os extratos brutos enzimáticos e uso de enzimas comerciais acima citados, foi eficaz na extração do óleo essencial por meio de hidrodestilação, obtendo aumento de 71% de óleo essencial de capim-limão.

O pré-tratamento realizado utilizou de uma quantidade relativamente pequena de enzima em comparação a quantidade de substrato, sendo a concentração do caldo enzimático aplicado 0,1%. Entretanto, mesmo com uma pequena proporção de enzima aplicada, pode-se observar considerável rendimento da extração do óleo essencial. Um processo semelhante, utilizando a concentração de enzima igual à 0,1% pode ser observada no trabalho de Mishra *et al.* (2005), no qual o mesmo obteve rendimento de óleo essencial mínimo de 4,86%.

Outra avaliação pode ser feita comparando o processo de aplicação de enzimas ao aumento de rendimento da extração de óleo essencial, com outro método de otimização da extração de óleos essenciais, como descritos em Costa *et al.* (2005), no qual o mesmo avalia secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. Costa *et al.* (2005) obtém para o capim limão maior rendimento de óleo essencial obtido com o material seco na sala com desumidificador, não havendo diferenças significativas para os tamanhos da folha, sendo 14,525 g Kg⁻¹ matéria seca. A porcentagem de óleo correspondeu a 0,581% de óleo essencial.

Todavia, muitas variáveis influenciam no pré-tratamento com enzima, bem como na hidrodestilação do óleo essencial. Este trabalho visou realizar um estudo preliminar em condições específicas de operação, em que se aplicou a concentração de 0,1% de caldo enzimático, considerando 50°C e 2 horas para a temperatura do banho no pré-tratamento e 1 hora de hidrodestilação. Para o banho maria, não foi ajustado o pH, uma vez que a própria planta capim-limão, por ser ácida, ajustou o pH do meio em 5,0 à 6,0 (sendo assim ideal para a ativação da enzima celulase). Embora tais condições adotadas tenham sido eficientes, só um estudo das variáveis independentes (temperatura, tempo de contato e volume de extrato enzimático) assim como as suas interações, proporcionarão uma avaliação de quais condições desejáveis são mais favoráveis ao aumento da extração de óleo essencial.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAS OBTIDOS DO CAPIM-LIMÃO

4.2.1 Densidade do óleo essencial de capim-limão

As amostras de óleos essenciais *in natura* e pré-tratados com a enzima Celluclast 700 U/g apresentaram as seguintes densidades após análise (Tabela 4). A análise de densidade, índice de refração e cromatografia em camada delgada foi realizada apenas com a primeira amostra de cada método (aplicação de enzima de *in natura*).

Tabela 4: Densidade dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* das amostras com e sem enzima.

Tratamento	Densidade
Celluclast	0,9686 g/mL
<i>In natura</i>	0,9705 g/mL

Fonte: Autor.

Conforme resultados apresentados, verificou-se que a amostra de óleo essencial pré-tratada com enzima Celluclast 700 U/g analisada, comparada com a amostra de óleo essencial *in natura*, não apresentou significativa diferença de densidade. Dessa forma, temos que um fator físico importante para o óleo essencial de capim-limão manteve-se íntegro após o pré-tratamento com enzima.

Em comparação com outros trabalhos, a densidade encontrada nas análises realizadas é coerente com os resultados apresentados nos mesmos. Sousa *et al.* (2014) e Paduan *et al.* (2009) fizeram as análises de densidade do óleo essencial de capim-limão *in natura*. De acordo com Sousa *et al.* (2014), o resultado encontrado para a densidade foi de 0,9257. No trabalho de Paduan *et al.* (2009), a densidade encontrada foi de 0,9571.

4.2.2 Índice de refração do óleo essencial de capim-limão

As amostras de óleos essenciais *in natura* e pré-tratados com a enzima Celluclast 700 U/g apresentaram os seguintes índices de refração após análise (Tabela 5):

Tabela 5: Índice de refração dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* das amostras com e sem enzima.

Tratamento	Índice de refração
Celluclast	1,4639
<i>In natura</i>	1,4651

Fonte: Autor.

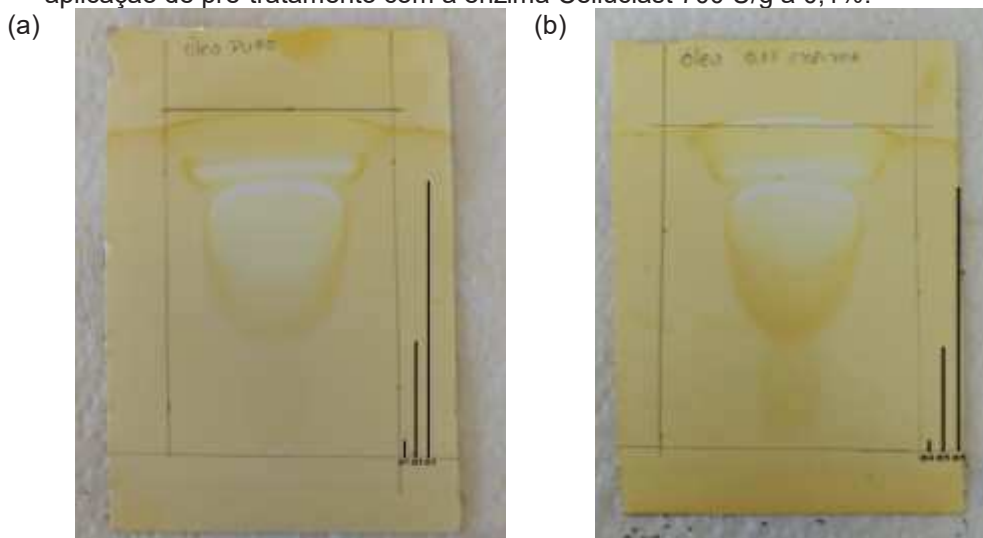
Verificou-se que a amostra de óleo essencial pré-tratada com enzima Celluclast 700 U/g analisada, comparada com a amostra de óleo essencial *in natura*, não apresentou significativa diferença de índice de refração. Dessa forma, tem-se que outro fator físico importante para o óleo essencial de capim-limão manteve-se íntegro após o pré-tratamento com enzima.

Em comparação com outros trabalhos, tem-se que a densidade encontrada nas análises realizadas é coerente com os resultados apresentados pelos mesmos. De acordo com *Sousa et al.* (2014), o mesmo encontrou índice de refração igual a 1,4813 para suas amostras. No trabalho de *Paduan et al.* (2009), o índice de refração encontrado foi de 1,4815.

4.2.3 Cromatografia em camada delgada do óleo essencial de capim-limão

As placas de sílica gel utilizadas na análise de cromatografia em camada delgada foram submetidas às revelações utilizando iodo. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 1 seguinte.

Figura 1: Revelação com iodo de placa de cromatografia em camada delgada do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* realizada por corrida cromatográfica utilizando diclorometano como eluente: (a) puro; (b) com aplicação de pré-tratamento com a enzima Celluclast 700 U/g à 0,1%.



Fonte: Autora.

Por meio de uma visualização prévia das imagens, observa-se que ambas as análises (óleo puro *in natura* e pré-tratamento com Celluclast 700 U/g, figuras 1 e 2 respectivamente) não apresentaram significativa diferença.

Por meio dos fatores de retenção calculados, obtemos valores de R_f apresentados abaixo (tabela 6):

Tabela 6: Fatores de retenção obtidos pela revelação com iodo de placa de cromatografia em camada delgada do óleo essencial de *Cymbopogon citratus:in natura* e com aplicação de pré-tratamento com a enzima Celluclast 700 U/g à 0,1%.

Tratamento	Rf ₁	Rf ₂	Rf ₃
<i>In natura</i>	0,033	0,321	0,766
	Rf ₄	Rf ₅	Rf ₆
Celluclast	0,032	0,324	0,770

Fonte: Autor.

Esse resultado demonstrou viabilidade do processo, visto que outros autores indicam que não há variação na composição química do óleo que passou por procedimento semelhante. Em Santos (2008), os dados encontrados para cromatografia em camada delgada sugeriram que a utilização de enzimas na extração de óleos essenciais não alterou significativamente a composição dos mesmos, podendo ser utilizado para diversas aplicações.

Por meio do levantamento bibliográfico realizado, pode-se concluir que as pesquisas anteriores a esta também não demonstraram alterações na composição química dos óleos essenciais alisados após a extração com pré-tratamento enzimático. Conforme os estudos apresentados no trabalho de Sowbhagya, Srinivas e Krishnamurthy (2009), tem-se que a análise de cromatografia gasosa realizada não apresentou diferentes compostos para a amostra de óleo controle e as amostras pré-tratadas com enzima comercial. Da mesma forma, no trabalho de Reis (2015), a utilização dos extratos multienzimáticos nas concentrações avaliadas no trabalho não ocasionaram nenhuma alteração na composição química dos óleos extraídos, sendo estes analisados por meio de cromatografia gasosa. Da mesma forma que Reis (2015), Tavares (2012), em seu trabalho, mesmo com a utilização de altas concentrações de extrato bruto enzimático, não verificou nenhuma alteração na composição química dos óleos extraídos.

Neste trabalho, uma das possíveis causas para a análise de cromatografia em camada delgada das duas amostras de óleo essencial não tenham apresentado significativa diferença, pode estar relacionada com a concentração da enzima aplicada. Uma vez que, a concentração de Celluclast 700 U/g foi de 0,1%, sugere-se que trabalhos aplicando concentrações maiores de enzima possam ser realizados. Dessa forma, sendo possível realizar uma avaliação dos resultados por meio de comparação das concentrações aplicadas, e observar se os mesmos resultados esperados sejam encontrados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho, pode-se sobressaltar que a utilização da Celluclast, foi eficaz na extração do óleo essencial por meio de hidrodestilação, apesar do pré-tratamento realizado utilizar-se de uma quantidade relativamente pequena de enzima em comparação a quantidade de substrato.

Por meio das três análises realizadas, cromatografia em camada delgada, densidade e índice de refração, conclui-se previamente que a qualidade do óleo essencial *in natura* manteve-se após o pré-tratamento enzimático com Celluclast 700 U/g. Por meio do levantamento bibliográfico realizado, podemos concluir que as pesquisas anteriores a esta também não demonstraram alterações na composição química dos óleos essenciais analisados após a extração com pré-tratamento enzimático. Esse resultado demonstrou viabilidade do processo (SOWBHAGYA; SRINIVAS; KRISHNAMURTHY, 2009; SANTOS, 2008; TAVARES, 2012, REIS, 2015; CASSINI 2010).

Com este trabalho, pode-se observar que o pré-tratamento enzimático da biomassa, antes do processo de hidrodestilação para extração do óleo essencial de capim-limão, pode ser uma aplicação tecnologicamente viável para o aumento do rendimento de extração desse óleo. Entretanto, ainda devem ser feitas mais pesquisas em torno das variáveis do processo de pré-tratamento, como temperatura, pH, tempo de pré-tratamento e concentração de enzima aplicada.

Como sugestão para estudos futuros, tem-se a avaliação de maneira aprofundada dos aspectos variáveis do processo de pré-tratamento, que envolvem as condições acima tratadas. Da mesma forma, realizar avaliação com outras enzimas catalisadoras da celulose para como pré-tratamento da biomassa de capim-limão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Karla Nayara de et al. Viabilidade econômica de extração de óleo essencial de *Corymbia citriodora* em Gilbués – PI. **Nativa**, Sinop: v. 1, n 3, p. 175-179, jul./set. 2014.
- BASER, K. Hüsnü Can; BUCHBAUER, Gerhard. **Handbook of Essential Oils: Science, Tchnology, and Applications**. UEA: CRC Press, 2010.
- BIASI, Luiz Antônio et al. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, Brasília: v. 27, n. 1, jan./mar. 2009.
- BIZZO, Humberto R., HOVELL, Ana Maria C. e REZENDE, Claudia M.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Rio de Janeiro: 32 ed., n. 3, p. 588-594, 2009.
- BONATO, Pierina S., BRAGA, Gilberto L. e COLLINS, Carol H. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006.
- CASSINI, Juliane. **Utilização de enzimas para obtenção de óleos essenciais e cumarinas de casca de *Citrus latifolia* Tanaka**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2010.
- CHAMPE, Pamela C; HARVEY, Richard A. e FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª ed. São Paulo, SP: Editora Artmed, 2006.
- COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andréia Medeiros e RIBEIRO, Bernardo Dias. **Técologia Enzimática**. Petrópolis, RJ: Epub, 2008.
- CORRÊA, Ricardo M. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**. Brasília: vol. 23, n.4, p. 956-959, out-dez 2005.
- COSTA, Larissa C. do B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**. Brasília: v. 23, n. 4, p. 956-959, out/dez 2005.
- FALCÃO, Manuel Alvezs Falcão. **Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão e suas frações para produtos de higiene corporal**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifca Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, jan. 2012.
- FARINAS, Cristiane Sanchez. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos, SP: Embrapa - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, dez. 2011. 16 p. ISSN 1518-7179.

FRANCO, M., NASCIMENTO-JUNIOR, B. B. e TAVARES, M. C. Utilização de extrato enzimático bruto produzido a partir de resíduo agroindustrial na otimização da extração de óleo essencial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 37., out. 2015, São Carlos, SP. **Anais eletrônicos...** São Carlos, SP, ENEMP, out. 2015. Resumo. Disponível em:

<[http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-](http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/TC-727.pdf)

[1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/TC-727.pdf](http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/TC-727.pdf)>.

GOMES, Eliane Carneiro. Aspectos do cultivo e beneficiamento do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) no estado do Paraná, Brasil. **Revista Visão Acadêmica**. Curitiba, PR: v. 2, n. 1, p. 11-18, jan./jun. 2001.

GRANDI, Telma Sueli Mesquita. **Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014.

JOSE, Vera Lucia Age e OLIVEIRA, Sonia Maria Marques de. **Dossiê Técnico: Processos de extração de óleos essenciais**. Ibiúna, SP: set. 2007. 29 p.

LIMA, Rafaela K. *et al.* Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay (online)**. Lavras: 2008.

MISHRA, Dheeraj et al. Aqueous Enzymatic Extraction of Oil from Mandarin Peels. **Journal of Oleo Science**. Japan: v. 54, n 6, p. 355-359, 2005.

NETO, Francisco Radler de Aquino e NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

OLIVEIRA, Rinalda A. Guerra de et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, PB: 16 ed., n. 1, p. 77-82, jan./mar. 2006.

PADUAN, Rafael Henrique et al.. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função da sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, PB: vol. 19, n. 2, p. 436-441, abr./jun. 2009.

PICCOLI, R. H. *et al.* Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu: vol. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

PISTELLI, Edison Clayton e SILVA, Adriano Bortolotti. Descrição da metodologia do uso do Clevenger na extração de óleos vegetais. **Anais Eletrônicos SEMIC**. Alfenas: UNIFENAS, out. 2012.

QUALITY CONTROL METHODS FOR HERBAL MATERIAL. Geneva, Suíça: World Health Organization, 2011.

REIS, Nadabe dos Santos. **Aplicação de enzimas produzidas por *Aspergillus niger* na extração do óleo essencial de *Mentha arvensis***. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, mar. 2015.

SANGWAN, N. S. *et al.* **Regulation of essential oil production in plants**. Plant Growth Regulation 34: p. 3-21, 2001.

SANTOS, Alberdan Silva *et al.* **Descrição de Sistema de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Belém, PA: Embrapa, nov. 2004. 6 p. ISSN 1517-2244.

SANTOS, Emerson dos. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2008.

SCHERER, R. *et al.* Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, SP: v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILVA, Tânia Granzotti *et al.* Composição química do óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* L. e *Citrus aurantiun* L. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 7 out. 2013, Santarém, Pará. **Anais eletrônicos...** Santarém, Pará, UFOPA, out. 2013. Resumo. Disponível em: <http://www.sboe.net.br/viisboe/cd/Resumos/Resumo7SBOE_023.pdf>.

SOUSA, K. A. P *et al.* Extração e caracterização físico-química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 3 a 7 nov. 2014, Natal, Rio Grande do Norte. **Anais eletrônicos...** Natal, Rio Grande do Norte, UEMA, nov. 2014. Resumo. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/13/4817-16698.html>>.

SOWBHAGYA, H. B., SRINIVAS, P. and KRISCHNAMURTHY, N. Effect of enzymes on extraction of volatiles form celey seeds. **Food Chemistry**. Índia: vol. 120, pag. 230-234, 2009.

TAVARES, Iasnaia Maria de Carvalho. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewoides***. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2012.

TONGNUANCHAN. Phakawat e BENJAKUL, Soottawat. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Cience**. Vol. 79, n. 7, 2014.

WAN, Peter J. e WAKELYN, Phillip J.; **Technology an Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils**. Champaign: AOCSPress, 1997.