



Aplicação de biotecnologia na obtenção de óleos essenciais

Avaliação de fungo filamentososo do gênero *Trichoderma* visando a produção de enzimas celulolíticas para a extração de óleo essencial de alecrim

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN OBTAINING ESSENTIAL OILS EVALUATION OF TRICHODERMA FILAMENTOUS FUNGUS, THE PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES FOR ROSEMARY ESSENTIAL OIL EXTRACTION

Alexandre Henrique Gomes de Souza (orientado),

Viviane da Silva Lobo (orientador)

RESUMO

Os óleos essenciais (OE) são substâncias que fazem parte do metabolismo secundário das plantas, sendo armazenados em órgão secretores como tricomas e osmóforos, canais e bolsas. Podem ser obtidos a partir de diversas partes da planta como raízes, caules, sementes, gomos, folhas, frutos e flores, podendo variar dependendo da sua localização. Uma alternativa, que pode contribuir para o aumento do rendimento de OE, é a utilização de enzimas degradadoras do material celular vegetal. No processo, a função geral das enzimas específicas é de romper a parede celular, facilitando a saída dos OE existentes nos vacúolos e demais organelas, contribuindo assim, com o processo de extração, aumentando o rendimento da extração. Nesse contexto, o presente estudo, realizará uma coleta de solo para o isolamento de fungos filamentosos produtores de enzimas lignocelulolíticas, realizando fermentação submersa com bagaço de cana-de-açúcar produziu-se enzimas com potencial, no aumento de rendimento na extração de OE de alecrim. Os microrganismos foram isolados de acordo com as técnicas estabelecidas sendo obtido diversas variedades de fungos com características distintas e próximas do gênero *Trichoderma*. Um total de 15 fungos foram obtidos, sendo dois deles com características morfológicas iguais ao *Trichoderma*. Observou-se que com as enzimas obtidas no tempo de 96 horas foram obtidos os melhores resultados de rendimento de obtenção do óleo essencial de alecrim. Conclui-se que as enzimas obtiveram uma boa taxa de atividade enzimática de acordo com a literatura, mas ainda necessitaria de dados estatísticos para melhores análises das atividades, sendo que não foi utilizado neste tópico em questão.

Palavras-chave: Enzimas, óleos essenciais, fungos.

ABSTRACT

Essential oils (EO) are substances that are part of the secondary metabolism of plants, being stored in secretory organs such as trichomes and osmophores, channels and bags. They can be obtained from parts of the plant such as roots, stems, seeds, buds, leaves, fruits and flowers, and may vary depending on their location. An alternative, which can contribute to increase the EO yield, is the use of plant cell material degrading enzymes. In the process, the general function of the specific enzymes is to break the cell wall, facilitating the exit of EO existing in vacuoles and other organelles, thus contributing to the extraction process, increasing the extraction yield. In this context, the present study will carry out a soil collection for the isolation of filamentous fungi producing lignocellulolytic enzymes, performing submerged fermentation with sugarcane bagasse produced enzymes with potential to increase the yield in the extraction of EO from Rosemary. The microorganisms were isolated according to the established techniques, being obtained several varieties of fungi with distinct characteristics and similar to the *Trichoderma* genus. A total of 15 fungi were obtained, two of them with morphological characteristics equal to *Trichoderma*. It was observed that with the enzymes obtained in 96 hours, the best results of obtaining rosemary essential

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; alexandresouza@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo (Toledo); loboviviane@utfpr.edu.br



oil were obtained. It is concluded that the enzymes obtained a good rate of enzymatic activity according to the literature, but it would still need statistical data for better analysis of the activities, and it was not used in this topic in question.

Keywords: Enzymes, essential oils, fungi.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos para consumo humano derivados de meios sintéticos estão causando cada vez mais problemas relacionados à saúde humana, como o aumento do número de pessoas com câncer, problemas respiratórios, doenças da pele, enfraquecimento dos ossos, entre outros. Conseqüentemente, os produtos sintéticos estão se degradando mais rapidamente, gerando resistência microbiana, podendo ocasionar problemas de infecções generalizadas (MIRANDA, 2016).

Os óleos essenciais (OE) são substâncias que fazem parte do metabolismo secundário das plantas, sendo armazenados em órgão secretores como tricomas e osmóforos, canais e bolsas. Podem ser obtidos a partir de diversas partes da planta como raízes, caules, sementes, gomos, folhas, frutos e flores, podendo variar dependendo da sua localização. A quantidade e composição podem variar devido a fatores externos, entre os quais, condições de cultivo, colheita, armazenamento, método de extração, fatores ambientais, entre outros (FERREIRA, 2014).

Para obtenção dos OE, existem várias técnicas utilizadas pelas indústrias para a extração, como hidrodestilação, arraste por vapor de água, prensagem a frio, solventes orgânicos e fluido supercrítico. Essas técnicas se mostram eficazes na extração de OE, mas existem problemas quanto a quantidade extraída, sendo que necessitam quilogramas de plantas para se extrair mililitros de OE, sendo um rendimento muito baixo e tendo também outros fatores como perdas no processo e degradação de compostos (TAVARES; JUNIOR; FRANCO, 2015).

Uma alternativa, que pode contribuir para o aumento do rendimento de OE, é a utilização de enzimas degradadoras do material celular vegetal. No processo, a função geral das enzimas específicas rompe a parede celular, facilitando a saída dos OE existentes nos vacúolos e demais organelas, contribuindo assim, com o processo de extração, aumentando o rendimento da extração. Esse processo pode ainda, levar à utilização de métodos mais econômicos de extração e diminuindo impactos ambientais gerados com a utilização de resíduos agroindustriais sem valor para a obtenção das enzimas (TAVARES, 2012). Nesse contexto, o presente estudo pretende realizar uma coleta de solo para o isolamento de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, produtores de enzimas lignocelulolíticas, capazes de degradar a matéria celular vegetal, realizada através de cultivo com bagaço de cana-de-açúcar como substrato e análise de enzimas produzidas através de sua atividade enzimática e seu potencial no aumento de rendimento na extração de OE de alecrim.

2 MÉTODO (OU PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA)

2.1 Obtenção do microrganismo

Para a obtenção de fungos filamentosos degradadores da matéria vegetal foram analisadas amostras de solo recolhidas em uma região florestal da cidade de Toledo – PR, sendo obtidas três amostras de aproximadamente 100 g cada, a uma distância de 10 m entre as coletas para uma melhor variedade de microrganismos obtidos.

2.2 Isolamento e identificação de fungos do gênero *Trichoderma*

Para o processo de isolamento, utilizou-se a técnica clássica, de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com Clarck (1965) modificado, onde 25 g de solo foram acondicionados em erlenmeyer com 225 ml de água destilada estéril e 5 gotas de Tween 80.



As amostras foram agitadas em aparelho *Shaker* com agitação orbital (modelo Luca-222), durante 30 min a 150 rpm. Após a agitação, foram feitas diluições em 10^{-3} e 10^4 , posteriormente, plaqueadas em triplicata em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol sendo incubadas a 30 °C por 7 dias. Após o período de incubação, as amostras foram observadas quanto ao seu crescimento diverso e foram selecionados através de análises morfológicas.

As amostras foram purificadas através da introdução de uma pequena amostra do microrganismo no centro da placa contendo meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e incubado por 3 dias a 30 °C (SILVA; SOUZA, 2013).

Após a purificação, as colônias fúngicas foram transferidas para meio específico BDA (Ágar Batata Dextrose) em tubos de ensaio para identificação através de características macroscópicas (coloração, textura e diâmetro de colônia). As amostras de fungos foram selecionadas quanto à sua atividade enzimática e foram armazenadas em microtubos de 2 ml contendo água destilada estéril em geladeira convencional a 5 °C (CASTELLANI, 1939).

2.3 Fermentação em estado sólido (FES) em frascos Erlenmeyer

Para o processo de cultivo em estado sólido utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar, como substrato, cedido pela usina de açúcar e álcool de Santa Teresinha em Ivaté – PR. O resíduo foi seco em estufa a 55 °C por 5 dias e após, triturado em moinho de facas para obter-se uma maior área de contato da matéria vegetal celular. Foi acondicionado 5 g de bagaço triturado, juntamente com 10 ml de meio nutritivo descrito por MANDELS; WEBBER, 1969, sendo autoclavado a 120 °C por 20 min. O inóculo foi preparado com os fungos que apresentaram melhores resultados na secreção enzimática. O inóculo foi preparado utilizando meio líquido Sabouraud onde uma pequena fração de micélio de fungo crescido em meio sólido foi adicionado no meio líquido para crescimento em *Shaker* a 30 °C por 48 horas. Após o período de incubação 10% do volume do inóculo foi adicionado ao bagaço previamente esterilizado. O meio foi mantido incubado em agitadora *shaker* por 6 dias a 30 °C.

Após o período de crescimento em 48, 72, 96 e 120 h, foi realizada a extração enzimática com três frascos reacionais, adicionando 50 mL de água destilada estéril. Em seguida, com a utilização de uma mesa agitadora magnética, a mistura foi agitada a 180 rpm durante 60 min. Após o tempo de mistura, as amostras foram filtradas em bomba de vácuo com o auxílio de gaze para a retirada de partículas sólidas grandes e, então, foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante resultante foi armazenado em tubos Falcon em congelador a -10 °C (MUKHAMMADIEV et al., 2020).

2.4 Atividade enzimática de celulases totais (FPase)

Para a determinação da atividade FPase totais foram adicionados em 5 tubos de ensaio, tiras de papel filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm) em formato espiral juntamente com 2 ml de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 ml de extrato enzimático. A mistura foi agitada manualmente e aquecida em banho-maria a 50 °C por 60 min. Em seguida, 1 ml da solução resfriada a temperatura ambiente foi adicionada em tubos de ensaio contendo 1 ml de solução DNS. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min em banho-maria. Após resfriada a solução, 0,2 ml foram diluídos em 2,5 ml de água destilada, sendo, então, realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (GHOSE, 1987).

2.5 Extração de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) in natura e com extrato enzimático

Todas as amostras de alecrim foram coletadas na cidade de Toledo – PR. Após a coleta, foram armazenadas em sacos plástico para serem utilizadas no mesmo dia no laboratório. A extração de OE foi feita por hidrodestilação em aparelho *Clevenger* sendo realizada em ambos os sistemas para a planta pré-tratada com

enzimas e *in natura*, com 60 g de folhas de alecrim e 1 L de água destilada, sendo o tempo de processo de extração de 60 min. O tratamento enzimático foi realizado com a enzima que obteve melhor resultado de sua atividade. O tratamento foi realizado em balão de fundo redondo de 2 L, utilizando 60 g de substrato (folhas de alecrim), 1 L de água destilada e 0,25% de enzima em relação ao peso da amostra para cada extração. A mistura foi pré-tratada em banho-maria a 50 °C por 2 horas (REIS *et al*, 2015).

3 RESULTADOS

Os microrganismos foram isolados de acordo com as técnicas estabelecidas por Clark (1995), sendo obtido diversas variedades de fungos com características distintas e próximas do gênero *Trichoderma*. Um total de 15 fungos foram obtidos, sendo dois deles com características morfológicas iguais ao *Trichoderma* e apresentando algumas diferenças entre eles, como, coloração esverdeada distinta, formação de circunferências mais escuras, crescimento micelial afofado e áspero, e com a formação de esporos esbranquiçados como mostra a Fig. 1.

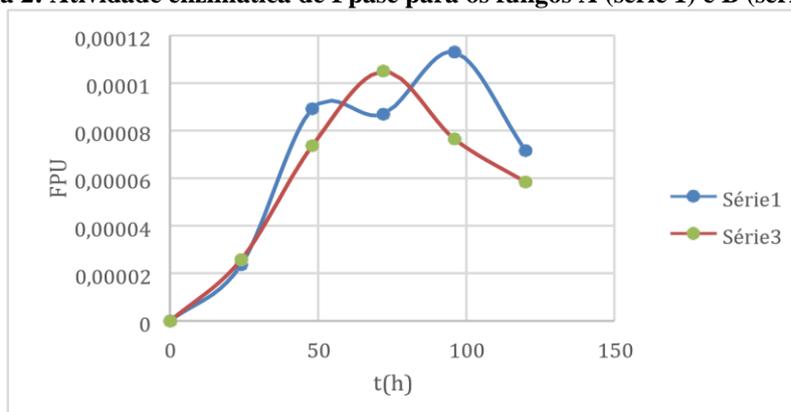
Figura 1: Fungos com características idênticas ao gênero *Trichoderma* acondicionado em placa de Petri com meio ágar batata dextrose



Fonte: “autoria própria” (2021).

Os resultados encontrados para a atividade enzimática de celulases totais encontram-se nas Fig. 2.

Figura 2: Atividade enzimática de Fpase para os fungos A (série 1) e B (série 2)



Fonte: “autoria própria” (2021)

A atividade enzimática de celulases observadas mostra que para os fungos utilizados, a maior atividade apresentada no gráfico, corresponde a um tempo de fermentação para o fungo A (série 1), com atividade de $1,13 \times 10^{-4}$ FPU, e para o fungo B (série 3), com tempo de fermentação de 72 horas teve o pico de atividade em $1,05 \times 10^{-4}$ FPU. Com a análise dos gráficos e comparando com a atividade FPase feita por VLAJKOV, 2020; obteve-se números baixos para atividade enzimática sendo que o autor utilizou como matéria prima o farelo de trigo e os fungos foram obtidos de um banco de cepas tendo melhor eficiência para



a degradação da celulose. Para a análise da extração de óleos essenciais, o rendimento é um dos fatores cruciais na obtenção dos óleos essenciais, sendo as enzimas celulolíticas uma alternativa para a obtenção de um rendimento maior. As enzimas utilizadas para essa análise foram o extrato obtido em 48 e 96 horas correspondentes aos resultados de atividade enzimática de FPase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tab. 1.

Tabela 1: Rendimento das extrações de óleo essencial de alecrim *in natura* e com enzimas fúngicas com o tempo de extração de 1 hora

	<i>In natura</i>	%Enzima bruta (48h)	Enzima bruta (96h)
		%	%
	0,606	0,712	0,751
	0,61	0,72	0,758
	0,608	0,715	0,756
Desvio padrão	0,002	0,00404	0,0036

Fonte: “autoria propria” (2021)

Observou-se que com as enzimas obtidas no tempo de 96 horas obtiveram melhores resultados de rendimento de obtenção do óleo essencial de alecrim. De acordo com SOUZA *et al* 2019; HOSNI *et al*, 2013; o rendimento obtido foi de 0,9% com o extrato bruto enzimático. As enzimas celulolíticas são capazes de extrair uma quantidade acima de 1% de OE em relação ao *in natura*, sendo que um dos problemas que podem ter interferido no rendimento seria a quantidade enzima utilizada que foi de 0,25% em relação a quantidade de planta utilizada, sendo necessário a utilização e pesquisa de altas porcentagens de enzima para um rendimento melhor.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que as enzimas obtiveram uma boa taxa de atividade enzimática de acordo com a literatura, mas ainda necessitaria de dados estatísticos para melhores análises das atividades, sendo que não foi utilizado neste tópico em questão. Nas extrações do OE obteve-se aumento no rendimento extraído, necessitando um pouco mais de estudos para adequar a quantidade de enzima a ser utilizada melhorando ainda mais o seu rendimento. De acordo com o estudo, o rendimento do OE com a utilização de enzimas obtidas por fungos pode sim trazer grandes benefícios para empresas do ramo, principalmente relacionados a custos com o processo e podendo ser benéfico para um maior público com o valor final.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo por me proporcionar os equipamentos básicos e o espaço para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço à Fundação Araucária que me auxiliou financeiramente com o benefício de uma bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

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 Agrônômica*, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan, 2016.
- FERREIRA, A. R. A. **Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos.** Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.
- TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido, a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial.** Dissertação de pós-graduação em engenharia de processos e alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2012.
- CLARK, F.E. **Agar-plate method for total microbial count.** *In Methods of soil analysis, Part 2.* Chemical and microbiological properties. (C.A. Blanc, D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark & R.C. Dinauer, eds.), p.1460-1466. Madson Inc., New York, 1965.
- SILVA, E. R.; SOUZA, A. S. **Introdução ao estudo da microbiologia: teoria e prática.** Editora IFB, ISBN 978-85-64124-22-6, p. 66, 2013.
- CASTELLANI, A. **The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water.** *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, May 1939.
- NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. **Cellulolytic fungi isolated from processed oats.** *Odessa*/ 512 pp. 2006.
- Mandels, M. and Weber, J. **The Production of Cellulases.** *Advances in Chemistry*, 95, 391413. 1965
- MUKHAMMADIEV, R. et al. **Chitinase production by Trichoderma viride in submerged state fermentation.** *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 578, n. 1, 2020.
- Ghose, T. K. "Measurement of cellulase activities" *Pure and Applied Chemistry*, vol. 59, no. 2, 1987,
- 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**, v. 27, p. 7-9, 1996.
- SOUZA, A.; LOBO, V.; SILVA A.; MANIGLIA T. *et al.* **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM RESÍDUOS AGRÍCOLAS E APLICABILIDADE NA EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.** In: ANAIS DO 13º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2019, Campinas. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2019. Disponível em: <<https://proceedings.science/slaca/slaca2019/papers/estudo-da-producao-de-enzimas-por-fungosfilamentosos-em-residuos-agricolas-eaplicabilidade-na-extracao-de-oleos-essenc>> Acesso em: 11 set. 2021.