

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Trichoderma reesei* E
Aspergillus niger NA EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

EMERSON DOS SANTOS

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Trichoderma reesei* E
Aspergillus niger NA EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

EMERSON DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP
2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S237u Santos, Emerson dos
Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais. / Emerson dos Santos. – Araraquara, 2008.
125 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

. 1.Extração enzimática. 2.Óleos essenciais. 3.Celulase. 4.Biotecnologia.
I.Pietro, Rosemeire C. L. R., orient. II. Título.

CDD: 660.6

CAPES: 40300005

A Deus pelo seu Amor, pela oportunidade desta existência, pela saúde,
sua presença e proteção em todos os momentos.

Ao meu pai Walter, com quem gostaria de compartilhar mais esta vitória.

À minha mãe Nilza e minha irmã Solange, pela compreensão na ausência, pelo
apoio, carinho e estímulo na distância.

À Daniela e Beatriz, um oferecimento especial, quando convivemos com a
distância e o trabalho, mas sem perder o carinho, o afeto e o amor.

“... hoje o céu está pesado, vem chegando o temporal
nuvens negras do passado, delirante flor do mal
cometemos o pecado de não saber perdoar
sempre olhando para o mesmo lado feito estátuas de sal

hoje o tempo escorre dos dedos das nossas mãos
ele não devolve o tempo perdido em vão
É um mensageiro das almas dos que virão ao mundo
depois de nós...”.

Carlos Maltz – Depois de Nós

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeire C. L. Rodrigues Pietro, pela amizade, orientação, estímulo e experiência.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pela colaboração em ceder a cepa industrial de *Aspergillus niger*.

Ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon pela colaboração em ceder a cepa Rut C-30 de *Trichoderma reesei* e auxílio com sua manifestação.

À Profa. Dra. Suraia Said pela atenção dispensada em seu laboratório e apoio aos ensaios pectinolíticos.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor S. Sacramento pela amizade e apoio durante todo o Mestrado.

À Profa. Dra. Raquel Regina D. Moreira pelo auxílio nos estudos fitoquímicos.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelo apoio nos estudos das atividades enzimáticas.

À Profa. Dra. Tais Bauab pela ajuda dispensada na qualificação.

À Profa. Dra. Ana Marisa F. Almeida pelo apoio nas investigações eletroforéticas.

Ao Prof. Dr. Bruno Mancini pela inspiração e modelo de dedicação à pesquisa.

Aos professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Aos funcionários e amigos Luís Eduardo, Angélica Chellegatti, Luciene, Nina, Osmar e Angélica Barretto pela prestativa ajuda e orientação em diversas vezes.

Ao amigo Antonio Marcos "Caçula" pelas sugestões e ajuda nos momentos críticos.

Aos colegas de trabalho e em especial aos integrantes dos laboratórios, pelo convívio acadêmico e lições aprendidas: José Ricardo, Tatiana, Viviana, Patrícia, Luiz Estêvão, Grace, Marcela, Carol Manzato, Henrique, Lara, Natália, Edvânio, Warley, Ariane, Silvine, Flávio e Filipe.

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Microrganismos utilizados	18
3.1.1 <i>Trichoderma</i>	18
3.1.2 <i>Aspergillus</i>	20
3.2 A morfologia de fungos filamentosos durante o crescimento	21
3.3 Parede celular vegetal	24
3.3.1 Componentes das paredes celulares vegetais	28
3.4 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal	32
3.4.1 Hidrólise enzimática	32
3.4.2 Celulases	33
3.4.3 Hemicelulases	36
3.4.4 Pectinases	37
3.5 Processos fermentativos para produção de enzimas	39
3.5.1 Biorreatores	39
3.6 Plantas utilizadas	41
3.6.1 <i>Melampodium divaricatum</i>	41
3.6.2 <i>Mentha spicata</i>	42
3.7 Óleos essenciais	43
3.7.1 Análises cromatográficas de óleos essenciais	46
3.7.1.1 Cromatografia em camada delgada	46
3.7.1.2 Cromatografia em fase gasosa	47
3.7.2 Métodos de extração de óleos essenciais	48
3.7.2.1 Hidrodestilação	48
3.8 Extração aquoso enzimática de óleos vegetais	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Projeto e construção de biorreator	52
4.2 Microrganismos	54
4.3 Manutenção das cepas	55
4.4 Obtenção do inóculo	55
4.5 Determinação dos meios de cultura para produção de enzimas	56
4.5.1 Meios de cultura para <i>T. reesei</i>	56
4.5.2 Meios de cultura para <i>A. niger</i>	57
4.6 Recuperação do extrato enzimático bruto	57
4.7 Análise físico-química e microbiológica do EEB	58
4.8 Precipitação das proteínas	58
4.9 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry	58
4.10 Determinação do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante	59
4.10.1 Revelação do gel pela prata	60
4.11 Preparação da celulase utilizada como padrão	60
4.12 Determinação dos açúcares redutores	60
4.12.1 Determinação do coeficiente de extinção molar	61
4.13 Determinação da atividade de Celulase total	61
4.14 Determinação da atividade de Endoglucanase	62
4.15 Determinação da atividade de β -glicosidase	63
4.16 Determinação da atividade de Xilanase	63
4.17 Determinação da atividade de Poligalacturonase	64
4.18 Determinação da atividade de Pectinase	64
4.19 Determinação das condições ideais de cultivo dos microrganismos	65
4.19.1 Determinação do pH	65

4.19.2 Determinação da temperatura	66
4.19.3 Determinação da velocidade de agitação	66
4.19.4 Determinação da taxa de aeração	66
4.20 Análise microbiológica do extrato enzimático	66
4.21 Preparação da Celulase obtida comercialmente	67
4.22 Análise da termoestabilidade das enzimas	67
4.23 Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática	67
4.24 Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos	68
4.25 Aplicação das enzimas na extração dos óleos essenciais	68
4.26 Determinação do rendimento de óleo produzido	68
4.26.1 Tratamento enzimático do material vegetal	69
4.26.2 Extração do óleo essencial	69
4.27 Análises cromatográficas dos óleos	70
4.27.1 Cromatografia em camada delgada	70
4.27.2 Cromatografia em fase gasosa	70
4.27.2.1 Quantificação e Identificação	71
4.28 Análise estatística	71
5 RESULTADOS	72
5.1. Comparação da produção enzimática em Erlenmeyer e Biorreator	72
5.2 Estabelecimento das condições de produção enzimática	72
5.2.1 Curvas de crescimento de <i>T. reesei</i> QM9414 e Rut C-30	72
5.2.2 Condições de cultivo para a produção de enzimas por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> QM 9414 e Rut C-30	74
5.3 Condições ideais para produção enzimática em biorreator	77
5.4 Análise do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do filtrado de cultura	79
5.5 Análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos do EEB	80
5.6 Efeito de íons e outras substâncias sobre atividade enzimática	81
5.7 Análise da termoestabilidade das enzimas	83
5.8 Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos	85
5.9 Extração enzimática de óleos essenciais	86
5.10 Análise cromatográfica do óleo essencial	87
5.10.1 Análise dos óleos essenciais de <i>M. divaricatum</i> e <i>M. spicata</i> por CG/EM	87
5.10.2 Análise cromatográfica (CCD) do óleo de <i>M. spicata</i> e <i>M. divaricatum</i>	90
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÕES	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
9. ANEXOS	122

Lista de Abreviaturas e Siglas

AE	Atividade Enzimática
ATCC	"American Type Culture Collection"
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massa
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EEB	Extrato Enzimático Bruto ou Não Purificado
FES	Fermentação em Estado sólido
FPA	"Filter Paper Activity" – Atividade de Celulase Total
FS	Fermentação Submersa
PDA	"Potato Dextrose Agar" – Meio Agar Batata Dextrose
Rf	Fator de Retenção
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS_PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
UI	Unidade Internacional
USP	United States Pharmacopeia
Vvm	Volume de ar por volume de líquido por minuto
ϵ	Coeficiente de Extinção Molar

Lista de Figuras

Figura		pg
1	A genealogia de diferentes mutantes isolados altamente produtores de celulase	19
2	Estrutura da Parede Celular Vegetal	27
3	Parede celular primária	29
4	Estrutura química dos principais constituintes da parede celular vegetal	31
5	Mecanismo de ação do complexo celulolítico	34
6	Degradação da celulose e da hemicelulose	38
7	Biorreator de tanque agitado piloto, equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo	40
8	Acessórios utilizados na construção de um biorreator	40
9	<i>Melampodium divaricatum</i> (Rich. In Pers.) DC .Asteraceae.	42
10	<i>Mentha spicata</i> L., Lamiaceae	43
11	Aparelhos secretores de óleos essenciais	44
12	Sistema de Clevenger modificado	49
13	Fluxograma da parte experimental	52
14	Visão superior do biorreator	53
15	Tipo de pá utilizada no biorreator.	53
16	Sistema completo do biorreator	54
17	Microrganismos crescidos em PDA após 7 dias a 28º C.	55
18	Comparação da produção enzimática de <i>T. reesei</i> QM 9414 em Erlenmeyer em agitador orbital e em Biorreator após 7 dias de incubação	73
19	Crescimento microbiano de <i>T. reesei</i> QM9414	73
20	Crescimento microbiano de <i>T. reesei</i> Rut C-30	74
21	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de <i>T. reesei</i> QM 9414 após 7 dias de incubação.	75

22	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de <i>T. reesei</i> Rut C-30 após 7	75
23	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática por <i>A. niger</i> após 7 dias de incubação	76
24	Visão microscópica dos fungos após 7 dias de incubação	76
25	Efeito do pH na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30, após 7 dias de incubação	77
26	Efeito da temperatura na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30, após 7 dias de incubação	78
27	Efeito da velocidade de agitação na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30, após 7 dias de incubação	78
28	Efeito da taxa de aeração na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30, após 7 dias de incubação	79
29	Perfil protéico da eletroforese do extrato enzimático bruto obtido de <i>T. reesei</i> Rut C-30	80
30	Termoestabilidade da enzima celulase produzida por <i>T. reesei</i> QM 9414 em biorreator após 7 dias de incubação	84
31	Termoestabilidade da enzima celulase produzida por <i>T. reesei</i> Rut C-30 em biorreator após 7 dias de incubação.	84
32	Termoestabilidade da enzima celulase obtida comercialmente	85
33	CCD dos óleos essenciais de <i>M. divaricatum</i> e <i>M. spicata</i> com e sem tratamento enzimático.	90

Lista de Tabelas

Tabela		pg
1	Principais componentes da parede celular vegetal	26
2	Resultados obtidos na extração aquosa enzimática de óleos vegetais	51
3	Meios de cultura para produção de enzimas do complexo celulolíticas por <i>T. reesei</i>	56
4	Meios de cultura para produção de enzimas estudadas por <i>A. niger</i>	57
5	Gel de separação a 12%	59
6	Gel de empilhamento a 12%	60
7	pH e contaminação microbiana do EEB após 7 dias de incubação em biorreator.	80
8	Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de celulase total produzida por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.	82
9	Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de xilanase produzida por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.	82
10	Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.	83
11	Máxima produção das enzimas celulase, xilanase e pectinase produzidas por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> Rut C-30 em biorreator após 7 dias de incubação nas condições ideais.	85
12	Concentração de enzimas, volume de EEB e aumento do rendimento de óleo essencial de <i>Mentha spicata</i> .	86
13	Aumento do rendimento de óleo essencial de <i>M. divaricatum</i> após 1h de tratamento enzimático.	86
14	Aumento do rendimento de óleo essencial de <i>M. spicata</i> após 1h de tratamento enzimático.	87
15	Concentração (%) dos compostos identificados no CG/EM do óleo essencial de <i>M. spicata</i> de amostras secas e frescas com e sem tratamento enzimático	88

16	Concentração (%) dos compostos identificados no CG/EM do óleo essencial de <i>M. divaricatum</i> de amostras secas e frescas com e sem tratamento enzimático	89
17	Comparação da produção enzimática de <i>T. reesei</i> QM 9414 em Erlenmeyer em agitador orbital e em Biorreator	122
18	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de <i>T. reesei</i> QM 9414	122
19	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de <i>T. reesei</i> Rut C-30	122
20	Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de <i>A. niger</i>	123
21	Efeito do pH na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30	123
22	Efeito da temperatura na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30	123
23	Efeito da velocidade de agitação na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30	124
24	Efeito da taxa de aeração na produção enzimática em biorreator por <i>T. reesei</i> Rut C-30	124
25	Termoestabilidade da enzima celulase produzida por <i>T. reesei</i> QM 9414 e Rut C-30 em biorreator após 7 dias de incubação e da obtida comercialmente (C8546-10KU, Sigma®)	125

RESUMO

O uso e produção de enzimas têm se tornado uma das áreas de maior interesse da indústria biotecnológica. As enzimas obtidas de microrganismos por processos fermentativos têm sido amplamente pesquisadas e utilizadas em todo mundo. A aplicação de enzimas na extração de óleos é uma alternativa consistente aos processos convencionais, por se tratar de um processo que consome menor energia, melhora a qualidade de vários produtos como, por exemplo, o óleo de oliva, e causa um mínimo de impacto ambiental. Para realizar a extração do óleo, que se encontra nos vacúolos intracelulares, há a necessidade do rompimento das paredes e membranas celulares. Os tratamentos mecânico e térmico causam a ruptura das estruturas celulares, porém, não são suficientes, já que parte do óleo permanece na célula, sem ser extraído. Para aumentar o rendimento no processo de extração do óleo se faz necessário a utilização de um complexo multienzimático que irá atuar sobre os componentes da parede, facilitando a sua liberação. O objetivo deste trabalho foi utilizar uma mistura de enzimas contendo celulasas, xilanases e pectinases produzidas por microrganismos para extração de óleos essenciais de plantas. As enzimas foram produzidas pelos fungos *T. reesei* Rut C-30 e *Aspergillus niger*, em processo fermentativo incubado em biorreator de 10 L. A composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo, foram estabelecidas a fim de se obter maior produção de enzimas. A produção de enzimas em biorreator para a linhagem Rut C-30 de *T. reesei* mostrou os melhores níveis em pH 4,0, temperatura de 28° C, agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm, obtendo uma produção de 2,01 U/mg, 1,79 U/mg e 0,2 U/mg de celulase, xilanase e pectinase, respectivamente. A produção utilizando *A. niger* apresentou melhores níveis enzimáticos nas mesmas condições usadas para *T. reesei* e foram: 1,21 U/mg, 2,96 U/mg e 4,2 U/mg de celulase, xilanase e petininase, respectivamente. *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) e *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) foram submetidas ao tratamento com o complexo enzimático e seus óleos extraídos por hidrodestilação, utilizando-se aparelho Clevenger. Os resultados obtidos mostraram aumento médio de 60% no rendimento do óleo.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, celulase, xilanase, pectinase, extração enzimática, óleos essenciais.

ABSTRACT

The use and production of enzyme have become one of the areas of great interest of the biotechnological industry. The enzymes produced by microorganisms in fermentation processes have been widely searched and used in the world. The enzyme application in the oil extraction is a consistent alternative to the conventional processes, because represents a process that consumes less energy, improves the quality of some products as, for example, the olive oil, and cause a minimum of environmental impact. To perform the extraction of the oil, which is found in the intracellular vacuoles, it is necessary break the cellular and membranes walls. The mechanical and thermal treatments cause the rupture of the cellular structures, however, they are not enough, since part of the oil remains in the cell, without be extracted. To increase the yield in the process of oil extraction is necessary to use a multienzymatic complex that will act on the components of the wall, facilitating its release. The objective of this work was to utilize a enzyme mixture containing cellulases, xylanases and pectinases produced by microorganisms to extract plants essential oils. The enzymes had been produced by the microorganisms *Trichoderma reesei* QM9414 and *T. reesei* Rut C-30 and *Aspergillus niger*, in fermentative process incubated in a 10L bioreactor. The composition of the culture medium, and the culture conditions were established in order to obtain higher level of enzyme production. The enzyme production in bioreactor by *T. reesei* Rut C-30 showed the best levels in pH 4.0, temperature of 28° C, agitation of 400 rpm and tax of aeration of 1,5 vvm, and obtaining production of 2.01 U/mg, 1.79 U/mg and 0.2 U/mg of cellulase, xylanase and pectinase, respectively. The production using *A. niger* showed the best leves at the same conditions used to *T. reesei* and the were: 1.21 U/mg, 2.96 U/mg and 4.2 U/mg of cellulase, xylanase and pectinase, respectively. *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) and *Mentha spicata* L., (Lamiaceae), were submitted to the treatment with the enzymatic extract and its oil extracted by hydrodistillation in Clevenger apparatus. The results obtained showed a average increase of 60% in the yield of the oil.

Key-words: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, cellulase, xylanase, pectinase, enzymatic extraction, essential oils.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, como a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos, devido à irreversível tendência de prevalência das políticas ambientais (COELHO, 2001). Enzimas, por serem catalisadores orgânicos responsáveis por muitas reações bioquímicas envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos, são utilizadas em alimentos, na agricultura, nas indústrias de papel e celulose, têxtil e na produção de rações animais (COELHO, 1993; CUNHA, 1999). Na indústria farmacêutica, que representa hoje um dos maiores produtores e usuários de enzimas, apresentam finalidades diversas que vão desde a produção de medicamentos, desenvolvimento de novos produtos e diagnósticos clínicos até sua utilização em terapia (SAID e PIETRO, 2004). O mercado mundial da tecnologia enzimática estima movimentar em 2009 cerca de 5,1 bilhões de dólares (FOODNAVIGATOR, 2007).

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas celulolíticas (NOVO NORDISK, 1996; MENEZES, 1997) e os principais produtores de celulasas e hemicelulasas incluem o *Trichoderma reesei* e *Aspergillus* sp (BHAT, 2000). *Aspergillus niger* é utilizado para a produção industrial das enzimas pectinolíticas (NAIDU e PANDA, 1998).

O custo de produção de uma enzima depende de múltiplos fatores, como a quantidade e o processo de produção e recuperação, assim como o estado de pureza em que esta é vendida. Quanto mais purificada uma enzima estiver, mais cara ela será (SAID e PIETRO 2004). A utilização de enzimas não purificadas pode ser uma alternativa economicamente viável quanto à aplicações de enzimas em processos e produtos.

Óleos essenciais constituem um grupo importante dos produtos econômicos de origem vegetal (MARTINS, 2002). A produção de óleos essenciais nas plantas está geralmente associada à presença de estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, ductos de óleos ou resinas que contêm grande variedade de terpenos, considerados os sítios primários de acúmulos desse material (FAHN, 1979). A degradação dos compostos polissacarídicos da parede celular vegetal é um processo complexo que envolve a

ação sinérgica de um grande número de enzimas do complexo celulolítico (ARO et al., 2004).

A extração enzimática de óleos vegetais, principalmente para aumentar o rendimento de obtenção de óleo, fornece resultados promissores quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos (GOMES, 2002). Por exemplo, elimina o consumo de solvente, resultando em uma diminuição no consumo de energia e, conseqüentemente, no custo da extração (BARRIOS, 1990).

Uma vez facilitada a ruptura da parede celular, nesse caso utilizando enzimas específicas, o processo de extração torna-se facilitado, ocasionando um aumento na velocidade e no rendimento, e ainda tornando possível o uso de métodos de extração mais econômicos e menos nocivos ao meio ambiente (SKRUBS, 1982).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi produzir e utilizar as enzimas celulasas, xilanases e pectinases não purificadas, para aumentar o rendimento da extração de óleos essenciais.

2.2 Objetivos Específicos

- Adequação dos meios de cultura e das condições favoráveis ao cultivo dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* em biorreator, visando, a um menor custo, a máxima produção das enzimas em estudo.
- Recuperação das enzimas produzidas para posteriores análises e aplicações.
- Determinação das atividades enzimáticas específicas.
- Aplicação das enzimas em estado bruto na extração de óleos essenciais utilizando *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* como modelos
- Quantificação e avaliação físico-química dos óleos após tratamento enzimático.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microrganismos utilizados

Fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos heterotróficos. Caracterizam-se por formarem um micélio, que é um conjunto de estruturas filamentosas denominadas hifas. A reprodução normalmente, ocorre por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (LIMA, 1975).

3.1.1 *Trichoderma*

Nos anos 1800, o gênero *Trichoderma* foi introduzido como um novo grupo taxonômico para incluir quatro espécies de fungos, entre as quais *T. viride*. Durante a Segunda Guerra Mundial, um programa de pesquisa do exército norte-americano, preocupado com a rápida deterioração do material que compunha as barracas de campanha do exército em regiões tropicais, identificou o fungo *Trichoderma "viride"* QM6a, que produz grandes quantidades de enzimas celulolíticas extracelulares, como o responsável pelo problema. Posteriores pesquisas determinaram que se tratava de uma nova espécie de fungo do gênero *Trichoderma*, a qual foi denominada *T. reesei*, em memória a Elwyn T. Reese, um dos principais pesquisadores daquele programa. Reese, em colaboração com Mary Mandels, realizou pesquisas sobre a biossíntese, estrutura e mecanismos de degradação da celulose e outros polissacarídeos por este fungo (REESE e MANDELS, 1980; GAMS et al., 1998).

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos, mesofílicos (30° C), que normalmente habitam o solo. Juntamente com *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, o gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico (SAMUELS, 1996).

T. reesei apresenta hifas septadas, ramificadas (de 5 a 10 µm de diâmetro), polinucleadas, de núcleo haplóide, que formam colônias brancas de rápido crescimento, formando almofadas verdes ou amarelas de filamentos de esporulação. Os filamentos férteis, conidióforos, produzem fileiras laterais de

pequenas fiálides. Os esporos (conídios, geralmente de cor verde e de 3 a 5 µm de diâmetro) são produzidos sucessivamente no extremo da fiálide e agrupados em pequenas massas (GAMS et al., 1998).

O gênero *Trichoderma* está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solos e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matérias orgânicas. Muitas espécies do gênero são também encontradas na rizosfera de muitas plantas. O fato das espécies do gênero se desenvolverem em um amplo espectro de substratos e condições ambientais, torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO e SILVA, 1998).

As espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992), sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (Figura 1). O gênero é caracteristicamente reconhecido pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (BÉGUIN, 1990). Em particular, *T. reesei* se destaca por sua grande capacidade de produzir e secretar um sistema multienzimático, facilmente induzido, de enzimas celulolíticas (EVELEIGH, 1985).

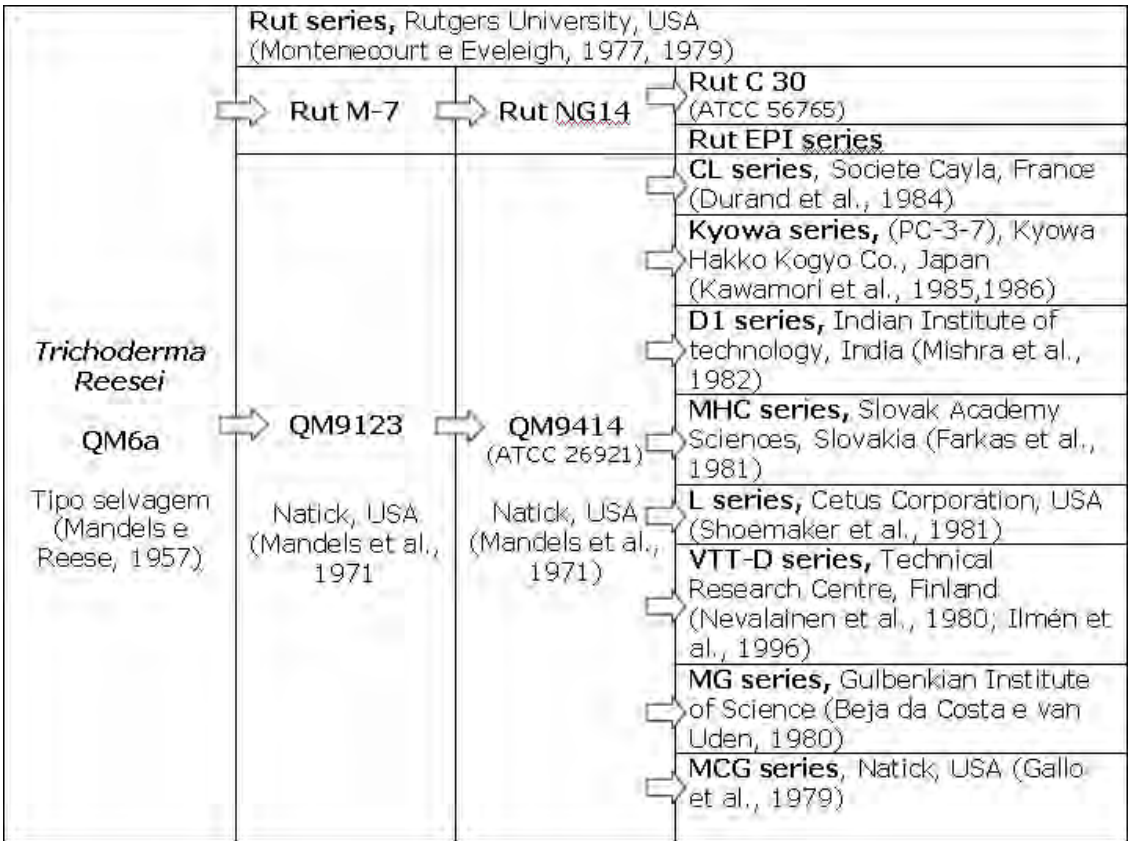


Figura 1: A genealogia de diferentes mutantes isolados altamente produtores de celulase. Fonte: XIONG, 2004.

3.1.2 *Aspergillus*

Membros do gênero *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus niger*, são distribuídos por todo mundo e estão comumente presentes em materiais de decaimento de plantas. São caracterizados por cabeças conidiais escuras, geralmente negras e conidióforos hialinos a marrom, com cabeças globosas. O conidióforo apresenta cabeça conidial radiada, com métulas e fiálides ou somente fiálides. Conídios escuros unicelulares, globosos, medindo 4-5 µm de diâmetro (ABARCA et al, 1994). Estes saprófitos degradam moléculas complexas nos materiais derivados de células vegetais por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (DE VRIES e VISSER, 2001). *A. niger* cresce em material orgânico em ampla escala de temperatura de 6 a 47° C, e pH, 1,4-9,8 (SCHUSTER et al, 2002) e o limite de crescimento para atividade de água é 0,88, que é relativamente alto quando comparado a outras espécies de *Aspergillus* (RIPPEL-BALDES, 1955). Este organismo pode produzir enzimas que são ativas em diversas condições ambientais como as pectinases, proteases e amiloglicosidase que foram as primeiras a serem exploradas e originalmente produzidas em culturas de superfícies (FROST E MOSS, 1987). Somente após meados de 1950, teve início os processos de fermentação em tanques agitados. Várias enzimas adicionais como celulase e hemicelulase foram produzidas usando cepas de *Aspergillus* em tais processos (BARBESGAARD et al, 1992).

Aspergillus niger é um bom produtor de várias enzimas tais como pectinesterase, endo e exopoligalaturonase, pectina liase (GRASSIN e FAUGUEMBERGUE, 1999), glicose oxidase e catalase (BERKA et al, 1992) e tem sido reportado a produção de 20g/L de glicoamilase (FINKELSTIN, 1987).

Muitas das enzimas produzidas por este organismo têm aplicações nas indústrias de alimentos, bebidas, têxtil, agricultura, polpa e papel (DE VRIES, 2003). *A.niger* é amplamente usado na manufatura de ácidos orgânicos incluindo os ácidos cítrico, glucônico e fumárico (BAYRAKTAR e MEHMETOGLU, 2000; ROUKAS, 2000). Atualmente ácido cítrico é quase que exclusivamente produzido por *A. niger*, embora aspectos do mesmo não sejam completamente elucidados (KARAFFA e KUBICEK, 2003).

Pelo conjunto de características, o ácido cítrico e várias enzimas produzidas por *A. niger* tem sido relatados como "considerado geralmente

seguro” (GRAS – “generally regarded as safe”) pelo FDA (“United States Food and Drug Administration”), podendo, portanto ter seu uso com segurança para aplicações em alimentos e agroindústria (SCHUSTER et al, 2002). *A. niger* tem longa história de uso para propósitos industriais e a capacidade de produzir proteínas nativas eficientemente tem tornado este organismo um hospedeiro atrativo para produção de proteínas heterólogas (YOKOYAMA et al, 2001). A produção comercial de proteínas heterólogas iniciou com a produção de quimo sina bovina em *A. niger* (DUNN-COLEMAN et al, 1991) tendo recebido aprovação do FDA para aplicação da mesma na manufatura de queijo. Subseqüentemente foi usado como hospedeiro para a expressão de níveis comercialmente viáveis de muitas proteínas heterólogas incluindo a citocina humana interceucila-6 (IL-6) (BROEKHUIJSEN et al, 1993), manganês peroxidase (*MnP*) de *Phanerochaete chrysosporium* (PUNT et al, 2002), α -amilase de cevada (JUGE et al, 1998), profosfolipase A2 pancreática de suíno (proPLA2) (ROBERTS, 1992) e imunoglobulinas humanas corretamente dobradas (WARD et al, 2004). *A. niger* é atualmente um dos mais importantes organismos usados em Biotecnologia. No banco de dados GenBank encontram-se disponíveis várias entradas de seqüências genômicas de DNA e mRNA, representando mais de 1528 genes codificando 1491 proteínas (GenBank databases, 2008).

3.2 A morfologia de fungos filamentosos durante o crescimento

O crescimento de fungos filamentosos pode ocorrer na forma de “pellets”, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma livre, com as hifas dispersas pelo meio de cultura. WHITAKER e LONG, 1973, publicaram uma revisão bibliográfica mostrando os principais aspectos da formação de “pellets” e as suas características. Segundo esses autores, a estrutura do “pellet” é composta por três regiões: a) a periferia, composta por células mais jovens e que, efetivamente, reproduzem-se; b) a camada intermediária, composta por células mais velhas; c) o núcleo ou “core”, composto por esporos e células não viáveis, as quais podem sofrer lise, dando origem a “pellets” ocos (“hollow pellets”).

A estrutura dos “pellets” também é variável. As hifas podem estar arranjadas soltas ou fortemente compactadas, formando “pellets” com a

superfície lisa ("smooth pellets") ou "pellets" hirsutos ou "cabeludos" ("hairy pellets"). De acordo com VECHT-LIFSHITZ *et al.*, 1990, a formação de "pellets" pode ser de dois tipos: coagulativo ou não-coagulativo. Em *Penicillium*, os "pellets" são do tipo não-coagulativo, onde um "pellet" é produzido a partir de um único esporo. No caso de *Aspergillus*, o "pellet" é do tipo coagulativo, formando-se a partir de um aglomerado de esporos. Neste tipo de "pellet" ocorre uma aglutinação de esporos nos estágios iniciais da germinação, de onde as hifas começam a se ramificar e emaranhar, formando o "pellet".

Os fatores que influenciam na morfologia e produção de enzimas foram citados por WHITAKER e LONG, 1973, e por METZ e KOSSEN, 1977. Entre esses fatores, podem ser destacados:

a) A espécie e a linhagem do fungo: nem todas as espécies crescem na forma de "pellets". Entre os fungos formadores de "pellets" estão *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, entre outros (WHITAKER e LONG, 1973).

b) Meio de cultura: a composição do meio influencia na formação e estrutura dos "pellets", principalmente a presença de micronutrientes. Por exemplo, a utilização de um meio de cultura contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio levou à formação de "pellets" em *Penicillium chrysogenum*, ao passo que a utilização de água de maceração de milho ("corn steep liquor") levou a um crescimento na forma filamentosa (PIRT e CALLOW, 1959). BYRNE e WARD, 1989, estudaram o efeito de nutrientes na formação de "pellets" em *Rhizopus arrhizus*, mostrando que baixas concentrações de peptona no meio de cultura conduziam à formação de "pellets" e altas concentrações de peptona produziam um crescimento na forma filamentosa.

Na maioria dos estudos de produção de celulase por *Trichoderma*, materiais celulolíticos, como celulose e carboximetilcelulose, foram usados como substrato para o crescimento do fungo. No geral, a lactose é usada como fonte de carbono e indutor da produção de enzimas industriais, especialmente a celulase, no *T. reesei* (OLSSON *et al.*, 2003). A fonte de nitrogênio mais indicada para o cultivo de *T. reesei* é o sulfato de amônio. O Nitrato ou uréia não são apropriados para a produção de pectinases (LIECKFELDT *et al.*, 2000).

Além das fontes do carbono e do nitrogênio, diversos outros fatores devem ser considerados para se obter as melhores condições de cultivo. As mudanças morfológicas e fisiológicas do *T. reesei* influenciam a produção de enzimas (MCINTYRE, 1998). Relatou-se que somente o segundo estágio fúngico

do *Trichoderma* pode produzir enzimas e o micélio preliminar não secreta enzimas eficientemente (VELKOVSKA et al., 1997). Alguns íons metálicos e surfactantes são essenciais para a produção de enzimas do complexo celulolítico por *Trichoderma*: KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (STERNBERG e MANDELS, 1979).

c) Agitação: a agitação atua na dispersão de aglomerados de esporos. De uma maneira geral, uma frequência de agitação alta favorece a dispersão de esporos e conduz a um crescimento na forma filamentosa, enquanto que uma frequência de agitação baixa conduz a um crescimento na forma de "pellets", devido à aglomeração de esporos (MITARD e RIBA, 1988). GÓMEZ et al. 1988, cultivando *Aspergillus niger*, obtiveram a formação de "pellets" utilizando altas frequências de agitação (1000 rpm). Esse resultado contraditório foi criticado por TRÄGER et al. (1989), que obtiveram, em fermentador, um crescimento na forma filamentosa com agitação de 600 rpm e utilizaram um fermentador "airlift" para a obtenção de "pellets" na produção de ácido glucônico por *Aspergillus niger*. A utilização de fermentadores do tipo "airlift" favorece a formação de "pellets" devido ao cisalhamento baixo. Outro efeito da frequência de agitação é a fragmentação de hifas e a ruptura de "pellets". Esse fato foi estudado por SMITH et al. (1990) em um processo de produção de penicilina. Nos cultivos com alta frequência de agitação (1000 e 1200 rpm) houve maior rompimento das hifas devido ao alto cisalhamento, formando hifas mais curtas e menos ramificadas do que nos cultivos a 800 rpm e conduzindo, também, a uma velocidade de produção de penicilina menor. Da mesma forma, BELMAR-BEINY e THOMAS (1991) utilizaram a técnica de análise de imagens para determinar a influência da agitação na fragmentação de hifas.

d) pH: o pH do meio de cultura atua na alteração das propriedades eletrostáticas da superfície dos esporos. Um pH baixo (entre 2 e 3) conduz a uma dispersão de esporos e a um crescimento na forma filamentosa. Um pH mais alto (entre 5 e 6) conduz a uma aglomeração de esporos e à formação de "pellets" (WAINWRIGHT et al., 1993). pH é um parâmetro importante na produção de enzimas por *T. reesei*. Boa produção de celulasas por *T. reesei* foi encontrada em pH abaixo de 4.0 (XIONG, 2004).

e) Oxigênio dissolvido: a utilização de uma vazão específica de aeração de 0,25 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) conduziu a um crescimento na forma de "pellets", em cultivo de *Morchella hortensis*, enquanto o

aumento da aeração para 0,75 vvm levou a um crescimento na forma filamentosa (WHITAKER e ONG, 1973). Aumento das atividades de xilanases foram encontradas quando as taxas de aeração foram variadas de 0,5 a 1,5 vvm (HOQ et al, 1994).

f) Tamanho de inóculo: uma alta concentração de esporos no inóculo resulta em um crescimento na forma filamentosa, ao passo que uma baixa concentração de esporos no inóculo provoca a formação de "pellets" (FOSTER, 1949).

g) Agentes tensoativos: a presença de agentes tensoativos no meio de cultura diminui a aglomeração de esporos e hifas, resultando em um crescimento na forma filamentosa (METZ e KOSSEN, 1977). Tween-80 é benéfico para a secreção de enzimas na concentração de 0.2 mL/L, quando uma concentração mais elevada pode ser prejudicial para a produção de celulasas por *T. reesei* (PANDA et al., 1987).

3.3 Parede celular vegetal

Em todas as paredes celulares vegetais existem duas camadas: a lamela média (substância intercelular) e a parede primária. Inúmeras células depositam uma camada parietal adicional, a parede secundária. A lamela média situa-se entre as paredes primárias de células adjacentes e a parede secundária, se presente, sendo depositada pelo protoplasto sobre a superfície interna na parede primária (Figura 2) (RAVEN et al., 1976).

A lamela média compõe-se principalmente de substância pécticas (Tabela 1) e freqüentemente é difícil distingui-la da parede primária, principalmente nas células que formam paredes secundárias grossas (RAVEN et al., 1976).

A camada parietal depositada antes e durante o crescimento da célula chama-se parede primária. Muitas células são formadas única e exclusivamente pela parede primária. Esta camada, além da celulose, contém hemicelulose, pectina (Figura 2) e proteínas ricas em hidroxiprolina. Células em divisão ativa comumente contêm apenas paredes primárias, assim como a maioria das células maduras que realizam processos como fotossíntese, respiração e secreção. As paredes primárias, de um modo geral, não são uniformes na espessura em toda a sua extensão. Áreas mais finas, ditas campos primários de pontuação, estão

presentes. Nestes campos pontuados é comum a presença de filamentos citoplasmáticos, ou plasmodesmatas, intercomunicando os protoplastos vivos de células adjacentes (RAVEN et al., 1976).

Em determinados tipos celulares, o protoplasto segrega uma parede secundária por dentro da primária. Na grande maioria dos casos, isso acontece depois que o crescimento celular cessou e a parede primária não amplia mais a sua área. Frequentemente, o protoplasto morre em seguida à deposição da parede secundária. A celulose é mais abundante nas paredes secundárias do que nas paredes primárias, sendo aquelas, portanto mais rígidas. Nas paredes secundárias podem ser distinguidos três extratos, diferindo na orientação das suas fibrilas celulósicas (Figura 2), o que confere maior rigidez e resistência a esta parede. Nas células condutoras e de sustentação, a parede secundária estabelece-se somente sobre uma parte da parede primária, revestindo-a na forma de anéis, hélices ou rede, não cobrindo também os campos pontuados primários da parede primária, do que decorrem as características depressões ou pontuações (Figura 2). Em uma célula, uma pontuação habitualmente ocorre em oposição à pontuação da célula com a qual está em contato (Figura 3). A lamela média e as duas paredes primárias, situadas entre as duas pontuações, denominam-se membrana da pontuação. As duas pontuações opostas, associadas à membrana, constituem um par pontuado, o qual pode ser simples ou areolado (com a parede secundária curvada sobre a cavidade da pontuação).

O xilema exerce funções de sustentação, condução de água e sais minerais, além de armazenar substâncias alimentares. As células condutoras de água do xilema são os membros dos vasos (ou elementos dos vasos) e as traqueídes, que são células alongadas com paredes secundárias.

Tabela 1: Principais componentes da parede celular vegetal ¹

<i>Componente</i>	<i>Localização e % em massa</i>	<i>Principais radicais (quantidade)</i>	<i>Principais componentes e função</i>
Celulose	Paredes primária e secundária; 35 %	Glc β -(1,4)	Cadeias longas de glicose. Menos polimerizada na parede primária (distribuição ao acaso). Altamente polimerizada na parede secundária (distribuição complexa). Principal polissacarídeo estrutural.
Hemiceluloses: Xiloglicana	Paredes primária e secundária; 19 %	Glc - β (1,4), β -(1,6)	Forma pontes de hidrogênio com a celulose. Presente na matriz, ao redor das fibrilas de celulose. Grau variado de flexibilidade.
Glicuronoarabinoxilana	5 %	Xilose - α terminal Xilose β - (1,4); arabinose, glicoronose e 4-O-metil glicoronose terminal	Principal hemicelulose em monocotiledôneas.
Polissacarídeos pécticos	Lamela média		Formam a matriz constituinte da lamela média. Amorfa, de importante capacidade formadora de gel.
Homogalacturonana	6 %	Galacturonose α -(1,4)	
Ramnogalacturonana I	7 %	Galacturonose, ramnose, Gal, arabinose	
Ramnogalacturonana II	3 %	10 tipos de radicais	
Arabanas, galactanas e arabinogalactanas	18 %	Arabinose e Gal	
Glicoproteína ricas em hidroxiprolina	Paredes primária e secundária; 10 a 19 %	Hidroxiprolina, serina, arabinose e Gal	Função estrutural, conferindo elasticidade. Produzida também em resposta à injúria. Pode conter lectinas.
Lignina	Lamela média e paredes secundárias		Unidades fenilpropanóides. Fortalecimento e espessamento de paredes. Quantidades maiores em tecidos diferenciados.
Calose	Deposição localizada		Glicana β -(1,3) não-ramificada. Produzida em resposta à injúria e ao estresse, juntamente com lignina, proteínas e fosfolípídeos.

¹ Modificado de GOODMAN *et al.* (1986) e ISAAC (1992). Dados originais de polímeros de dicotiledôneas. Glc – Glicose; Gal – Galactose. Não estão incluídos os componentes da superfície externa, como ceras, cutícula e suberina.

Os membros dos vasos apresentam perfurações, podendo ser na forma de placa perfurada, terminais e em alguns casos laterais. Os traqueídes apresentam somente pontuações. Durante os estágios finais de diferenciação, as pontuações são parcialmente hidrolisadas, restando apenas uma rede altamente permeável de microfibrilas de celulose (RAVEN et al., 1976).

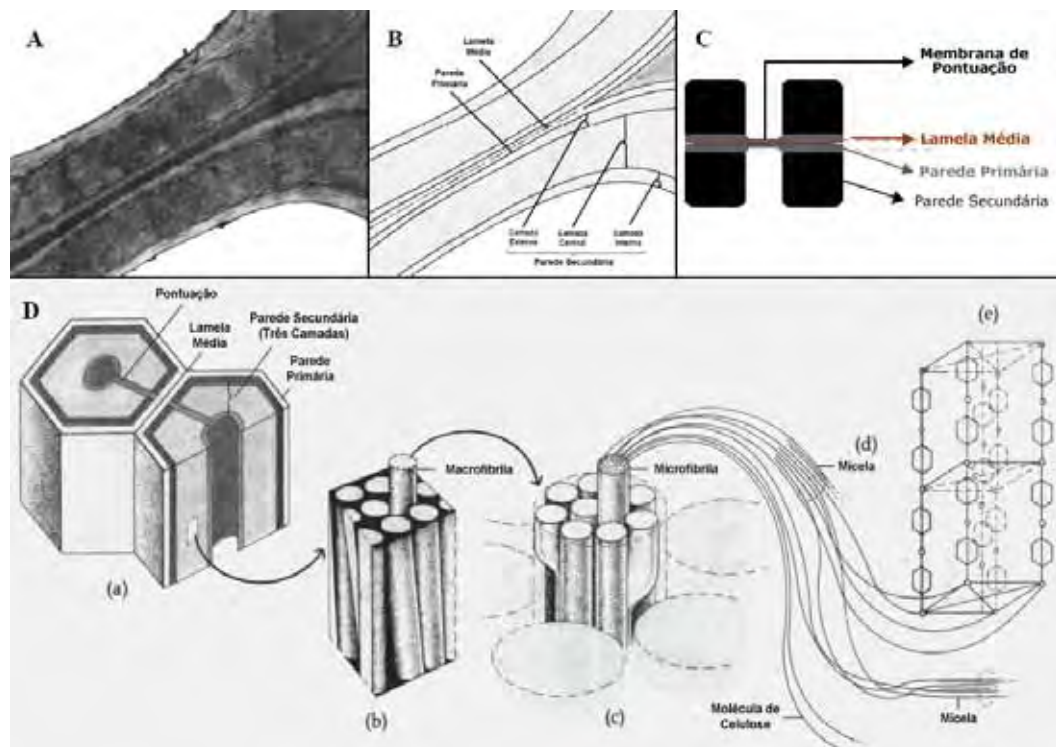


Figura 2: Estrutura da Parede Celular Vegetal. A – Eletromicrografia da parede celular de duas células vegetais adjacentes; B – Camadas da parede celular mostrada em A, evidenciando a distinção entre lamela média, paredes primária e secundária; C – Diagrama da organização de uma pontuação, ilustrando a membrana da pontuação, composta de lamela média e parede primária, numa região sem parede secundária; D – Estrutura detalhada da parede celular: a) estrutura parietal em camadas, com destaque para a pontuação; b) a celulose, o principal componente da parede celular, ocorre na forma de fibrilas de diferentes tamanhos. As fibras maiores ou macrofibrilas são formadas por estruturas menores, as microfibrilas (c); nestas microfibrilas as micelas (d) são arranjadas de modo ordenado, conferindo propriedades cristalinas à parede; e) a micela é mantida pela formação das pontes de hidrogênio entre as cadeias das moléculas de celulose (modificado de RAVEN et al., 1976; RAVEN et al., 2001).

O mais característico dos componentes da parede celular vegetal é a celulose, que constitui grande parte da estrutura parietal. As moléculas de celulose estão unidas em microfibrilas. Estas microfibrilas, por sua vez, formam delgados filamentos ou fibrilas que podem se enrolar em torno umas das outras, formando uma macrofibrila com até 500 mil moléculas de celulose e propriedades. As fibras celulósicas da parede encontram-se em uma matriz reticulada de moléculas não-celulósicas, as hemiceluloses e substância pécticas.

A lignina é um dos constituintes mais importantes da parede secundária, sendo rígido. Caracteristicamente, a lignificação começa na lamela média, depois se espalha pela parede primária e finalmente atinge a parede secundária (RAVEN et al., 1976).

3.3.1 Componentes das paredes celulares vegetais

As paredes primária e secundária e a lamela média são níveis estruturais encontrados em paredes celulares vegetais. A lamela média preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose (Figura 3). As camadas primária e secundária contêm quantidades variáveis de celuloses, hemiceluloses e pectinas. A parede secundária, embora não esteja presente em todas as células, fornece um suporte estrutural à célula, apresentando também lignina (PRADE et al., 1999).

Os polímeros encontrados nas paredes celulares vegetais (Tabela 2) podem ser agrupados como celulose (glicana β -D-1,4), substâncias pécticas (galacturonanas e ramnogalacturonanas; arabinanas; galactanas e arabinogalactanas I), hemiceluloses (xilanas – incluindo arabinoxilanas e [4-O-metil] glicoronoxilanas – glicomananas e galactoglicomanas, xiloglicanas e glicanas β -D-1,3 e β -D-1,4), outros polissacarídeos (calose, arabinogalactanas II e glicoromananas) e glicoproteínas. As arabinogalactanas do tipo I apresentam cadeias lineares β -D-1,4 galactana, enquanto as do tipo II apresentam cadeias internas altamente ramificadas com ligações intergalactose 1,3 e 1,6 (ASPINALL, 1980).

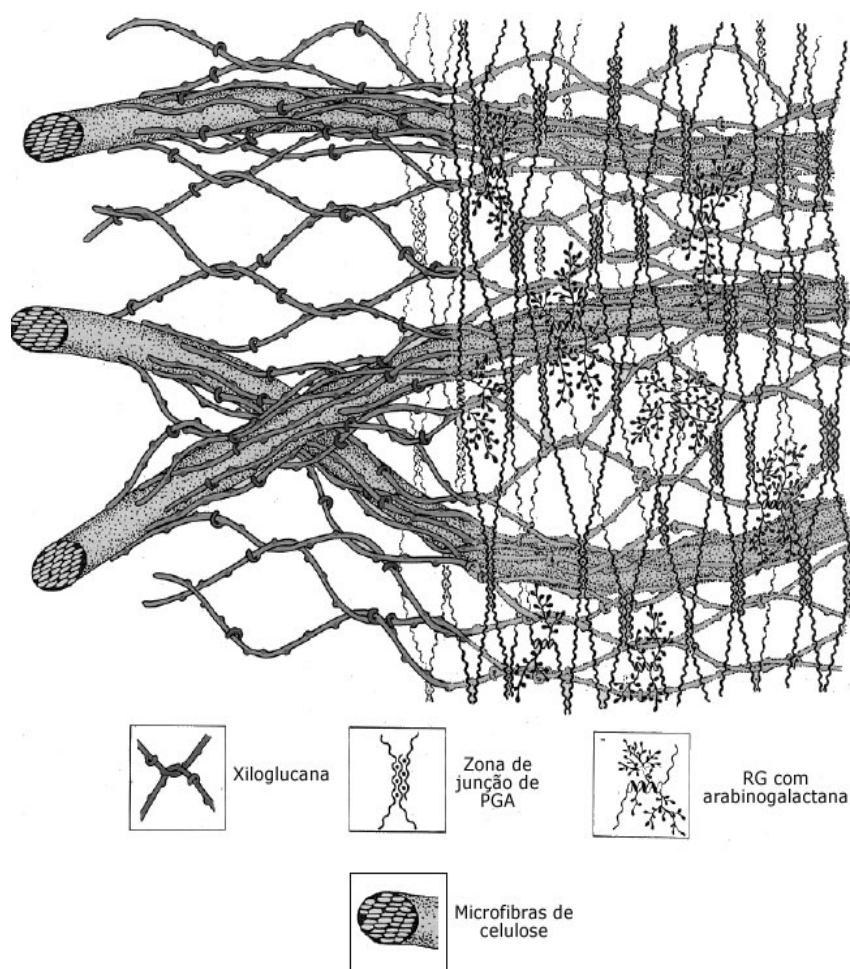


Figura 3: Parede celular primária. As microfibras de celulose estão entrelaçadas com polímeros de xiloglicana, e a estrutura está encaixada em matriz de polissacarídeos pécticos, ácido poligalacturônico (PGA) e ramnogalacturonano (RG) (PERENICOVÁ, 2000).

3.3.1.1 Celulose

A celulose forma o material estrutural básico em todas as plantas superiores terrestres. A celulose é um polissacarídeo composto de unidades β -D-glicopiranosil, ligados por pontes glicosídicas β -1,4, formando um polímero linear (Figura 4). Cada unidade glicose é rotacionada 180° em relação a sua vizinha e o comprimento da cadeia linear pode ser de 2 a 10 mil resíduos de glicose. As regiões cristalinas da celulose são impermeáveis à água e são resistentes à degradação química e biológica. Devido às similaridades estruturais entre celulose, xilanas e glicomananas (todos glicanas com ligação β -1,4), pode haver a adsorção física destes polissacarídeos na superfície da celulose. Uma relação estrutural mais próxima existe entre celulose e xiloglicanas que ocorrem como componentes nas paredes primárias em dicotiledôneas. Além de celulose, podem

ser encontrados outros polímeros β -D-glicana não celulósicos, como a calose (D-glicana β -1,3) e D-glicanas com ligações β -1,3 e β -1,4.

3.3.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são compostas de uma série de heteropolissacarídeos, incluindo glicanas, mananas, arabinanas e xilanas. As xilanas são os polissacarídeos mais comuns entre as hemiceluloses, compostos de unidades D-xilopiranosil com ligações β -(1,4) e são componentes principalmente das paredes celulares secundárias, apresentando baixo grau de ramificação. As xilanas de dicotiledôneas contêm aproximadamente 10 % de unidades ácido D-glicorônico 4-O-metila e menores quantidades de unidades L-arabinose (ASPINALL, 1980). A manana é uma hemicelulose presente principalmente em madeiras leves, podendo apresentar estrutura linear com unidades de manose através de ligações β -1,4 ou estrutura heteropolimérica, com a manose ligada a unidades de glicose por ligações β -1,4 (glicomanana). As unidades manose são freqüentemente substituídas com galactose e grupos O-acetila.

3.3.1.3 Substâncias pécticas

Este termo é utilizado de uma maneira geral para se referir a um grupo complexo de polissacarídeos das paredes celulares primárias e regiões intercelulares das plantas superiores. O termo substâncias pécticas abrange o éster metílico; a pectina; o ácido péctico desesterificado e seus sais, os pectatos; além de certos polissacarídeos neutros sem a estrutura principal galacturonana, que são freqüentemente encontrados em associação com a pectina.

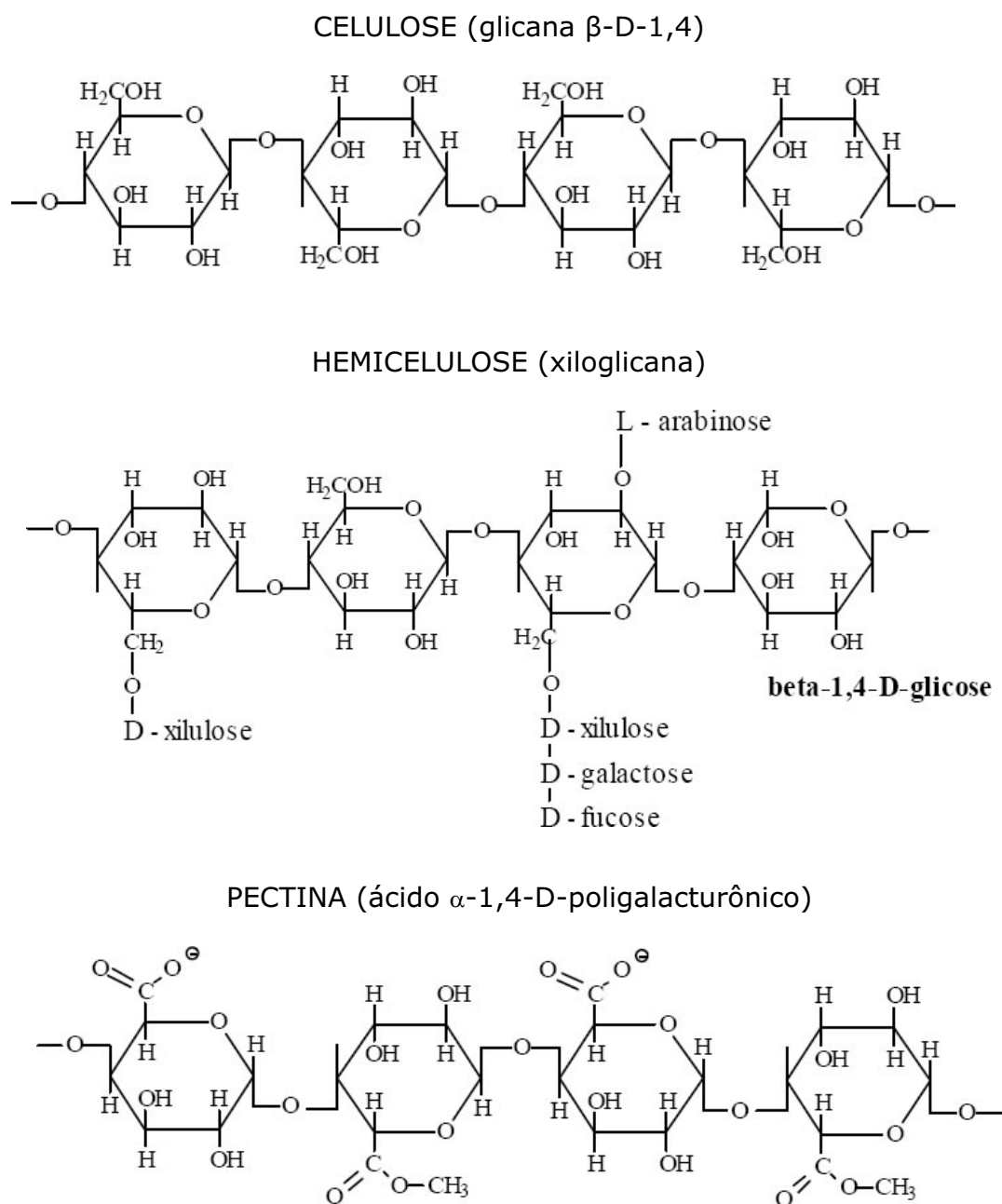


Figura 4: Estrutura química dos principais constituintes da parede celular vegetal.

A característica dominante da pectina, o principal constituinte das substâncias pécticas, é uma cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico, no qual proporções variáveis dos grupos ácidos (40 a 60 %) estão presentes como ésteres metílicos (ASPINALL, 1980; PRADE et al., 1999). Os grupos polissacarídeos que constituem a pectina podem ser classificados em: galactano, arabano, arabinogalacturonano, homogalacturonano, xilogalacturonano, ramnogalacturonano e galactogalacturonano, com uma distribuição não uniforme

nos tecidos das plantas. O ramnogalacturonano é o principal constituinte da substância péctica. (DE VAIES, 1988).

3.3.1.4 Proteínas

A matriz extracelular vegetal contém diversas classes de proteínas e glicoproteínas, as quais podem ser covalentemente ligadas na parede celular ou podem ser solúveis em grau variado. Uma classe é constituída pelas glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, na qual a extensina é um exemplo. A extensina é onipresente nas paredes celulares como um componente estrutural da parede celular primária (ASPINALL, 1980).

3.4 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal

Os microrganismos fitopatogênicos podem viver nos espaços intercelulares ou no interior das células, como os elementos de vaso, e, dependendo do modo de colonização, podem utilizar enzimas para degradar a parede celular vegetal. Estas enzimas, coletivamente denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal (EDPCV), compreendem pectinases, celulasas, xilanases e proteases. As EDPCV podem apresentar ação tanto sinérgica como seqüencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas superiores é constituída de até 90 % de carboidratos e 10 % de proteínas. Como descrito, as paredes celulares apresentam celulose, hemiceluloses, substâncias pécticas, proteínas e lignina. Entretanto, a proporção e a distribuição destes componentes são variáveis de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002).

3.4.1 Hidrólise enzimática

A sacarificação da celulose representa uma alternativa interessante para a destinação de fitobiomassas residuais como o bagaço de cana e resíduos de atividades florestais. No entanto, apesar de muitos estudos, não estão

totalmente compreendidas quais as características do substrato que atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (PALOMEN et al, 2004). Além disso, bioprocessos baseados na hidrólise enzimática requererão substratos produzidos com a qualidade adequada, a partir de fitobiomassa residual. Diferentes tipos de pré-tratamento podem ser aplicados para promover a conversão destes materiais em substratos susceptíveis à hidrólise enzimática e, dentre estes, o pré-tratamento a vapor tem sido descrito como um dos mais eficientes (RAMOS, 1992; WYMAN et al., 2005; MOISER et al, 2005). Paralelamente, estudos tem sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (JORGENSEN et al, 2004; KANG et al, 2004).

3.4.2 Celulases

Atualmente, sabe-se que o complexo celulolítico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glicosidases, que não são consideradas como celulases legítimas. De acordo com o modelo de sinergismo “endo-exo”, essas enzimas cooperam da seguinte maneira: as endoglucanases (EG) agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases; as celobiohidrolases (CBH) agem como exo-enzimas (e. g., no fim das cadeias) e liberam celbiose como produto principal; e as β -glicosidases completam o processo através da hidrólise da celbiose e de outros oligossacarídeos à glicose (ZANDONA FILHO, 2001) (Figura 5).

Muitas celulases são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS), ou “celulose binding domain (CBD)”, e o domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (SA). Esses domínios estão ligados um ao outro através de uma cadeia polipeptídica flexível. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase

possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato, por exemplo, ligações internas e ligações terminais, localizadas nas extremidades das cadeias.

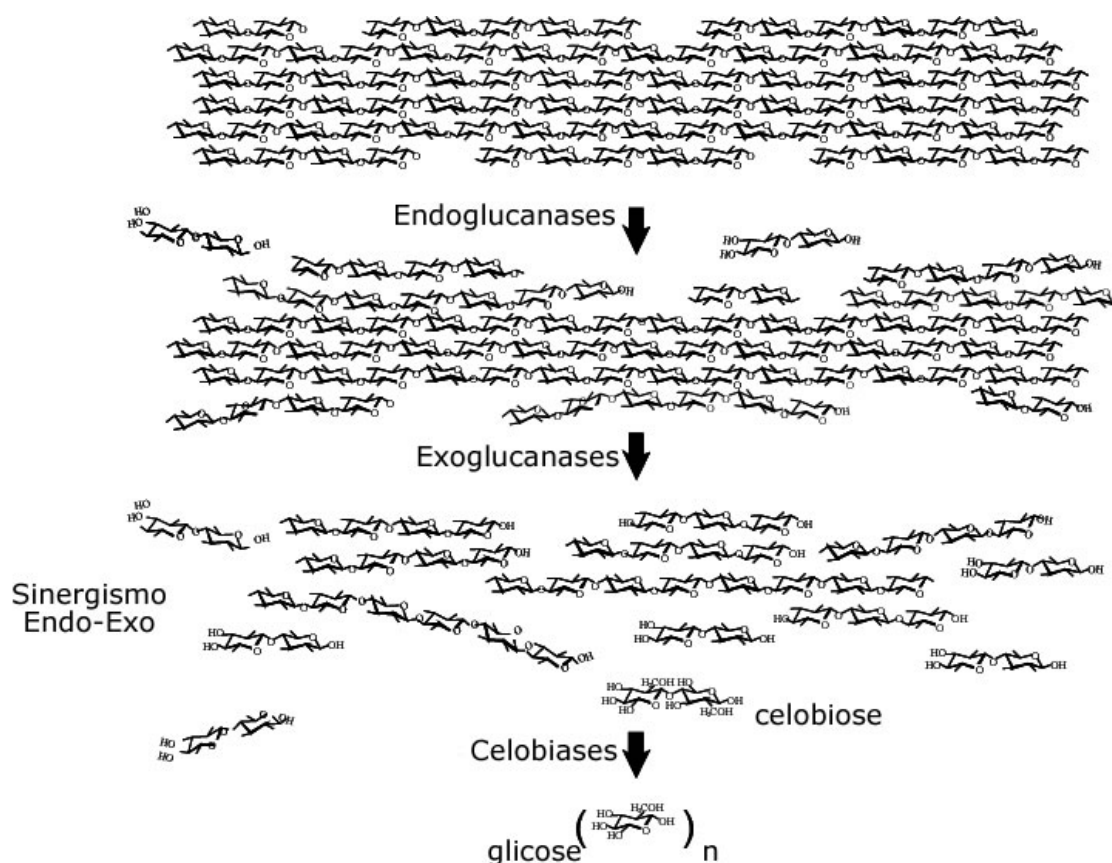


Figura 5: Mecanismo de ação do complexo celulolítico (MARTINS, 2005).

A função do domínio de ligação ao substrato está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulasas na superfície da celulose, por meio de interações não-covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (MARTINS, 2005). PALONEN (2004) demonstrou que sítios ativos separados dos DLS são capazes de hidrolisar substratos até mesmo insolúveis, embora com menor eficiência. No entanto, em concentrações enzimáticas muito altas, o DLS promove a adsorção não produtiva da enzima ao substrato.

3.4.2.1 Endoglucanases

As endo-1,4- β -D-glicanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). A celulose cristalina e o algodão, ambos os substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam. O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o seu grau de polimerização de maneira considerável. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose.

3.4.2.2 Exoglucanases

As exo-1,4- β -D-glicanases (celobiohidrolases, CBHs) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (ZANDONA, 2001). Essas enzimas não atuam sobre celulosas solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico (CMC) ou hidroxietílico (HEC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel®), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para as endoglucanases (EGs), enquanto que a atividade contra Avicel® caracteriza as CBHs, tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (MARTINS, 2005). O sítio ativo das celobiohidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celobiose. O DLS é constituído por aproximadamente 40 aminoácidos e possui a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo. A adsorção ocorre por

meio da interação de resíduos de tirosina (Tyr), presentes no DLS, com as unidades de glicopiranose, presentes na superfície da celulose (MARTINS 2005).

Devido às suas propriedades e especificidade ao substrato, as celobiohidrolases podem ser facilmente isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade, razão pela qual seus domínios catalíticos e de ligação ao substrato já foram cristalizados e parcialmente caracterizados em relação à sua estrutura tridimensional (DIVNE et al., 1994). Por outro lado, as celobiohidrolases, apesar de apresentarem similaridades em seus modos de ação catalítica, podem ser separadas por métodos de eletroforese, como a isoeletrofocalização (COUGHLAN, 1985), por possuírem diferenças significativas em seus teores de carboidratos (glicosilação) e de aminoácidos, pontos isoelétricos e respectivos raios hidrodinâmicos.

3.4.2.3 β -glicosidases

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose. Estritamente falando, β -glicosidases não são celulasas legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (MEDVE, 1997).

O mecanismo de catálise da hidrólise das ligações glicosídicas ocorre de maneira semelhante para as endoglucanases e para as celobiohidrolases, através de uma reação ácido-base onde os aminoácidos constituintes do sítio ativo atuam como ácidos e bases de Bronsted (MARTINS, 2005).

3.4.3 Hemicelulasas

Devido à sua complexa estrutura, a degradação completa da xilana requer a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As endoxilanases β -1,4 (EC 3.2.1.8) clivam a estrutura principal da xilana, e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) clivam Xilose das extremidades não redutoras de oligômeros de xilose.

A remoção dos grupos laterais é catalisada por α -glicuronidases (EC 3.2.1.134), α -L-arabinosidases (EC 3.2.1.155) e acetilesterases (EC 3.1.1.72). No caso da manana, a parte central da molécula é hidrolisada por β -1,4-endomananases, produzindo manobiose e oligossacarídeos, os quais são clivados por β -manosidases para liberar manose (BRAITHWAITE et al., 1995). BRAUN e RODRIGUES (1993) destacam que uma parede celular típica de dicotiledônea apresenta 20 % de xiloglicana e 5 % de xilana, enquanto uma parede de gramínea pode apresentar de 30 a 40 % de arabinoxilana e somente traços de xiloglicana. *E. chrysanthemi* isolada de milho produz duas xilanases (BRAUN e RODRIGUES, 1993; KEEN et al., 1996). Os genes que codificam essas xilanases, *bgxA* e *xynA*, não são essenciais para que a bactéria cause sintomas em folhas de milho (VROEMEN et al., 1995). Enzimas que hidrolisam a manana e xilana (hemicelulases) são amplamente negligenciadas em bactérias fitopatogênicas, embora estes polímeros sejam abundantes componentes da hemicelulose, especialmente em madeiras leves.

A degradação esquemática da celulose e da hemicelulose estão apresentadas na Figura 6.

3.4.4 Pectinases

As substâncias pécticas são despolimerizadas ou modificadas por 3 classes de enzimas: esterases (esterase da pectina e pectina acetil esterase), hidrolases (poligalacturonases) e eliminases ou liases (liase de pectina, liase de pectato), as quais podem atuar em sinergia. As liases clivam ligações glicosídicas internas através de eliminação beta, produzindo oligômeros ou monômeros com resíduos insaturados-4,5 na extremidade não redutora. As galacturonases causam a hidrólise das ligações galacturonosídicas e provavelmente clivam as ligações oxigênio-glicosídeo.

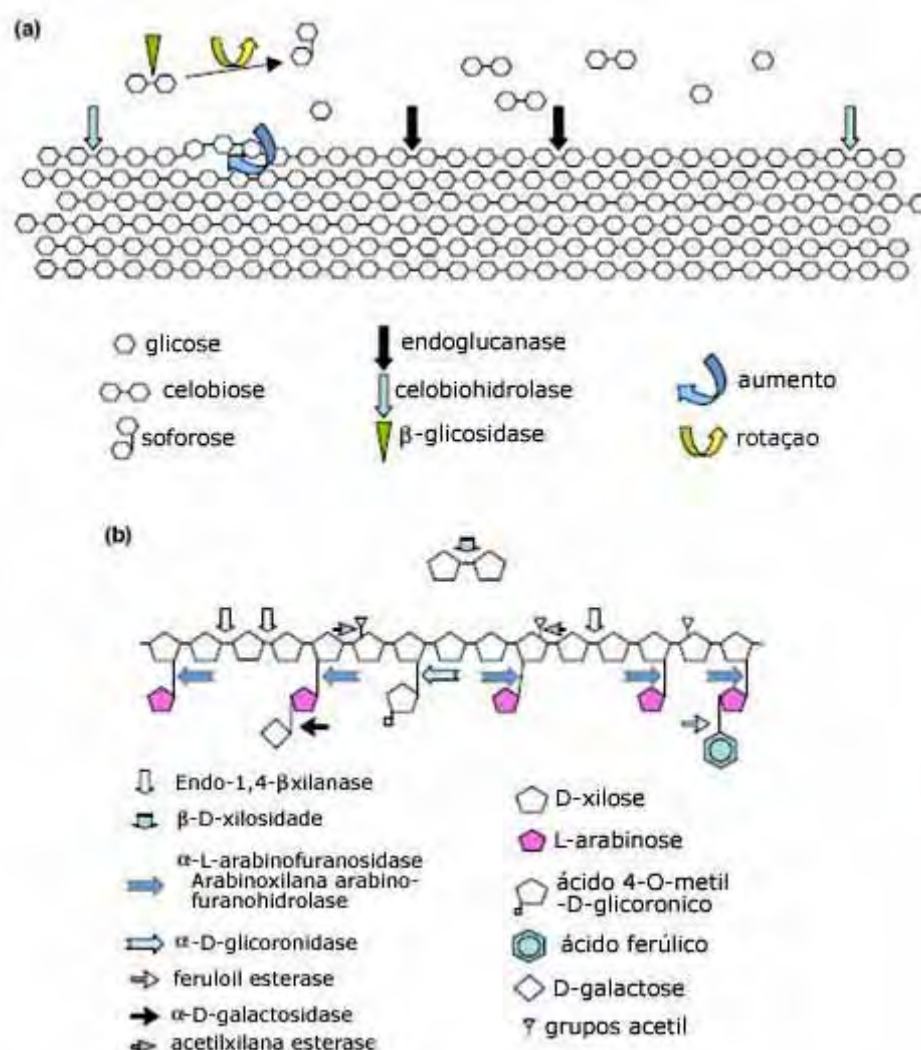


Figura 6: Degradação da celulose e da hemicelulose. (a) Visão esquemática dos sistemas celulolíticos. São mostrados os locais das principais atividades das enzimas celulolíticas. (b) Visão esquemática em um sistema hemicelulolítico, degradação de arabinoxilana como um exemplo. As enzimas ativas no substrato são listadas na legenda (ARO, 2005).

As poligalacturonases diferem em seu modo de ação, podendo ocasionar hidrólise ao acaso (endo) ou atuando somente nas extremidades das cadeias com liberação gradual de galacturonobiose (exo). A esterase e a acetil esterase da pectina facilitam a degradação da pectina pela liase do pectato, pela geração de poligalacturonato por meio da demetilação (hidrólise dos grupos ésteres) e desacetilação da pectina, respectivamente (BEKRI et al., 1999). A degradação enzimática completa das substâncias pécticas pelas pectinases resulta primariamente em ácido galacturônico e ramnose, com a produção de menores quantidades de galactose, arabinose, metanol, acetato e traços de diversos outros açúcares (xilose, fucose e apiose), os quais são assimilados e

metabolizados pelos microrganismos. Em *Pseudomonas viridiflava* (LIAO et al., 1988) uma liase de pectato extracelular de 42 kDa é necessária para maceração do tecido vegetal, pois um mutante para este gene não apresenta esta capacidade macerativa. A habilidade de linhagens de *Xanthomonas campestris* em produzir liase de pectato está intimamente associada com sua habilidade em induzir podridão em tubérculos de batata e em pimentões (LIAO et al., 1996).

3.5 Processos fermentativos para produção de enzimas

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Os processos de fermentação submersa são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classificam em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

3.5.1 Biorreatores

Com o atual desenvolvimento da biotecnologia, os produtos oriundos da biotransformação como enzimas, corantes, hormônios, antibióticos e anticorpos são agora comuns. Outra área em crescimento está relacionada com a aplicação das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais, visando à produção de mudas por micropropagação em larga escala. Ao mesmo tempo, modernos biorreatores têm sido construídos para as mais diversas necessidades de produção (Figura 7), com sistemas de controle para todas as variáveis de processo e com uma imensa gama de acessórios (Figura 8), projetados para operação em condições assépticas, com sistemas de auto-limpeza e de esterilização local. Mesmo com todos esses avanços, a utilização comercial do potencial da biotecnologia moderna para muitas aplicações permanece limitada. O conhecimento insuficiente da engenharia de bioprocessos é um dos vários limitantes do sucesso de projetos e do aumento de escala das pesquisas em laboratório (ROSSI, 2006).

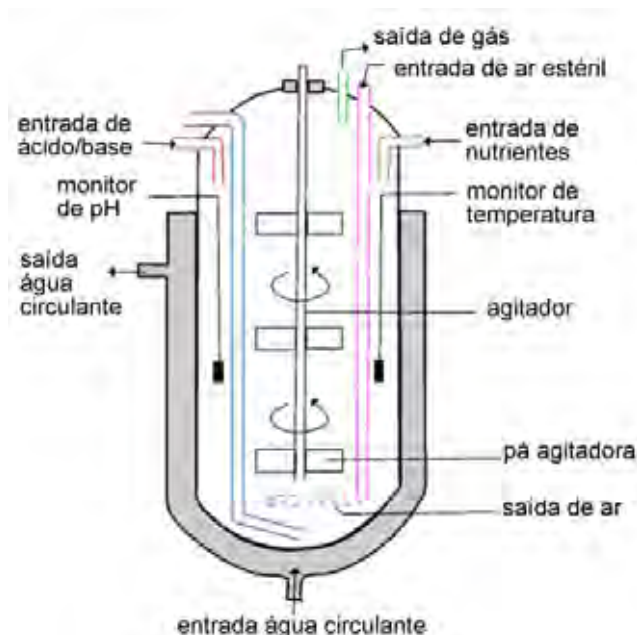


Figura 7: Biorreator de tanque agitado piloto, equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo (Fonte: <http://www.biotopics.co.uk/microbes/penici.html>).

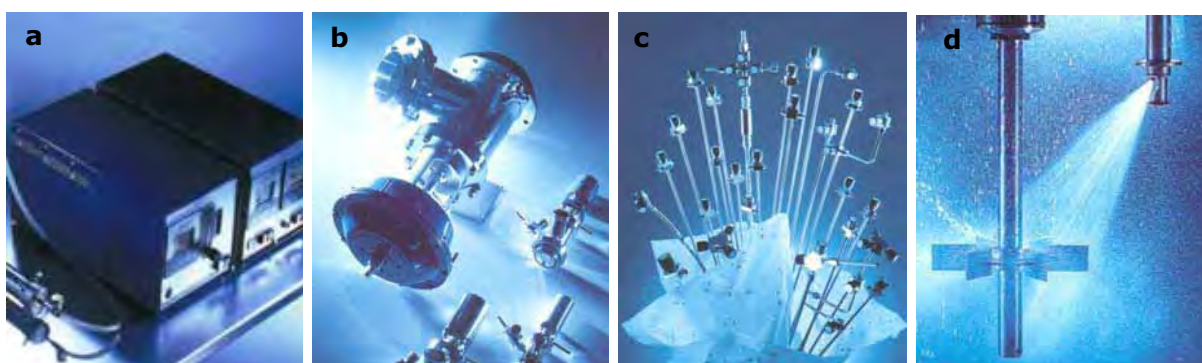


Figura 8: Acessórios utilizados na construção de um biorreator: (a) controladores; (b) sistemas de amostragem; (c) válvulas; (d) sistema de limpeza automático (Fonte: Bioengineering AG).

O projeto e o desenvolvimento de bioprocessos obedecem a uma seqüência, cujo centro é representado por um biorreator, seguido pelo desenvolvimento dos sistemas de separação e purificação dos produtos. Sistemas de troca de calor, utilitários e o sistema de controle completam o processo. O projeto do biorreator, por sua vez, envolve vários aspectos, como a cinética das reações, os fenômenos de transporte, as formas de operação, além das questões da estrutura física (CHISTI, 1989).

Muitos tipos de biorreatores são empregados em processos biotecnológicos. Tradicionalmente, o tipo mais utilizado é o de tanque agitado (STR). A primeira aplicação data dos anos 40, quando foi utilizado durante a Segunda Guerra Mundial no cultivo aeróbio para produção do antibiótico

penicilina (BAILEY, 1980), sendo utilizado para produção de inoculante de fungos ectomicorrízicos pela primeira vez na França, em 1983 (LE TACON et al., 1983). Atualmente, cerca de 90% dos biorreatores aeróbios utilizados na indústria são de tanque agitado tradicional (KOSSEN, 1984).

A operação de realimentação, ou "Fed-batch", envolve uma adição lenta de meios nutrientes altamente concentrados no biorreator sem remoção do meio inicial até que o reator esteja cheio. Essa operação pode manter níveis nutrientes baixos para minimizar a repressão de metabólitos ou para estender a fase estacionária pela adição nutriente para obter o produto adicional. O sistema de "Fed-batch" é usado extensamente nos fermentadores industriais (HENDY et al., 1984).

3.6 Plantas utilizadas

3.6.1 *Melampodium divaricatum*

Melampodium divaricatum (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) é uma planta denominada popularmente por alguns de "falsa-calêndula", "botão de ouro", "estrelinha", "flor de ouro" ou "flor-amarela" (ROCHA NETO et al., 2002). É um arbusto que pode alcançar até 80 cm de altura. Originária de regiões tropicais, que incluem desde América do Sul, sobretudo nordeste do Brasil, América Central, México e sudoeste dos Estados Unidos. Na Guatemala, é utilizada no tratamento de dores estomacais, malária e influenza. No México, é usada no tratamento de embolia; como anti-convulsivante, anti-disentérica e no tratamento de feridas nas pálpebras (HÜTHER et al., 1978). É muito comum no nordeste do Brasil, onde o chá de suas folhas e inflorescências tem sido empregado popularmente como diurético, cicatrizante e diaforético (ROCHA NETO et al., 2002). Esta planta vem substituindo popularmente a calêndula verdadeira (*Calendula officinalis*) por apresentar ações terapêuticas semelhantes, tais como: cicatrizante e antiinflamatória (Figura 9).



Figura 9: *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae).

Fonte: <http://www.nybg.org/bsci/belize/gallery.html>

3.6.2 *Mentha spicata*

O gênero *Mentha* pertence à família Lamiaceae e compreende cerca de 25 espécies. Em geral, inclui plantas aromáticas que apresentam difícil classificação taxonômica devido às suas diversidades morfológicas e grande capacidade de hibridização (LORENZ et al., 2002; CRONQUIST, 1988). As espécies de *Mentha* são plantas herbáceas originárias da Europa e Ásia, ocorrendo em baixas altitudes e em locais permanentemente úmidos e férteis.

A *Mentha spicata* L., Lamiaceae costuma ser cultivada como erva, cujas folhas podem ser secas e usadas como flavorizantes. Seu óleo essencial é usado como aromatizante pelas indústrias farmacêuticas em fragrâncias, na medicina e como condimento alimentar (MARTINS, 2002) (Figura 10).



Figura 10: *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). Foto: Henriette Kress.

Fonte: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/index.html>

3.7 Óleos essenciais

A fitoquímica é a ciência destinada ao estudo dos componentes químicos das plantas. A aplicação dos estudos fitoquímicos pode se ramificar para a área médica, assim como para a taxonomia e química, entre outras aplicações. Os vegetais produzem uma diversidade de substâncias, produtos do metabolismo secundário, algumas responsáveis pela coloração e aroma de flores e frutos, outras vinculadas com a interação ecológica. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua conservação. As fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância medicinal ou comercial (YUNES e CALIXTO, 2001).

A biodiversidade da flora existente no Brasil, e em particular na floresta amazônica, representa um grande potencial para o estudo fitoquímico, porém tal estudo deve ser realizado com responsabilidade, de modo a não acarretar o desaparecimento de suas espécies (INNOCENTINI, 2000). Tomando como exemplo as espécies produtoras de óleos essenciais, de acordo com a família que pertencem, essas espécies acumulam esse óleo em estruturas anatômicas

específicas (Figura 11). Do ponto de vista da exploração da biodiversidade vegetal, quando essa estrutura representa uma fonte renovável de matéria-prima (resina, folha, flor, fruto ou semente), é possível extrair-se o óleo essencial de modo sustentável. Isso a torna uma fonte de óleo ecologicamente correta (SIANI, et al., 2000).

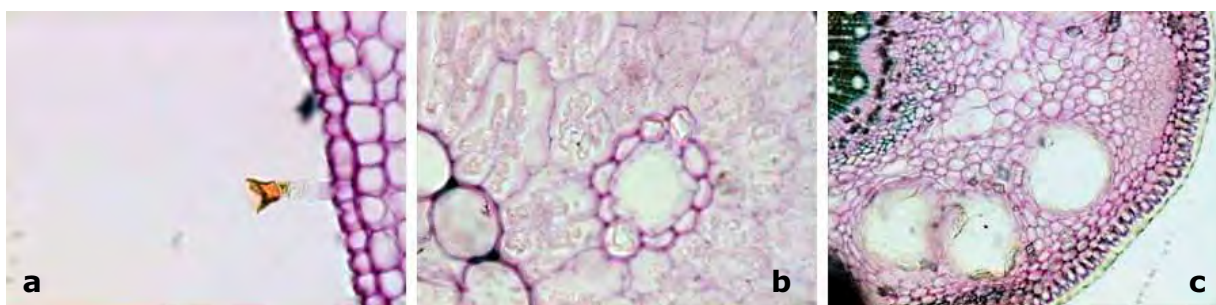


Figura 11: Aparelhos secretores de óleos essenciais: (a) tricoma glandular; (b) canal secretor; (c) bolsas secretoras. Fonte: <http://people.ufpr.br/~nilce/aromaticas.doc>

A ISO (International Standardization Organization) define óleos essenciais, ou óleos voláteis, como produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água (SIMÕES e SPITZER, 2000). Os óleos essenciais são misturas complexas e muito variáveis de constituintes voláteis que pertencem de forma quase exclusiva a duas séries, caracterizadas por suas origens biossintéticas distintas: a série terpênica e a série, muito menos freqüente, dos fenilpropanóides (BRUNETON, 1991). Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físicas, como por exemplo, a de terem aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a designação de óleo.

A composição dos óleos essenciais das plantas é determinada geneticamente, podendo variar com os seguintes fatores: a) origem botânica (a composição de um óleo essencial está em função da espécie produtora); b) quimiotipo, os constituintes químicos do óleo essencial variam com a geografia; c) ciclo vegetativo (dependendo da época do ano pode variar a porcentagem dos constituintes); d) fatores da natureza, climáticos e tipo de solo influenciam na produção do óleo essencial; e) procedimento de obtenção (o modo de extração pode influenciar na composição química do óleo, extraíndo ou não determinados constituintes) (BRUNETON, 1991).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro, essencial a todos os seres vivos, são os metabólitos primários, ou macromoléculas, como os lipídios, protídeos e glicídios que, à custa de energia, originam o segundo grupo de compostos químicos, os metabólitos secundários, que são micromoléculas com estruturas complexas, possuindo atividades biológicas com funções variadas (HARBONE, 1984). Destaca-se como a principal função das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário a de proteger os organismos que as produzem.

Os óleos essenciais, no entanto, são formados por constituintes variados, desde hidrocarbonetos terpênicos, alcalóides, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos sulfurados, constituintes do metabolismo secundário. Entretanto, a grande maioria dos óleos essenciais é formada por terpenos voláteis. A principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade, diferindo-se assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente das sementes. Os óleos essenciais são líquidos à temperatura ambiente, tem coloração clara e, em geral, possuem densidade menor que a da água. Quase sempre dotados de poder de rotação, têm índice de refração elevado. Solúvel em álcoois e em solventes orgânicos habituais, são lipossolúveis e muito pouco solúveis em água, sendo arrastáveis por vapor d'água (BRUNETON, 1991).

O uso de óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções de realeza, e à busca de bem estar físico através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, flores, folhas e sementes. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação introduzido pelos cientistas mulçumanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (SIANI, et al., 2000). A maior parte dos trabalhos sobre atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais na literatura especializada versa sobre o aspecto antimicrobiano destes (bactericida e fungicida) (BARATTA, et al. 1998; DE FEO, et al., 2003; TEPE, et al., 2005). Muitos autores associam a atividade bactericida dos óleos aos seus constituintes hidrocarbonetos, sugerindo que maior será a atividade bactericida deste óleo quanto maior for sua composição de monoterpenos hidrocarbonetos. Trabalhos já foram feitos com o intuito de

comprovar que estes monoterpenos também são responsáveis pela atividade antifúngica dos óleos essenciais (DE FEO, et al., 2003).

Há ainda na literatura relatos sobre atividades antiinflamatória, antioxidante e inseticida de óleos essenciais (BARATTA, et al., 1998).

3.7.1 Análises cromatográficas de óleos essenciais

A cromatografia é um método de separação no qual os componentes de uma amostra dividem-se entre duas fases: uma permanece imóvel (fase estacionária) e a outra percola através dela (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais de cada um destes componentes.

3.7.1.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto em extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (YUNES e CALIXTO, 2001). A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (WASICKY, 1987). O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Neste caso, a sílica é seguramente um dos adsorventes mais utilizados. Em geral, a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos (WASICKY, 1987).

Na escolha da fase móvel, deve-se levar em conta a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel, uma vez que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra pela superfície do adsorvente (WASICKY, 1987).

Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas são secas e reveladas. A etapa de revelação consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. A visualização das manchas pode ser feita por

meio de métodos físicos (luz ultravioleta), químicos (reagentes) ou biológicos (enzimas) (WASICKY, 1987).

3.7.1.2 Cromatografia em fase gasosa

As substâncias voláteis ou semivoláteis (termo estáveis) são preferencialmente analisadas por cromatografia gasosa, devido ao grande poder de separação desta técnica, sendo capaz de separar compostos orgânicos com isomeria plana similar, isomeria óptica e homólogos com grande pureza (VILEGAS, 1997). A cromatografia gasosa é um procedimento físico utilizado para se separar uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases: uma estacionária e uma fase gasosa móvel. A amostra é vaporizada e carregada pela fase móvel (ou gás de arraste, uma vez que se trata de um gás inerte cuja finalidade é transportar as moléculas separadas) através da coluna onde se encontra a fase estacionária (MC NAIR, 1997). Um sistema muito utilizado para análise de amostras é o uso de um espectrômetro de massas, que funciona como detector, acoplado a um cromatógrafo a gás.

Nesta técnica, conhecida como CG/EM, o gás de arraste emergente do cromatógrafo é transferido através de uma válvula dentro de um tubo, onde ele passa por uma fenda molecular. Uma parte do fluxo de gás é então transferida para dentro da câmara de ionização do espectrômetro de massas. Cada pico eluído da coluna cromatográfica é bombardeado com uma fonte ionizante, conseguindo fragmentar o composto em uma grande diversidade de íons, que são separados e registrados de acordo com suas razões m/z (COLINS et al, 1997).

No sistema (CG/EM) é necessário o uso de uma rápida varredura pelo espectrômetro de massas. O instrumento deve determinar o espectro de massa de cada componente na mistura, separado pela coluna cromatográfica, antes mesmo do próximo componente entrar na câmara de ionização, de maneira que uma substância não seja contaminada pela próxima fração antes que seu espectro tenha sido obtido. Com um sistema CG/EM é possível também analisar uma mistura e conduzir uma busca em uma biblioteca de dados existente no

sistema, podendo desta maneira procurar cada componente da mistura por tentativas e comparações (INNOCENTINI, 2000).

3.7.2 Métodos de extração de óleos essenciais

Os processos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade de utilização do mesmo. Dentre os métodos de extração mais utilizados destacam-se: enfloração, prensagem, extração com solventes orgânicos, extração por fluído supercrítico e arraste por vapor d'água.

3.7.2.1 Hidrodestilação

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o Sistema de Clevenger (CLEVANGER, 1928). Com uma variação desse método, inclusive no sistema de Clevenger (WASICKY, 1963) (Figura 12), faz-se a extração do óleo volátil pela mistura do material vegetal à água. Chamada de hidrodestilação obtém-se também o hidrolato, que é a parte aquosa com a presença de uma porcentagem do óleo essencial, que é solúvel nesta. O óleo coletado deve ser seco com Sulfato de Sódio (Na_2SO_4) Anidro (INNOCENTINI, 2000).

3.8 Extração aquoso enzimática de óleos vegetais

O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente na última década e foi aplicado para todas as oleaginosas de interesse comercial, como mostrado nos trabalhos de revisão publicados por DOMINGUEZ *et al.* (1994) e FREITAS *et al.* (1996). A aplicação dessa tecnologia em escala comercial está restrita, no entanto, à obtenção de óleo de oliva. Este óleo tem longa tradição na alimentação humana e a aplicação de enzimas em escala industrial representou uma contribuição da tecnologia para aumentar a quantidade e estabilidade do óleo extra-virgem, obtido na primeira prensagem

do fruto (CHRISTENSEN, 1991). Para se realizar a extração do óleo, que se encontra nos vacúolos intracelulares, há necessidade de se romper paredes e membranas celulares. Os tratamentos mecânico e térmico causam a ruptura das estruturas celulares, porém, não são suficientes, já que parte do óleo permanece na célula, sem ser extraído. Através da hidrólise, rompe-se a parede celular e há maior liberação de óleo, ocorrendo também o rompimento do complexo molecular lipoproteína e lipopolissacarídeo em moléculas simples, liberando óleo extra que por outro método não seria extraído (SHANKAR, 1997).

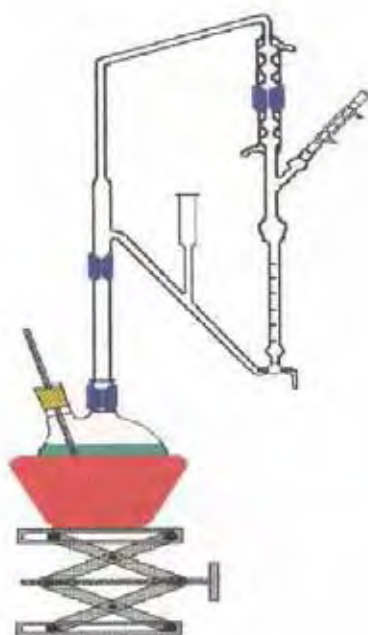


Figura 12: Sistema de Clevenger modificado (SILVA, 2006).

A aplicação da tecnologia enzimática na indústria de óleos pode ser feita de duas formas: extração combinada e extração aquosa.

Na extração combinada, o extrato enzimático é adicionado durante a etapa de cozimento, antes da prensagem do grão ou polpa, proporcionando uma pré-ruptura do tecido celular e aumentando o rendimento da prensagem. Preferencialmente, essa etapa deve ser efetuada na temperatura de máxima atividade das enzimas. A concentração do extrato enzimático deve ser otimizada e, por questões de viabilidade econômica, deve ser inferior a 0,1% em relação ao peso da matéria prima. A vantagem da extração combinada, comparada à extração aquosa, está associada ao fato de não se alterar nenhuma etapa do

processamento convencional, aumentar o rendimento na etapa de prensagem e reduzir a viscosidade da mistura melhorando o fluxo dos produtos durante a etapa de separação.

Na extração aquosa a matéria-prima é submetida a um pré-processamento que, em geral, consiste na diluição e trituração a quente da polpa para inativação das enzimas naturais e preparo de uma emulsão homogênea. A seguir, a mistura é transferida para um reator com controle de temperatura e agitação. A enzima é adicionada nesta etapa e o substrato é mantido sob incubação. A diluição, o tempo e a concentração do preparado enzimático são parâmetros relevantes e devem ser otimizados durante o desenvolvimento do processo. A temperatura deve ser fixada em função da atividade máxima da enzima, de preferência no pH natural da emulsão (FREITAS, et al., 1996).

O alto rendimento alcançado até então, com a maioria das oleaginosas, está associado à aplicação de uma quantidade significativa de enzima, da ordem de 1%, inviabilizando seu uso em escala industrial devido ao alto preço das enzimas comerciais (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados obtidos na extração aquosa enzimática de óleos vegetais.

<i>Oleaginosa</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Conc.</i> (%)	<i>Rend.</i> (%)	<i>Referência</i>
Abacate	α -amilase - ENMEX-S. A.	1	80	BUENROSTRO E LÓPEZ-M. (1986)
	protease e celulase - ENMEX-S.A.	1	80	BUENROSTRO E LÓPEZ-M. (1986)
Amendoim	protease (pepsina Merck) e celulase (CGA 20394)	3	78	LANZANI <i>et al.</i> (1975)
	protease e glucanase (Ultrazym-100)N	3	76	LANZANI <i>et al.</i> (1975)
Coco	poligalacturonase ENMEX-S.A.	1	40	CINTRA <i>et al.</i> , 1993
	poligalacturonase (Clarex), α -amilase (Tanase) e protease (HT-proteolytic) - ENMEX-S.A.	1	80	CINTRA <i>et al.</i> , 1993
	hemicelulase ^L	3	72	FULBROOK (1984)
	pectinase (SP-249) ^N	0,1	90	SOSULSKI <i>et al.</i> (1993)
Canola	pectinase, hemicelulase e celulase (SP-311) ^N	0,5	92	CARR E MIKLE (1995)
Farelo de arroz ¹	celulase e pectinase ^N	6	87,9	SENGUPTA E BHATTACHARYYA, 1996
Germe de milho	pectinase (Ultra-SP-L) ^N	2	74,2	BOCEVSKA <i>et al.</i> (1992)
	Gamanase ^N	1	73,3	BOCEVSKA <i>et al.</i> (1992)
	celulase (Celucast 1,5 L) ^N	2	84,7	BOCEVSKA <i>et al.</i> (1992)
Gergelim	celulase e pectinase (Maxatase-Ciba Geigy)	5	74	LANZANI <i>et al.</i> (1975)
Girassol	celulase e pectinase (Maxatase Ciba Geigy)	3	52	LANZANI <i>et al.</i> (1975)
	celulase ^L	2	54	BADR E SITOHI (1992)
	proteínase animal ^L	2	51	BADR E SITOHI (1992)
Mostarda ¹	celulase e pectinase ^N	4	100	SENGUPTA E BHATTACHARYYA, (1996)
Soja ¹	hemicelulase (A2) ^L e proteínase (B1) ^L	3	63	FULBROOK (1984)
	proteínase (B1) ^L	3	83	FULBROOK (1984).

1 - Extração usando solvente orgânico durante e após incubação enzimática, antes da etapa de centrifugação; L - refere-se às enzimas produzidas em escala de laboratório e, N - refere-se às enzimas comerciais produzidas pela Novo Nordisk.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor compreensão da parte experimental do trabalho, segue na Figura 13 o fluxograma que descreve de maneira geral as etapas seguidas.

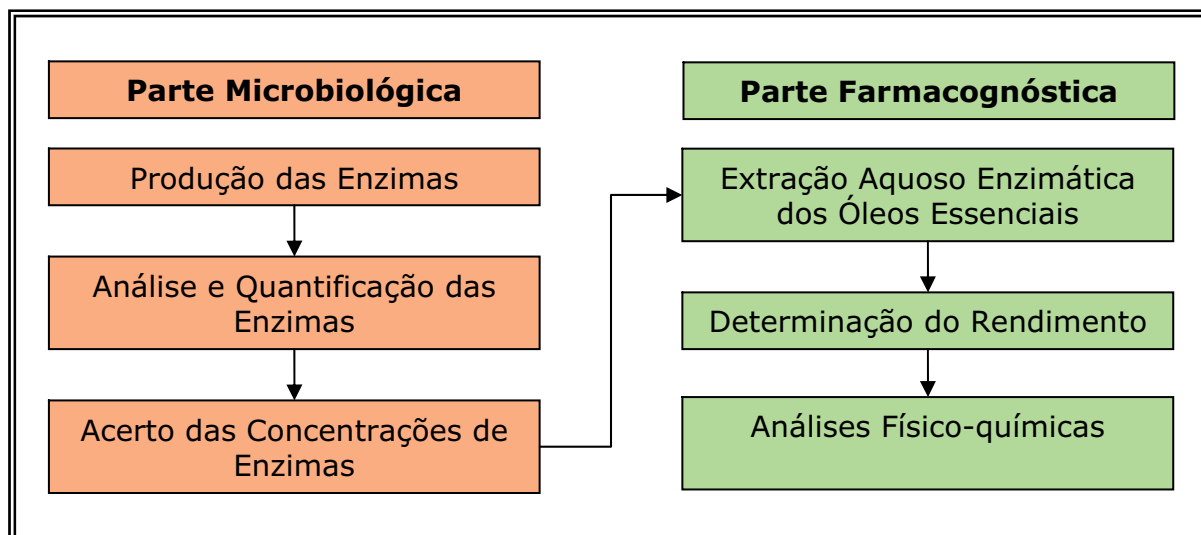


Figura 13: Fluxograma da parte experimental.

4.1 Projeto e construção de biorreator

O material utilizado para a construção do biorreator foi escolhido de modo que não reagisse com o meio de cultura utilizado, nem com os compostos produzidos na fermentação, e que fossem resistentes ao processo de esterilização. Após buscas na literatura, foram escolhidos o aço inoxidável e o cobre.

O corpo do biorreator foi construído em aço inox a partir de um cilindro medindo 55,5 cm de altura por 15,5 cm de diâmetro e 2,0 mm de espessura. Em seu interior, foi colocado encanamento de cobre em forma de círculo, para a circulação da água para resfriamento. Outro cano de cobre foi colocado para entrada de oxigênio. A tampa, também de aço inox com 2,0 mm de espessura, foi fixada ao corpo do biorreator por meio de parafusos e vedada com anel de borracha tipo "O-ring". Um cano em aço inox foi colocado junto ao lado interno da tampa para servir de guia para o eixo da hélice e a vedação se deu com o uso de selos. Na tampa foram colocados bocais de cobre para acesso ao interior do biorreator. No fundo do corpo havia uma saída de 1,27 cm para a retirada de amostras e do produto final (Figura 14).

A aeração foi feita por meio de duas bombas de ar. O sistema de filtros de ar foi composto de três unidades, sendo os dois primeiros de $0,45\ \mu\text{m}$ e o último de $0,22\ \mu\text{m}$, o que garantiu a esterilidade do ar utilizado.

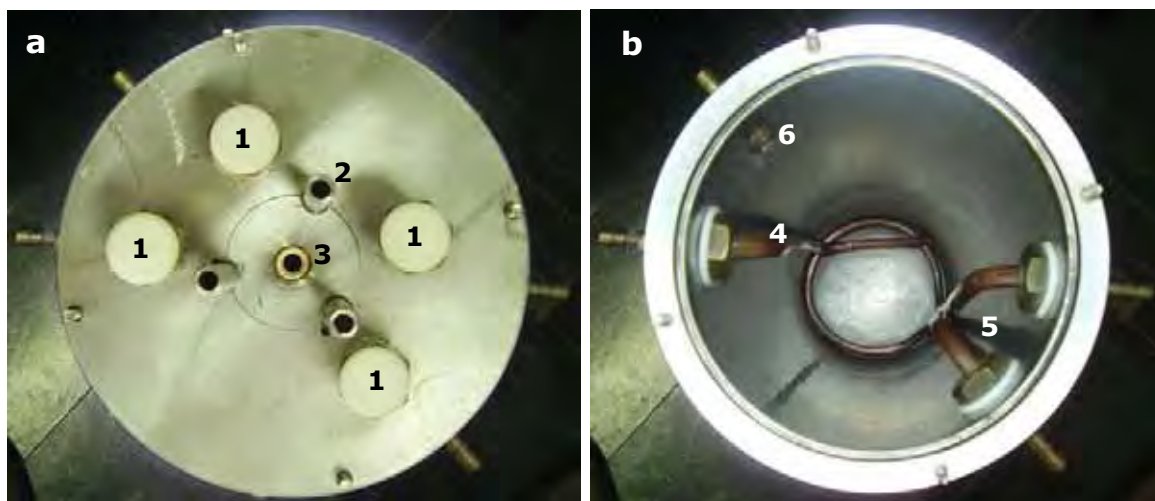


Figura 14 : Visão superior do biorreator: (a) Tampa superior do biorreator: (1) entradas, (2) suporte do motor, (3) entrada do eixo da hélice. (b) Visão interna do biorreator: (4) aerador, (5) serpentina de circulação de água, (6) saída de CO_2 .

Para o sistema de agitação, foi utilizado um motor elétrico, acoplado ao eixo das pás, após o processo de esterilização, de rotação variável de 300 a 500 rpm. Foi utilizada uma hélice com fluxo duplo responsável por uma agitação axial, conforme demonstrado na Figura 15.

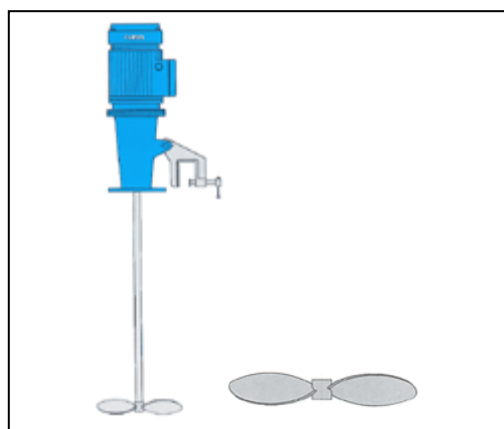


Figura 15: Tipo de pá utilizada no biorreator.

A temperatura da água utilizada no resfriamento ou aquecimento do biorreator foi controlada por um termostato acoplado a um aquecedor com capacidade de aquecimento de $5,0\ \text{Watt/L}$. Foram usados 10 litros de água para

o sistema. Em outro sistema, foi utilizado um banho de água circulante com controle de temperatura.



Figura 16: Sistema completo do biorreator: (1) biorreator, (2) motor, (3) banho circulante, (4) filtros de ar, (5) compressores de ar, (6) captação de CO₂.

O pH do meio de cultura foi controlado manualmente, onde amostras eram retiradas regularmente e avaliadas. Quando necessário, eram adicionadas as quantidades de NaOH 25% ou H₂SO₄ 10% necessárias para a manutenção do pH.

4.2 Microrganismos

Foram utilizados neste trabalho os seguintes microrganismos:

- *Aspergillus niger* Cepa Industrial, cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- *Trichoderma reesei* QM 9414 (ATCC 26921), proveniente do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Campus de Araraquara.

▪ *Trichoderma reesei* Rut C-30, cedida pelo Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, da Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul - RS).

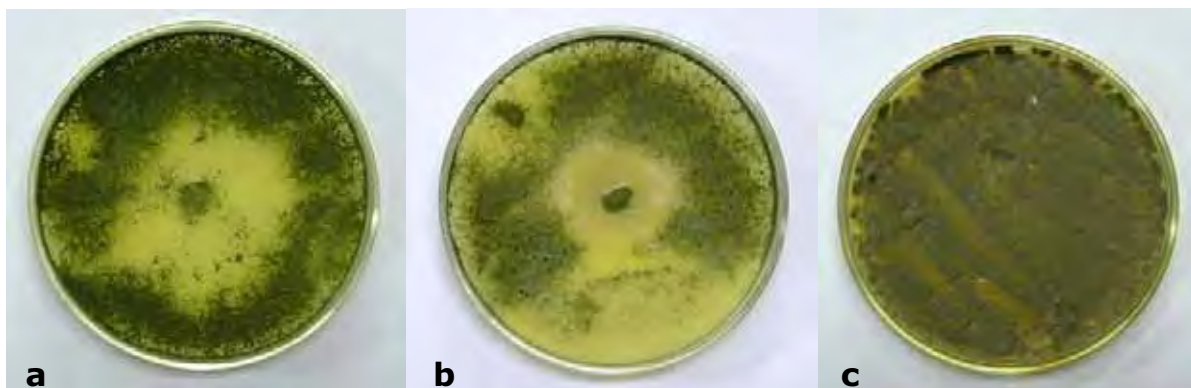


Figura 17: Microrganismos crescidos em PDA, após 7 dias, a 28° C. (a) *T. reesei* Rut C-30, (b) *T. reesei* QM 9414, (c) *A. niger*.

4.3 Manutenção das cepas

A manutenção das cepas em laboratório foi realizada em meio sólido de ágar batata dextrose (extrato de batata 20%, dextrose 10%, ágar 15%) para as cepas de *Trichoderma* e em meio sólido ágar e aveia (aveia 40% e ágar 15%) para *Aspergillus niger*, em tubos inclinados, com repiques periódicos em intervalos de aproximadamente quinze dias e mantidas a 28 °C.

4.4 Obtenção do inóculo

Para obtenção dos inóculos, os microrganismos foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio sólido ágar batata dextrose para *T. reesei* e ágar aveia para *A. niger*. Foram incubados por 7 dias em estufa a 28° C. A concentração utilizada em todos os testes foi de 10^7 esporos/mL. A contagem se deu em Câmara de Neubauer, após suspensão em água destilada estéril. A inoculação foi realizada após, ajustando-se o volume de inóculo necessário com o volume de meio de cultura.

4.5 Determinação dos meios de cultura para produção de enzimas

Diversos substratos são utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos. Para a determinação dos melhores meios de cultura, foram realizados testes com seis tipos de meios para *T. reesei* e quatro para *A. niger*.

4.5.1 Meios de cultura para *T. reesei*

Foram testados seis meios de cultura, cujas formulações e respectivos autores estão descritos na Tabela 3. Foi testado também o uso do sistema de "Fed-batch" ou realimentação, onde houve a adição posterior de meios nutrientes altamente concentrados no biorreator sem nenhuma remoção do meio inicial.

Tabela 3: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção das enzimas estudadas por *T. reesei* ⁽¹⁾

	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5		Meio 6	
					Inicial	Fed-batch	Inicial	Fed-batch
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	2,0	2,0	2,0	2,0	5,0	0	5,0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,0	0	1,0	0
Uréia (g.L ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	0	0	0	0	0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0	0,6	0
CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,8	0	0,8	0
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	20,0	2,0	20,0
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	50,0	5,0	50,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	1,4	14,0	1,4	14,0
ZnCl ₂ (mg.L ⁻¹)	1,6	1,6	1,6	1,6	0	0	0	0
MnSO ₄ .H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	16,0	1,6	16,0
Peptona (g.L ⁻¹)	0	0,05	0,75	0	0,75	7,5	0,75	7,5
Celulose (g.L ⁻¹)	10,0	5,0	2,0	0	30,0	10,0	10,0	10,0
Tween 80 (mL.L ⁻¹)	0	0	1,0	1,0	0,2	0	0,2	0
Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	0,1	0,1	0,25	0	0,3	3,0	0,3	3,0
Lactose Mono (g.L ⁻¹)	0	0	0	0	30,0	10,0	10,0	10,0
D-Glicose (g.L ⁻¹)	0	0	0	0	5,0	0	1,0	0
Corn Steep Liquor (g.L ⁻¹)	0	10,0	0	0	0	0	0	0

(1) Referências: Meio 1: MANDELS, M. e REESE E.T., 1956; Meio 2: MANDELS, M. e WEBER, J., 1969; Meio 3: MANDELS, M. e WEBER, J., 1970; Meio 4: MANDELS, M. e STERNBURG, D. 1976; Meio 5 e Meio 6: Propostos.

4.5.2 Meios de cultura para *A. niger*

Foram testados quatro meios de cultura para *A. niger*, conforme Tabela 4, buscando a produção das enzimas estudadas em grandes quantidades. O sistema “Fed-batch” não foi utilizado por não terem sido encontrados dados na literatura que indicassem melhora na produção enzimática com a utilização de realimentação.

Tabela 4: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção das enzimas estudadas por *A. niger*⁽¹⁾

	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	2,0	0,5	1,0	4,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	1,4	0	2,0	2,0
Na ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	0	0	0	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,3	0	0	0,07
CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,3	0	0	0,01
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	2,0	0	0	0
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	5,0	0	0	0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,4	0	0	0
H ₃ BO ₄ (mg.L ⁻¹)	0	0	0	10
CuSO ₄ .5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	10,0	0	0	0
MnSO ₄ .H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,56	0	0	70,0
Peptona (g.L ⁻¹)	1,0	0	0	0
Celulose (g.L ⁻¹)	0	0	0	7,0
Corn Steep Liquor (g.L ⁻¹)	0	5,0	0	0
Tween 80 (mL.L ⁻¹)	1,0	0	0	0
Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	0,05	0	0	0
Farelo de Arroz (g.L ⁻¹)	0	0,5	0	0
Bagaço de Cana-de-açúcar (g.L ⁻¹)	10,0	0	0	0
Lactose Monohidratada (g.L ⁻¹)	0	0	0	
D-Glicose (g.L ⁻¹)	0	0	14,0	10,0
Pectina Cítrica (g.L ⁻¹)	0	0	7,0	7,0

(1) Referências: Meio 1: AGUIAR, C. e MENEZES, T.; Meio 2: KANG, S.W., et al., 2004; Meio 3: HUERTA, S., et al 1994; Meio 4: Proposto.

4.6 Recuperação do EEB e determinação da biomassa

Após o período de incubação, o extrato contendo a biomassa microbiana e o meio de cultura com as enzimas foi filtrado a vácuo, em banho de gelo, utilizando-se funil de Buchner com papel de filtro ADVANTEC TOYO 5 C (85 mm

de diâmetro) de porosidade igual a 45 μm . O filtrado, contendo a biomassa, e o sobrenadante (EEB) foram estocados a -20°C para posteriores análises.

A determinação da biomassa foi feita pesando-se a mesma após filtração e total retirada de líquidos com papel absorvente.

4.7 Análise físico-química e microbiológica do EEB

Logo após a sua recuperação, o EEB foi submetido à determinação de pH, para a elaboração de um perfil característico das enzimas presentes, e a testes microbiológicos, a fim de se determinar a eficiência da separação da biomassa do EEB. Amostras foram aplicadas sobre placas de Petri contendo meio Sabouraud e Agar Batata Dextrose.

4.8 Precipitação das proteínas

As proteínas foram precipitadas antes de serem submetidas às análises quantitativas. Alíquotas de 1 mL do EEB foram misturados com 1 mL de uma solução de ácido tricloro acético (TCA) a 10% (m/v). Após repouso de aproximadamente 60 minutos sob refrigeração de 4°C , a mistura foi centrifugada por 25 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em tampão citrato 50 mmol/L pH 4,8. A análise das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951).

4.9 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry

Os reagentes utilizados por este método foram preparados da seguinte maneira: Reagente A – foram dissolvidos 20,0 g de Na_2CO_3 e 4,0 g de NaOH em água destilada e, em seguida, o volume foi completado para 1,0 L; Reagente B-1 – foram dissolvidos 1,0 g de CuSO_4 em água destilada e, em seguida, o volume foi completado para 100,0 mL; Reagente B-2 – foram dissolvidos 2,0 g de tartarato de sódio e potássio em água destilada e, em seguida, o volume foi

completado até 100,0 mL; Reagente C – preparado pela mistura de 1,0 mL do Reagente B-2 a 1,0 mL do reagente B-1, seguido da adição de 100,0 mL do Reagente A.

Inicialmente, foram adicionados 5 mL do Reagente C a 0,5 mL da solução de proteínas. Após 10 minutos, 0,5 mL do reagente de Folim Ciocalteau diluído em água na proporção de 1:1 foi adicionado à mistura. Depois de 30 minutos, a absorbância da solução foi medida em 660 nm e as proteínas foram quantificadas empregando-se uma curva de calibração contendo soro albumina bovina como padrão (Lowry, 1951).

4. 10 Determinação do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O perfil protéico dos extratos extracelulares foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio com gel de empilhamento de 12% e gel de separação de 12% (LAEMMLI, 1970). Para a confecção dos géis de poliacrilamida foram utilizadas placas de vidro medindo 19,5 x 16,0 x 0,3 cm, separadas por espaçadores de 1 mm de espessura. A eletroforese foi realizada em tampão tris-glicina. As concentrações dos reagentes e quantidades necessárias estão descritas nas Tabelas 5 e 6. O tempo de corrida foi de aproximadamente 10 horas a 50,0 V, 40,0 mA e 90,0 W.

Tabela 5: Composição do gel de separação a 12%

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água MiliQ	6,6 mL
Acrilamida 30%	8,0 mL
Tris HCL 1,5M pH 8,8	5,0 mL
SDS 10%	200,0 µL
Persulfato de Amônio 10%	200,0 µL
Temed	8,0 µL

Tabela 6: Composição do gel de empilhamento a 12%

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água MiliQ	5,5 mL
Acrilamida 30%	1,3 mL
Tris HCL 1,5M pH 8,8	1,0 mL
SDS 10%	80,0 µL
Persulfato de Amônio 10%	80,0 µL
Temed	8,0 µL

4.10.1 Revelação do gel pela prata

Após a retirada do gel da cuba de eletroforese, o perfil protéico foi revelado utilizando-se o método de revelação pela prata. O gel foi colocado em TCA 20% por 30 minutos, lavado com uma solução de etanol 10% e ácido acético 5%, por 10 minutos, três vezes. Em seguida, foi colocado agente oxidante por 5 minutos, lavado com água destilada por 10 minutos, duas vezes, e adicionado à solução de nitrato de prata por 20 minutos. O gel foi lavado com água destilada, 1 minuto, e adicionado um agente redutor; após tal procedimento, a reação foi interrompida com ácido acético a 5%.

4.11 Preparação da celulase utilizada como padrão

Para fins de estudos comparativos em alguns dos experimentos, uma amostra de celulase obtida comercialmente (Celulase de *T. reesei* ATCC 26921, SIGMA®) foi utilizada. O preparo se deu diluindo-se 1,0 mg em 250,0 µL de tampão citrato 50mM pH 4.8. Segundo o fornecedor, 1,0 mg da enzima contém 6,6 UI.

4.12 Determinação dos açúcares redutores

O reagente DNS foi preparado com a dissolução de 7,49 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 14 g de NaOH em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução, foram adicionados 216,10 g de tartarato duplo de sódio e potássio

(Sal de Rochelle), 5,37 mL de fenol (fundido a 50° C) e 5,86 g de metabissulfito de sódio. O reagente foi armazenado em temperatura ambiente.

Para o procedimento analítico, foram adicionados 2,0 mL do reagente DNS a amostras com 1,0 ou 2,0 mL em tubos de ensaio. O meio reacional permaneceu em água fervente por exatamente 5 minutos e, em seguida, foi resfriado em banho de água à temperatura ambiente. Após a homogeneização do meio, mediante inversão dos tubos, quando necessário, alíquota de 1,0 mL foi retirada e diluída para possibilitar a medição da absorbância. Leituras de absorbância das amostras em $\lambda=540$ foram feitas e a quantificação foi realizada através de uma curva de calibração, utilizando-se o açúcar redutor de interesse como padrão.

4.12.1 Determinação do coeficiente de extinção molar

As curvas de calibração, baseadas em soluções-padrão com concentrações de 0,1 a 1 mg/mL, foram submetidas ao mesmo procedimento das amostras. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer e se deu da seguinte maneira: o gráfico da curva da absorbância x concentração do açúcar redutor ($\mu\text{mols/mL}$) foi traçado e determinado o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = a \times b \times c$, onde A = Absorbância, a = absortividade, b = caminho óptico (cm) e c = concentração. Como $b = 1,0$, obtivemos: a ou $\epsilon = A \div c$, onde ϵ é dado por $\mu\text{mols} \times \mu\text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Para a curva de glicose o ϵ obtido foi 0,2316 e para a curva de xilose, obtivemos $\epsilon = 0,2498$.

4.13 Determinação da atividade de Celulase total

Tiras de aproximadamente 1,0 x 8,0 cm (70 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-incubados a 50° C, contendo 1,0 mL de tampão e 1,0 mL do EEB em, no mínimo, três diluições diferentes. Após uma hora de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 2,0 mL de DNS e seguiu-se a quantificação como

descrito no item 4.12. Antes da realização da leitura, todas as amostras, padrões e soluções de referência (brancos) foram diluídas quatro vezes com água destilada. A absorbância da solução foi medida em 540 nm e a concentração de açúcares redutores foi determinada contra uma curva de calibração onde a D-glicose foi utilizada como padrão (GHOSE, 1986). Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$AE = \frac{\text{absorbância (540 nm)} \times \text{vol. Ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto, por mL de reação.

4.14 Determinação da atividade de Endoglucanase

Alíquotas de 0,5 mL de amostras do extrato enzimático diluído foram incubadas a 50 °C e a reação foi iniciada com a adição de 0,5 mL de uma solução de CMC de viscosidade média, preparada em uma concentração de 2% em tampão citrato. Antes de ser utilizada, a solução de CMC foi submetida a deaeração em ultra-som. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2,0 mL da solução de DNS, procedendo-se então como descrito no item 4.12. A absorbância das amostras foi medida e comparada a uma curva de calibração constituída com padrões de D-glicose. Para a análise do branco e dos padrões, foram incubados 0,5 mL da solução de CMC por 30 minutos a 50 °C, seguida da adição de 2,0 mL de DNS e em seguida, a adição de 0,5 mL de tampão para o branco ou da solução contendo D-glicose para a curva. Então prosseguiu-se pelo procedimento descrito no item 4.12. Todas as amostras, padrões e branco foram diluídos cinco vezes para leitura da absorbância, a fim de ajustá-la a níveis compatíveis com a Lei de Lambert-Beer. O cálculo da atividade enzimática foi feito como no item 4.13. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por mL, por minuto de reação.

4.15 Determinação da atividade de β -glicosidase

Adicionou-se 0,25 mL do EEB a tubos de ensaio, em diluições apropriadas, juntamente com 0,5 mL de uma solução tampão citrato. O meio foi previamente incubado a 42° C e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL de uma solução 4,0 mmol/L de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo em tampão citrato. Após 10 minutos, adicionou-se 1,0 mL de uma solução 1,0 mol/L de carbonato de sódio, interrompendo a reação por deslocar o pH para o meio básico, onde as enzimas não apresentam mais atividade e por ser o pH onde o p-nitrofenol exibe coloração amarela. A concentração de glicose produzida foi determinada indiretamente pela medida da concentração de p-nitrofenol no meio reacional, por leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de p-nitrofenol. O cálculo da atividade de β -glicosidase foi feito da seguinte maneira:

$$AE = \frac{\text{absorbância}_{(410 \text{ nm})} \times \text{vol. Ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um nmol de p-nitrofenol por mL, por minuto de reação.

4.16 Determinação da atividade de Xilanase

Foi utilizado com o substrato "Birch Xylan" (X-0502, Sigma) a 1%. Foi homogeneizado 1,0 g de substrato em 80 mL de tampão citrato a 60°C e, em seguida, a solução foi aquecida até fervura em uma chapa de aquecimento com agitação magnética. A solução foi então resfriada em banho de água à temperatura ambiente e nela permaneceu sob agitação lenta durante uma noite. O volume foi completado até 100 mL com tampão citrato.

Para a determinação da atividade de xilanase, 1,8 mL de uma solução de xilana a 1% (m/v) em tampão citrato foram inicialmente incubados a 50°C. Após a estabilização da temperatura, 0,2 mL do EEB foi adicionado ao meio em diluição apropriada. Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de DNS, seguindo-se à determinação como descrito no item

4.12. A absorbância das amostras foi medida e comparada a uma curva de calibração baseada em padrões de D-xilose. Para a análise do branco e dos padrões, foram incubados 1,8 mL da solução de xilana por 30 minutos em 50°C, seguida de adição de 2,0 mL de DNS e em seguida, adicionou-se 0,2 mL de tampão para o branco ou da solução contendo D-xilose para a curva e então prosseguiu-se pelo procedimento descrito no item 4.12. O cálculo da atividade enzimática foi realizado como no item 4.13. Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de um μmol de xilose por minuto, por mL de reação. O método foi realizado segundo BAILEY (1992).

4.17 Determinação da atividade de Poligalacturonase

Foi utilizado como substrato o polipectato de sódio 0,5% preparado em tampão acetato de sódio 25,0 mmols/L pH 5,0 contendo 1,0 mmol/L de EDTA. No procedimento, foram preparadas três diluições diferentes do extrato enzimático. Alíquotas de 0,5 mL destas amostras foram incubadas a 50 °C e a reação foi iniciada com a adição de 0,5 mL da solução polipectato de sódio. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2,0 mL da solução de DNS, procedendo-se então como descrito no item 4.12. A absorbância das amostras foi medida e comparada a uma curva de calibração constituída com padrões de ácido monogalacturônico. Para a análise do branco e dos padrões, foram incubados 0,5 mL da solução de polipectato de sódio por 30 minutos a 50 °C, seguida da adição de 2,0 mL de DNS e em seguida, a adição de 0,5 mL de tampão para o branco ou da solução contendo ácido monogalacturônico para a curva e então prosseguiu-se pelo procedimento descrito no item 4.12. O cálculo da atividade enzimática foi realizado como no item 4.13. Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de ácido monogalacturônico por minuto de reação.

4.18 Determinação da atividade de Pectinase

O método foi realizado segundo MILL e TUTTOBELLO (1961), onde foi utilizado como substrato uma solução de pectina 0,2% em tampão acetato de

sódio 25,0 mmols/L pH 5,0 contendo 1,0 mmol/L de EDTA. Alíquotas de 0,5 mL das amostras contendo o EEB foram incubadas a 50 °C e a reação foi iniciada com a adição de 5,5 mL da solução de pectina. Após 30 minutos, a reação foi interrompida por resfriamento rápido em banho de gelo. A viscosidade foi medida em viscosímetro de vidro com circulação de água a temperatura de 37° C. O branco foi feito misturando-se 5,5 mL da solução de pectina com 0,5 mL do tampão utilizado no método. A viscosidade da solução de pectina foi medida antes e depois de misturada ao EEB.

A definição de uma unidade viscosimétrica, segundo SCALA *et al.*, 1980, é a quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a viscosidade inicial da solução de substrato em um minuto de reação. A porcentagem da diminuição da viscosidade foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ redução de viscosidade} = \frac{\text{tempo de escoamento do branco} - \text{tempo de escoamento da amostra}}{\text{tempo de escoamento do branco} - \text{tempo de escoamento da água}} \times 100$$

4.19 Determinação das condições ideais de cultivo dos microrganismos

A fim de se obter a máxima produção das enzimas de interesse, fez-se necessária a determinação das condições ideais de incubação em biorreator. Todos os testes foram realizados utilizando-se *Trichoderma reesei* Rut C-30.

4.19.1 Determinação do pH

Foram realizados testes da variação do pH do meio de cultura. O pH inicial foi ajustado utilizando-se uma solução de amônia e água 12,5% (v/v) ou de ácido sulfúrico 10% (v/v) nos seguintes valores: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0. A incubação se deu em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, em mesa agitadora de movimento orbital a aproximadamente 180 rpm e temperatura em torno de 28° C. O período de incubação foi de 10 dias.

4.19.2 Determinação da temperatura

Para determinar qual a melhor temperatura para o crescimento e produção enzimática, foram feitos testes onde o cultivo ocorreu em diferentes temperaturas: 25, 28 e 30° C. A incubação se deu em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, em mesa agitadora de movimento orbital a aproximadamente 180 rpm, durante 10 dias. O pH inicial do meio de cultura foi 4,0.

4.19.3 Determinação da velocidade de agitação

Duas velocidades de agitação foram testadas em biorreator: 400 e 500 rpm. O meio de cultura utilizado foi o número 5, proposto para *T. reesei*, porém sem adição posterior de nutrientes. O pH do meio foi mantido em torno de 4,0 e a temperatura em 28° C. O tempo de incubação foi de sete dias.

4.19.4 Determinação da taxa de aeração

Foram realizados testes de crescimento e produção enzimática em dois cultivos com diferentes quantidades de oxigênio: 0,5 e 1,5 vvm, sendo esses encontrados calculando-se a quantidade de ar produzida em relação ao volume de meio de cultura utilizado nos testes. As condições de incubação foram semelhantes a do item anterior, com uma velocidade de agitação de 400 rpm.

4.20 Análise microbiológica do extrato enzimático

Para garantir a esterilidade do EEB contendo as enzimas estudadas, após o processo de filtração e separação da biomassa, o sobrenadante foi aplicado em placas de Petri contendo meio agar batata e dextrose e meio Sabouraud, ambos ricos em nutrientes e próprios para crescimento de fungos e bactérias.

4.21 Preparação da Celulase obtida comercialmente

Além das amostras produzidas a partir dos processos fermentativos, uma celulase obtida comercialmente (Celulase de *T. reesei* ATCC 26921, SIGMA® C8546) foi utilizada nos testes determinantes de atividade de celulase total, endoglunase e β -glicosidase, com a finalidade de comparação. A celulase obtida comercialmente foi preparada diluindo-se 1,0 mg em 1,0 mL de tampão citrato. Segundo o fornecedor, 1,0 mg da enzima contém 6,6 UI.

4.22 Análise da termoestabilidade das enzimas

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, foram realizados testes com as enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* QM 9414 e Rut C-30 frente à enzima obtida comercialmente (C8546-10KU, Sigma Prod.). Foram submetidas às temperaturas de 40° C a 80° C, com intervalos de 5° C durante 10, 30 e 60 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e seguiu-se a determinação das atividades enzimáticas conforme descrito no item 4.13.

4.23 Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática

A fim de se determinar o efeito de íons e outras substâncias sobre as atividades de celulasas, xilanases e β -glicosidase, foram realizados testes utilizando EEBs provenientes de biorreator após 7 dias nas condições ideais produzidas por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 e QM 9414. Os ensaios enzimáticos foram realizados frente a soluções contendo 1,0 mM de: ZnCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , AgNO_3 e EDTA. As soluções iônicas foram adicionadas ao tampão citrato utilizado na determinação das atividades enzimáticas. Após ajuste de volume do tampão, procedeu-se conforme descrito nos itens 4.13, 4.15 e 4.16.

4.24 Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos

Depois de estabelecidos todos os parâmetros para a produção das enzimas celulasas, xilanase e pectinase em biorreator, os EEBs foram utilizados nas extrações dos óleos essenciais. Porém, antes dessa etapa, fez-se necessário estabelecer as quantidades de EEB que seriam utilizados. Para isso, com os resultados obtidos nos testes de atividade enzimática, padronizou-se a concentração enzimática necessária para a maior liberação dos óleos essenciais. Foram utilizados 100,0 g de material vegetal fresco e o volume de EEB e o volume final foi completado para 2,0L com tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4.8.

4.25 Aplicação das enzimas na extração dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais, foi utilizada a técnica da hidrodestilação com um aparelho de Clevenger. Antes da extração, o material vegetal foi submetido a um tratamento com o EEB contendo as enzimas nas concentrações já descritas no item anterior. Foram utilizados EEBs provenientes de biorreator após 7 dias nas condições ideais produzidas por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30. O tratamento se deu por uma hora, a uma temperatura de 50° C. Em paralelo, foi realizado o teste controle, onde a mesma quantidade de material vegetal foi submetido ao tratamento nas mesmas condições, porém apenas com tampão citrato.

Após o tratamento, os balões foram acoplados ao aparelho de Clevenger, e a extração se deu por 4 horas.

4.26 Determinação do rendimento de óleo produzido

Os testes de determinação do rendimento de óleo foram realizados com as partes aéreas das plantas frescas ou secas, da maneira descrita a seguir.

4.26.1 Coleta e preparo do material vegetal

Para os testes de rendimento de óleos essenciais foram utilizadas as partes aéreas de *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata*, ambas coletadas no Horto Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp de Araraquara-SP. As coletas foram feitas nos meses de setembro e outubro de 2007, sempre no período da manhã. Após coleta, foi feita a retirada de materiais estranhos, e utilizado logo em seguida.

4.26.1 Tratamento enzimático do material vegetal

Antes da extração, o material vegetal foi submetido a um pré-processamento, que consistiu na mistura desse material ao EEB contendo as enzimas já quantificadas. Foram preparados dois balões de vidro redondos de capacidade de 5,0 L, ambos contendo 100 g de material vegetal. Em um deles, adicionou-se 2,0 L de água destilada e no outro, a mesma quantidade de uma solução do EEB contendo as enzimas já quantificadas e solução tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. A quantidade de EEB e de tampão citrato foi determinada segundo item 4.24. Após, os balões foram colocados em banho a 50° C por 1 hora. Em seguida, os balões foram acoplados ao aparelho de Clevenger e procedeu-se a extração.

4.26.2 Extração do óleo essencial

A extração se deu por 4 horas, mantendo-se a temperatura em 100° C. Posteriormente, os óleos foram secos, por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Estas operações foram realizadas em triplicata. Os óleos foram armazenados em frascos de vidro sob refrigeração, para evitar perdas de constituintes voláteis e, então, submetidos às análises por CG/EM e CCD.

O rendimento foi calculado pela relação das massas de óleo extraído nas duas situações. Para a medida da massa utilizou-se uma balança analítica da METTLER, modelo AE - 240, com precisão de 10⁻⁴ g.

4.27 Análises cromatográficas dos óleos

4.27.1 Cromatografia em camada delgada

Utilizaram-se placas de vidro de 20 x 20 cm recobertas com uma camada de 0,5 mm de espessura, utilizando-se como fase estacionária sílica G-60 e GF₂₅₄ Merck®, na proporção 1:10 (m/m). As placas foram limpas com água e detergente, e em seguida mergulhadas em solução sulfocrômica por uma noite. Após este período, as placas de vidro foram retiradas da solução e enxaguadas em água corrente e em água destilada, e seca em estufa para uso posterior.

Depois de secas, as placas foram acomodadas uma ao lado da outra numa prancheta horizontal, feita de alumínio, tendo um bordo retangular longitudinal e outro transversal, que as mantêm em ordem, lado a lado, para a aplicação da camada adsorvente. A aplicação da camada adsorvente (0,25 mm) foi efetuada com ajuda de um aparelho espalhador especial, que tem um dispositivo que permite a variação de sua espessura. Colocou-se a suspensão de adsorvente sobre a primeira placa a ser recoberta, deslocando-se então o aparelho sobre as placas em cima da prancheta, fazendo-se a deposição da suspensão.

As amostras de óleos essenciais foram diluídas em clorofórmio padrão analítico, na relação 1:10 (v/v). A aplicação da amostra sobre a cromatoplaça foi feita utilizando-se um tubo capilar a uma distância de dois centímetros do extremo inferior da cromatoplaça. Efetuou-se a aplicação da amostra em frações consecutivas, com intervalos suficientes para a evaporação do solvente. A fase móvel utilizada foi uma mistura de tolueno e acetato de etila (93:7).

4.27.2 Cromatografia em fase gasosa

Os óleos essenciais e as frações separadas por CCD foram analisados por CG/EM em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massa SHIMADZU modelo QP-2010, acoplado a um detector seletivo de massas HP-5970 de modo impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura da interfase de transferência de 300 °C e banco de dados NBS-Reve (40.000

registros). As condições cromatográficas foram: Coluna DB-5MS (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m); Temperatura inicial de 60 °C; Tempo inicial de 3 minutos; Tempo final de 70 minutos; Temperatura final de 240 °C; Temperatura do injetor de 240 °C; Temperatura do detector de 250 °C; Gás de arraste He; Programação da rampa: 60 °C até 100 °C na razão de 7 °C/min, depois 100 °C até 250 °C na razão de 12 °C/min. Split de 1:50; μ de 36 cm/seg.; Modo Scan: 30 a 300 Da

4.27.2.1 Quantificação e Identificação

A quantificação nos constituintes nos óleos foi realizada a partir de soluções 10 % (óleo em clorofórmio) pela normalização simples da área do pico de cada composto, sendo a área total a somatória de todas as áreas do cromatograma (100 %). A identificação dos componentes do óleo foi feita pela análise do banco de dados do sistema CG/EM, por comparação do padrão de fragmentação obtido na espectrometria de massas.

4.28 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão dos valores obtidos. A avaliação estatística foi realizada através do software Origin® V. 7.03 (OriginLab Corporation), os dados foram analisados por ANOVA, sendo que foi tomado como significativamente diferente $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Comparação da produção enzimática em Erlenmeyer e Biorreator

A Figura 18 mostra os resultados de comparação de produção das enzimas celulase, xilanase e β -glicosidase em frascos Erlenmeyers e em biorreator. As condições de crescimento em biorreator ainda não haviam sido estabelecidas e a incubação se deu em temperatura de 28° C, agitação de 400 rpm e 1,5 vvm de aeração. A produção em frascos Erlenmeyers foi realizada em mesa agitadora com movimento orbital a uma velocidade de 180 rpm e a temperatura de 28° C.

Observou-se que a produção das enzimas é significativamente maior em biorreator do que em frascos Erlenmeyer, com 169% de aumento na produção de celulase, 48,8% de xilanase e 23,2% de β -glicosidase (Tabela 17 em Anexos).

5.2 Estabelecimento das condições de produção enzimática

5.2.1 Curvas de crescimento de *T. reesei* QM9414 e Rut C-30

Para observar o crescimento das cepas QM 9414 e Rut C-30 de *T. reesei*, a biomassa produzida em seis diferentes meios de cultivo, após determinados períodos de tempo foi quantificada. Os resultados podem ser observados nas Figuras 19 e 20. Notou-se uma maior produção de biomassa no meio 6 em ambas as cepas, quando comparado ao segundo melhor meio: 124,2% para QM 9414 e 139,6% para Rut C-30. O meio que apresentou o menor rendimento foi o 3 para ambas as cepas.

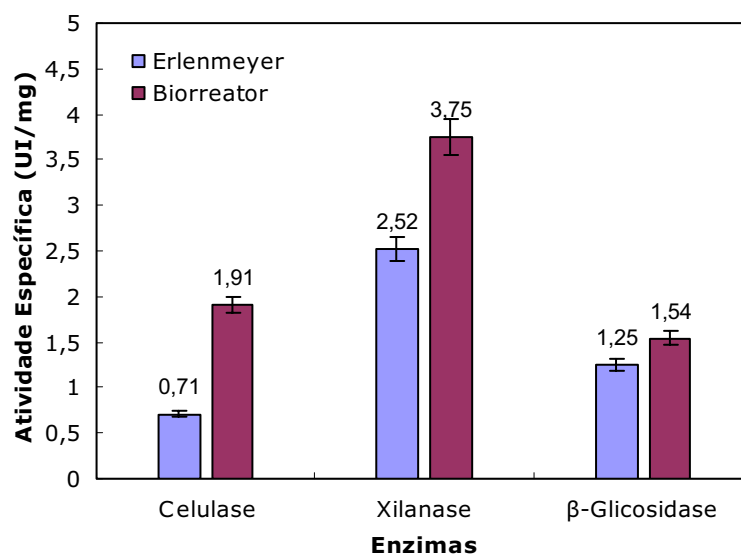


Figura 18: Comparação da produção enzimática de *T. reesei* QM 9414 em Erlenmeyer em agitador orbital e em Biorreator, após 7 dias de incubação. Meio de cultura 6, temperatura de 28° C e pH 4,0.

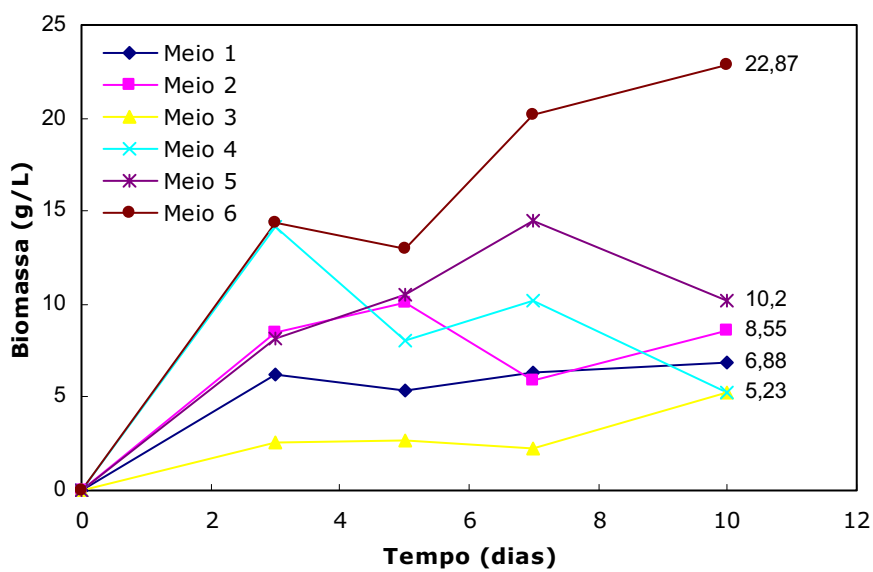


Figura 19: Crescimento microbiano de *T. reesei* QM9414.

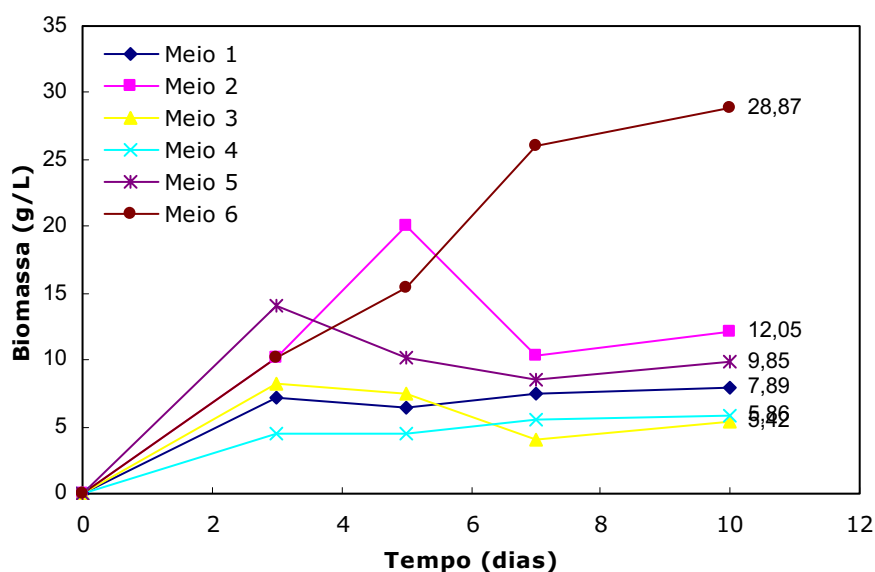


Figura 20: Crescimento microbiano de *T. reesei* Rut C-30

5.2.2 Condições de cultivo para a produção de enzimas por *A. niger* e *T. reesei* QM 9414 e Rut C-30

Vários meios de cultura encontram-se descritos na literatura para a produção das enzimas celulolíticas pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (STERNBERG e MANDELS, 1979; HENDY, 1994; KIM, 1997). Foram realizados testes comparando meios descritos na literatura e os propostos neste trabalho para *T. reesei* QM 9414 e Rut C-30 e para *A. niger*. Os resultados obtidos estão descritos nas Figuras 21, 22 e 23. e Tabelas 17 e 18 (Anexos).

Para a produção das enzimas de interesse por *T. reesei* QM 9414, os resultados mostraram que o melhor meio de cultura foi diferente para cada enzima, isto é, meios 1, 5, 4 e 6 para celulase, xilanase, β -glicosidase e poligalacturonase, respectivamente (Figura 21).

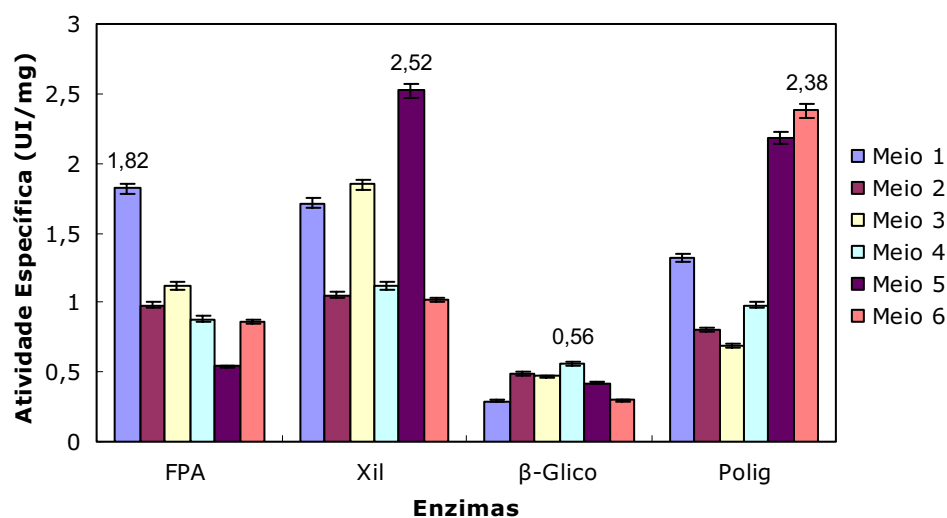


Figura 21: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *T. reesei* QM 9414 após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulase total; (xil) atividade de xilanase; (β-glico) atividade de β-glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

No entanto, para o *T. reesei* Rut C-30, o meio proposto número 6, se mostrou significativamente melhor para a produção das enzimas celulasas, xilanase e poligalacturonase. Para β-glicosidase, os meios 5 e 6 mostraram aproximadamente o mesmo nível de produção enzimática (Figura 22).

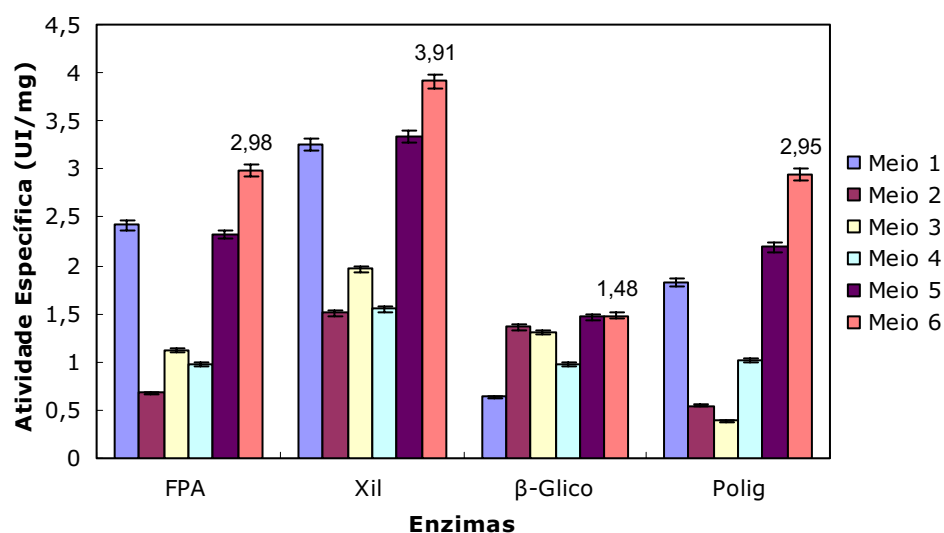


Figura 22: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *T. reesei* RUT C-30 após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulase total; (xil) atividade de xilanase; (β-glico) atividade de β-glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

A Figura 23 demonstra que para o fungo *A. niger* o meio de cultura 3 se mostrou eficaz para a produção da enzima xilanase, enquanto que o meio 4 mostrou uma maior produção das enzimas celulases, β -glicosidase e Poligalacturonase. Na Figura 24 observamos as características microscópicas dos microrganismos.

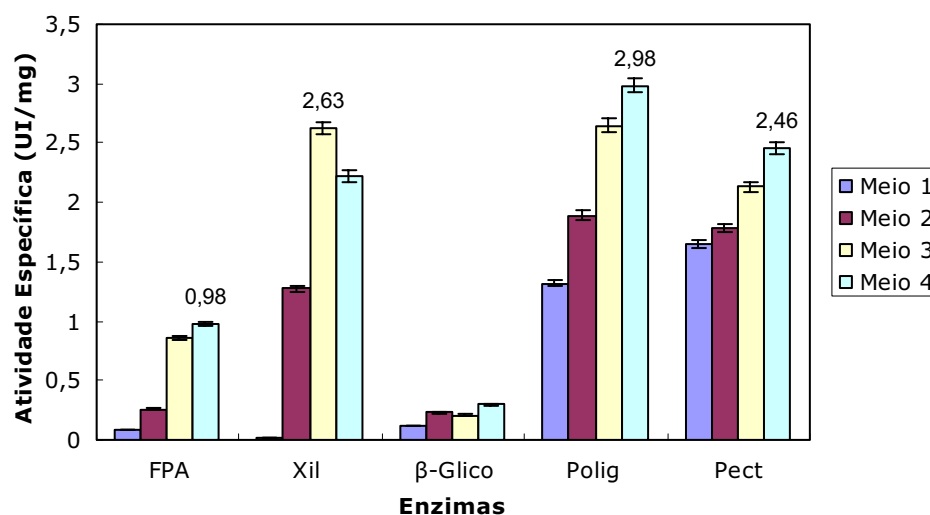


Figura 23: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *A. niger* após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulase total; (xil) atividade de xilanase; (β -glico) atividade de β -glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.



Figura 24: Visão microscópica dos fungos após 5 dias de incubação. (a) *T. reesei* QM 9414 crescendo no meio proposto 6 para *T. reesei*. (b) *T. reesei* Rut C-30 crescendo no meio proposto 6 para *T. reesei*. (c) *A. niger* crescendo no meio proposto 4 para *A. niger*.

5.3 Condições ideais para produção enzimática em biorreator

Os resultados descritos nas Figuras 25 a 28 e Tabelas 21 a 24 (Anexos) demonstram as melhores condições de produção das enzimas estudadas por *T. reesei* Rut C-30, em biorreator.

A avaliação realizada para a determinação do pH ideal para a produção das enzimas de interesse confirmou os dados encontrados na literatura (XIONG, 2003), indicando o pH 4,0 como o melhor (Figura 25). Nesta condição, os níveis enzimáticos obtidos foram 5,4; 7,7; 1,42; 1,50 e 2,65 vezes superiores aos do pH 5,0 para celulase, xilanase, β -glicosidase, poligalacturonase e pectinase, respectivamente.

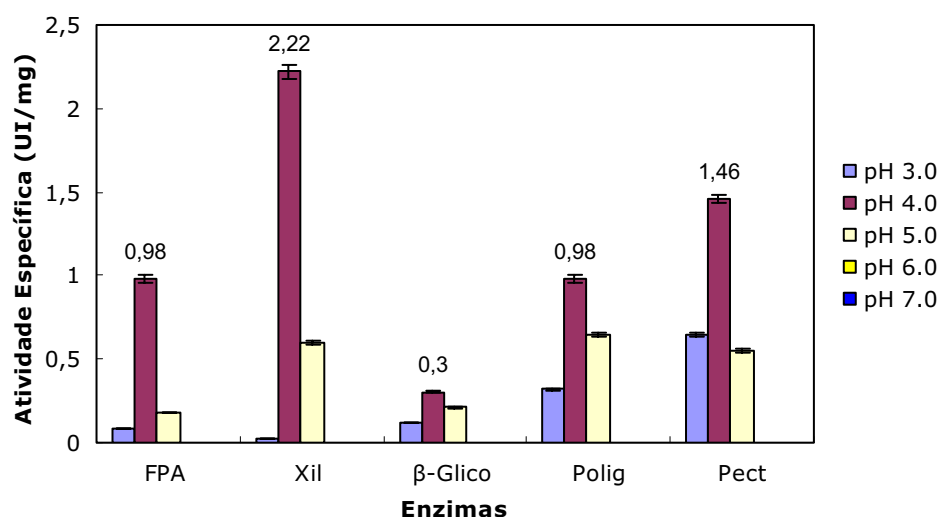


Figura 25: Efeito do pH na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulose total; (xil) atividade de xilanase; (β -glic) atividade de β -glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase; (Pect) atividade de pectinase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

A Figura 26 mostra a avaliação do efeito da temperatura para a produção das enzimas de interesse. Os nossos resultados indicaram a temperatura de 28° C como sendo a ideal. Nessas condições, os níveis enzimáticos foram 1,8; 1,34; 2,16; 2,8 e 1,71 vezes superior, aos obtidos quando a linhagem Rut C-30 foi crescida a 30° C, para a celulase, xilanase, β -glicosidase, poligalacturonase e pectinase, respectivamente. Os níveis enzimáticos de produção de celulase, xilanase, β -glicosidase e pectinase, em relação à temperatura de 28° C, foram inferiores quando a temperatura de fermentação foi 25° C. O mesmo nível de produção para a poligalacturonase foi atingido nesta temperatura.

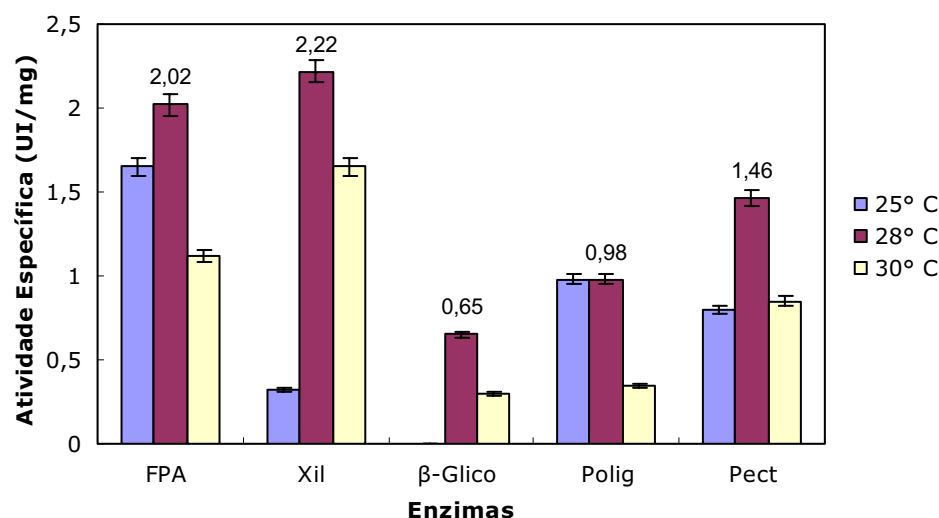


Figura 26: Efeito da temperatura na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulose total; (xil) atividade de xilanase; (β-glic) atividade de β-glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase; (Pect) atividade de pectinase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

Para a análise da influência da velocidade de agitação (Figura 27), os resultados demonstraram significativamente que a melhor velocidade de agitação do biorreator para a produção das enzimas de interesse foi 400 rpm. Foram obtidos níveis enzimáticos cerca de 2 vezes superior em relação a velocidade de 500 rpm para celulase, xilanase e poligalacturonase, 3,26 vezes acima para β-glicosidase. O menor aumento foi observado para pectinase, sendo 1,62 vezes.

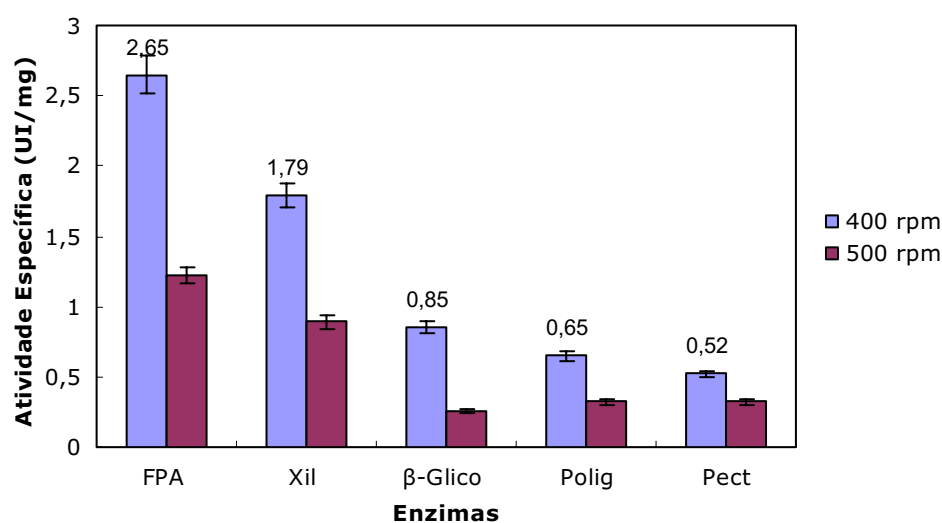


Figura 27: Efeito da velocidade de agitação na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulose total; (xil) atividade de xilanase; (β-glic) atividade de β-glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase; (Pect) atividade de pectinase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

A avaliação para a determinação da taxa de aeração para a produção das enzimas de interesse por *T. reesei* Rut C-30 mostrou produção significativamente maior quando se utilizou a taxa de 1,5 vvm (Figura 28). Os maiores aumentos nos níveis enzimáticos foram obtidos para β -glicosidase, xilanase, poligalacturonase e pectinase com níveis 3,84; 2,39; 2,08 e 1,91 vezes acima, respectivamente. O menor aumento foi de 1,34 vezes observado para a celulase.

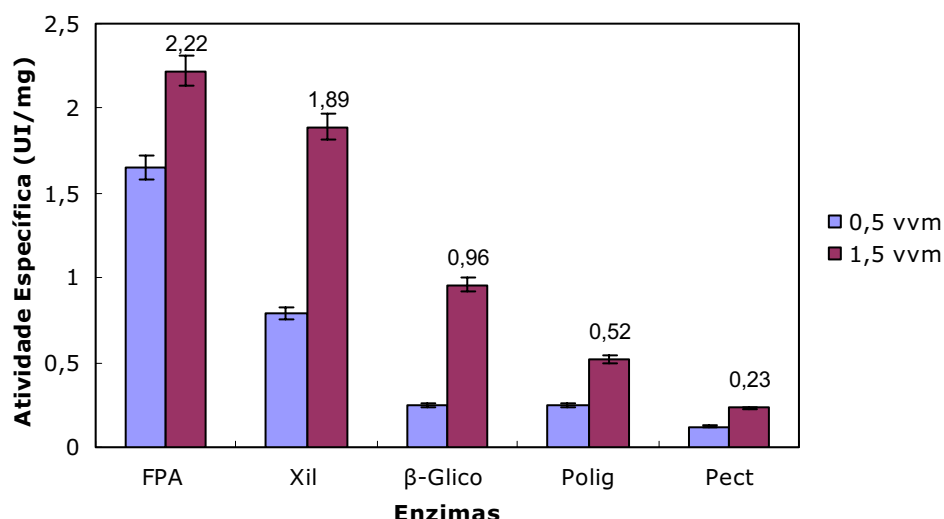


Figura 28: Efeito da taxa de aeração na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação. (FPA) atividade de celulose total; (xil) atividade de xilanase; (β -glic) atividade de β -glicosidase; (polig) atividade de poligalacturonase; (Pect) atividade de pectinase. pH 4,0; temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm.

5.4 Análise do perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do filtrado de cultura

A análise das proteínas contidas no EEB produzido em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, em diferentes tempos, está demonstrado na Figura 29. Todas as amostras apresentaram uma banda em aproximadamente 75 kDa, o que, segundo REINIKAINEN (1994), sugere a presença de β -D-glicosidase I. Observamos também na amostra 7 mais duas bandas: uma de aproximadamente 25 kDa, sugerindo a presença de Endoglucanase III, e outra de aproximadamente 55 kDa, que pode sugerir a presença de Endoglucanase I e IV e Celobiohidrolase II.

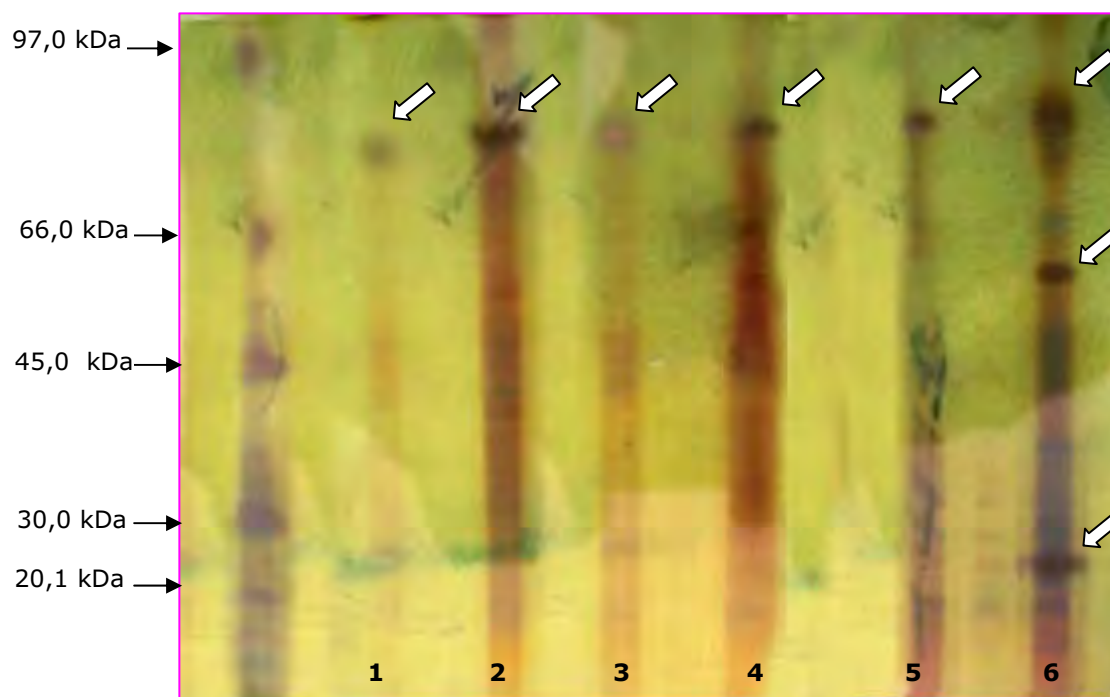


Figura 29: Perfil protéico da eletroforese do extrato enzimático bruto obtido de *T. reesei* Rut C-30 cultivado em frascos Erlenmeyer a 30° C em mesa de agitação orbital a 180 rpm. As setas indicam a posição das bandas. (1) t=2 dias; (2) t=3 dias; (3) t=4 dias; (4) t=5 dias; (5) t=6 dias (6) t=7 dias.

5.5 Análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos do EEB

Após a recuperação do EEB, foram realizadas análises para a determinação do pH e contaminação microbiana. O pH apresentou-se ligeiramente ácido e não foram detectados organismos contaminantes no biorreator. Os resultados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: pH e contaminação microbiana do EEB, após 7 dias de incubação em biorreator.

	pH	Fungos	Bactérias
<i>T. reesei</i> QM 9414	5,5	Ausentes	ausentes
<i>T. reesei</i> Rut C-30	5,7	Ausentes	ausentes
<i>A. niger</i>	6,0	Ausentes	ausentes

5.6 Efeito de íons e outras substâncias sobre atividade enzimática

As enzimas celulasas, xilanases e β -glicosidase produzidas por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 e QM 9414 foram misturadas a soluções contendo íons e agente quelante (Tabelas 8, 9 e 10).

Podemos notar na Tabela 8 para a cepa de *T. reesei* Rut C-30 que a atividade celulolítica aumentou, variando de 18,12% a 70,38% frente a todas as substâncias utilizadas. Os maiores níveis foram obtidos para Cu^{2+} , Mn^{2+} e EDTA. O Cloreto de ferro mostrou a menor ativação enzimática. A linhagem QM 9414 também mostrou maior atividade enzimática frente ao Cu^{2+} , seguido de Zn^{2+} e Mg^{2+} . As demais substâncias (Mn^{2+} , Ag^+ , EDTA e Fe^{3+}) inibiram a celulase com níveis variando de 0,53% a 19,05%. Para *A. niger* ocorreu ativação enzimática frente a Mg^{2+} , Ag^+ e Zn^{2+} , enquanto Mn^{2+} , EDTA, Cu^{2+} e Fe^{3+} tiveram a maior inibição sobre a celulase.

Na Tabela 9 podemos notar que para as linhagens QM 9414 e Rut C-30 todos os compostos ativaram a xilanase exceto o EDTA que apresentou inibição de 2,56% para Rut C-30. Para *A. niger* ocorreu grande ativação na presença de EDTA (130,81%), seguido de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ e Fe^{3+} . Houve inibição frente a Mn^{2+} e Mg^{2+} , sendo que este último afetou consideravelmente a atividade xilanolítica com inibição de 80,57%.

A atividade de β -glicosidase (Tabela 10), para a cepa Rut C-30 apresentou ativação frente a todas as substâncias testadas como ocorreu com a celulose. Os maiores níveis foram obtidos para Ag^+ , Zn^{2+} e Fe^{3+} . A menor atividade foi detectada na presença de EDTA. Para QM 9414 os maiores níveis foram obtidos para Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} . Os demais inibiram com níveis de 1,89% e 48,11% para Mg^{2+} e EDTA, respectivamente. Para *A. niger* a atividade de β -glicosidase sofreu maior ativação frente a Cu^{2+} , Ag^+ e Fe^{3+} , não foi alterada pela presença de EDTA e sofreu inibição por Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (10,53%, 36,84% e 42,11%), respectivamente.

Tabela 8: Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de celulase total produzida por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.

<i>Interferente</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>		
	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i> Rut C-30	<i>T. reesei</i> QM 9414
Controle	100	100	100
ZnCl ₂	100,77	139,37	100,79
MgSO ₄ .7H ₂ O	111,97	135,54	101,59
MnSO ₄ .H ₂ O	89,58	162,02	99,47
CuSO ₄ .5H ₂ O	78,76	170,38	124,34
FeCl ₃	75,68	118,12	80,95
AgNO ₃	103,47	142,51	98,15
EDTA	87,26	155,75	85,45

Tabela 9: Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de xilanase produzida por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.

<i>Interferente</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>		
	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i> Rut C-30	<i>T. reesei</i> QM 9414
Controle	100	100	100
ZnCl ₂	164,93	116,28	111,02
MgSO ₄ .7H ₂ O	19,43	110,47	139,37
MnSO ₄ .H ₂ O	95,73	154,88	189,76
CuSO ₄ .5H ₂ O	161,61	180,47	124,41
FeCl ₃	150,71	130,47	100,00
AgNO ₃	161,61	179,07	107,09
EDTA	230,81	97,44	128,35

Tabela 10: Efeito de íons e outras substâncias sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 e QM 9414 em biorreator nas condições ideais.

<i>Interferente</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>		
	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i> Rut C-30	<i>T. reesei</i> QM 9414
Controle	100	100	100
ZnCl ₂	89,47	109,23	136,32
MgSO ₄ .7H ₂ O	63,16	106,08	98,11
MnSO ₄ .H ₂ O	57,89	110,74	100,47
CuSO ₄ .5H ₂ O	131,58	106,68	136,32
FeCl ₃	115,79	108,56	103,77
AgNO ₃	121,05	118,17	173,11
EDTA	100,00	103,23	51,89

5.7 Análise da termoestabilidade das enzimas

A estabilidade térmica das celulasas produzidas pelas linhagens QM 9414 e Rut C-30 foram comparadas com uma enzima obtida comercialmente (C8546-10KU, Sigma®). Os resultados demonstraram que as celulasas produzidas por *T. reesei* Rut C-30 apresentaram maior termoestabilidade em quase todos os tratamentos térmicos. O menor tempo de tratamento para essas enzimas também ocasionou menor perda de atividade enzimática em relação às enzimas produzidas pelo mutante QM 9414 ou a obtida comercialmente.

Os resultados das Figuras 30 e 31 também demonstraram que as enzimas de QM 9414 e de Rut C-30, na temperatura de 60° C, após 1 hora de tratamento térmico, apresentaram perda mínima da atividade enzimática, porém, a enzima comercial teve pequena perda de atividade até 30 minutos, visto que com 1 hora do tratamento apresentou 14.83% da perda. Na temperatura de 65° C, após 10 minutos de tratamento, a perda da atividade enzimática nas três amostras foi 57,73%, 31,27% e 51,90% para QM 9414, Rut C-30 e enzima comercial respectivamente (Figuras 30, 31 e 32).

Nesta temperatura (65° C), podemos notar que as enzimas produzidas pela linhagem QM 9414 e a comercial apresentaram termoestabilidade bastante semelhante nos outros tempos de tratamento térmico.

A amostra produzida por *T. reesei* QM 9414 produzida em biorreator e a comercial, quando submetidas ao tratamento de 70° C, por 1 hora, apresentaram níveis semelhantes de perda da atividade enzimática que foram acima de 50%. Entretanto, a enzima produzida pela linhagem Rut C-30 mostrou perda de atividade em torno de 30-35%, independente do tempo de tratamento (Figuras 30, 31 e 32 e Tabela 25 em Anexos).

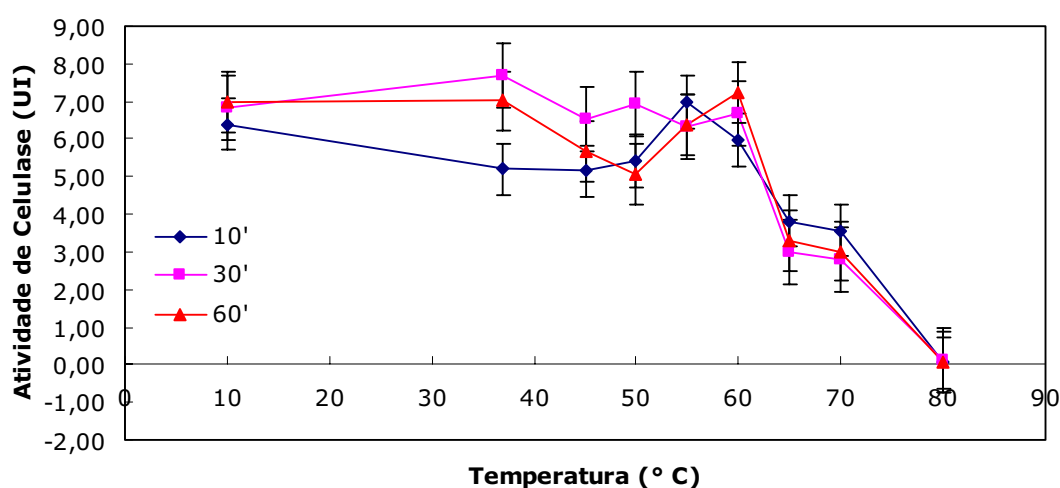


Figura 30: Termoestabilidade da enzima celulase produzida por *T. reesei* QM 9414 em biorreator, após 7 dias de incubação.

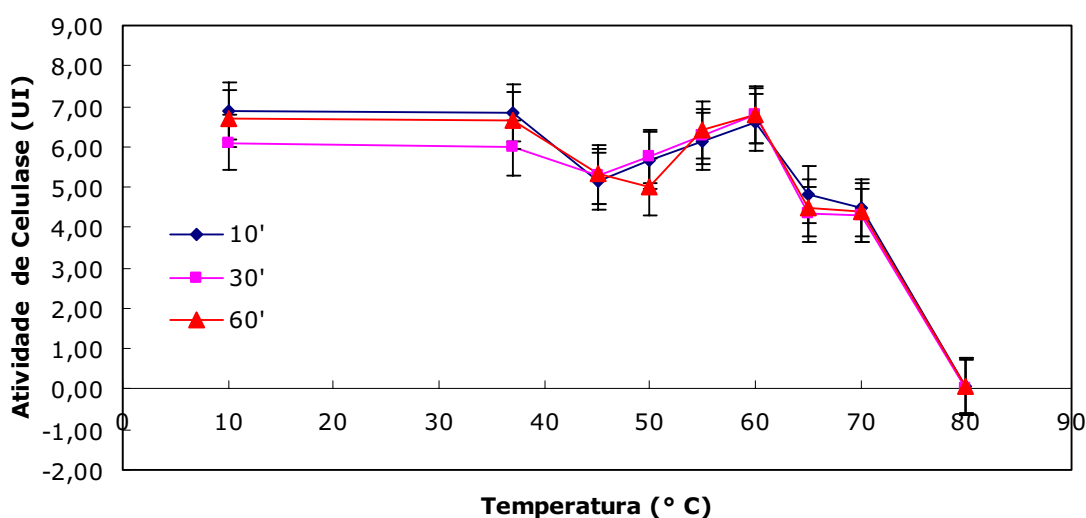


Figura 31: Termoestabilidade da enzima celulase produzida por *T. reesei* Rut C-30 em biorreator, após 7 dias de incubação.

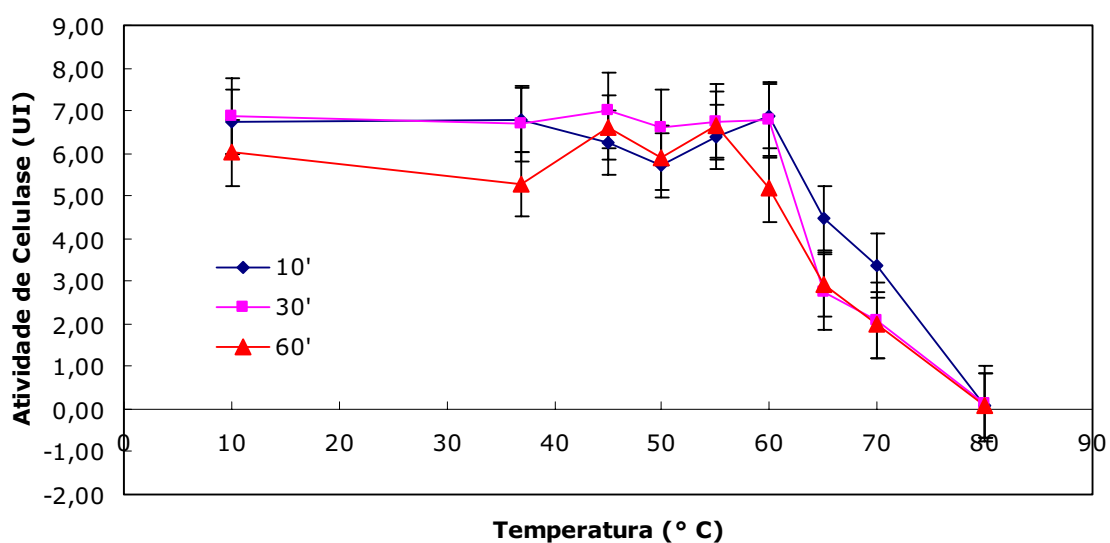


Figura 32: Termostabilidade da enzima celulase obtida comercialmente (C8546-10KU, Sigma®).

5.8 Determinação da concentração enzimática para a extração dos óleos

A concentração de enzimas utilizada na extração dos óleos essenciais foi 1% (g/m vegetal). Foram realizados também ensaios utilizando outras concentrações de enzimas na extração de óleo de *M. spicatta* a fim de se determinar as concentrações mínimas de enzimas necessárias para aumentar o rendimento da extração. Foram utilizados os EEBs obtidos da produção em biorreator nas condições ideais para *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 em partes iguais. As concentrações de enzimas utilizadas e os respectivos rendimentos estão representados na Tabela 12.

Tabela 11: Máxima produção de proteínas e das enzimas celulase, xilanase e pectinase produzidas por *A. niger* e *T. reesei* Rut C-30 em biorreator, após 7 dias de incubação nas condições ideais*.

	Atividade Específica (U/mg)		
	Celulase	Xilanase	Pectinase
<i>A. niger</i>	1,21 ± 0,04	2,96 ± 0,009	4,2 ± 0,023
<i>T. reesei</i>	2,01 ± 0,018	1,79 ± 0,015	0,2 ± 0,003
Total	3,22	4.75	4.4

* Meio 6, pH 4.0, 30° C, 1,5 vvm e 400 rpm.

Tabela 12: Concentração de enzimas e aumento do rendimento de óleo essencial de *Mentha spicata*.

Concentração de enzimas (%) (g/m vegetal)	Aumento do rendimento (%)
1,0	52,20
0,5	45,48
0,25	48,01
0,13	46,20
0,06	37,18
0,03	28,66

5.9 Extração enzimática de óleos essenciais

Os experimentos de aumento do rendimento de óleos essenciais realizados com *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* demonstraram 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 (Tabelas 13 e 14). Os procedimentos de extração foram realizados após tratamento com a máxima atividade enzimática.

Tabela 13: Aumento do rendimento de óleo essencial de *M. divaricatum*, após 1h de tratamento enzimático.

Amostra	Rendimento (g)		Aumento do rendimento (%)
	sem tratamento enzimático	com tratamento enzimático	
1	0,0116	0,0187	61,4
2	0,0182	0,0287	57,7
3	0,0168	0,0292	73,8
Média	0,0155	0,0255	64,3

Tabela 14: Aumento do rendimento de óleo essencial de *M. spicata*, após 1h de tratamento enzimático.

Amostra	Rendimento (g)		Aumento do rendimento (%)
	sem tratamento enzimático	com tratamento enzimático	
1	0,0289	0,0467	61,59
2	0,0312	0,0477	52,84
3	0,0277	0,0423	52,70
Média	0,0292	0,0455	55,71

5.10 Análise cromatográfica do óleo essencial

5.10.1 Análise dos óleos essenciais de *M. divaricatum* e *M. spicata* por CG/EM

Nas Tabelas 15 e 16 observamos a concentração (%) dos compostos encontrados nos óleos essenciais de *M. spicata* e *M. divaricatum* antes e após o tratamento enzimático. Foram identificados 96,97% dos compostos presentes no óleo de *M. spicata* e 84,36% de *M. divaricatum*.

Para *M. spicata*, a Carvona foi o composto majoritário com uma concentração de 59,12% do óleo extraído sem tratamento enzimático e 55,36% no óleo extraído com tratamento enzimático. O composto Dihidrocarvenol estava presente com 6,27% no óleo sem tratamento e com 6,48% no óleo com tratamento enzimático. O Limoneno e o 1-8 Cineole presentes no óleo sem tratamento com 5,07 e 5,42%, respectivamente, tiveram queda no teor para 4,35 e 4,80%, respectivamente, no óleo obtido com tratamento enzimático.

Tabela 15: Concentração (%) dos compostos identificados no CG/EM do óleo essencial de *M. spicata* de amostras frescas com e sem tratamento enzimático.

Composto	Tempo retenção (min)	Partes aéreas (%)	
		Frescas c/ tratamento	Frescas s/ tratamento
α -pineno	13,7	0,99	0,91
β -pipeno	17,1	0,10	0,09
Sabineno	17,2	1,15	1,15
Mirceno	17,4	0,70	0,84
α -terpineno	18,1	0,34	0,45
Limoneno	18,8	4,35	5,07
1,8 cineole	20,1	4,80	5,42
β -phellandreno	20,3	0,17	0,07
(Z)- β -ocimeno	20,6	0,12	0,14
1-octen-3-ol	21,1	0,11	0,08
<i>trans</i> -sabinene hidrato	21,5	0,43	0,53
<i>cis</i> -sabinene hidrato	23,0	0,30	0,38
Linalol	23,6	0,08	0,06
Terpinen-4-ol	23,8	0,53	0,60
β -caryophylleno	24,1	0,90	0,90
<i>trans</i> -dihidrocarvono	24,3	0,15	0,12
<i>cis</i> -dihidrocarvono	24,5	3,34	4,90
α -terpineol + borneol	25,6	0,45	0,83
Acetato de Dihidrocarvil	25,8	0,19	0,19
Germacreno D	27,4	1,70	1,76
Carvona	29,0	55,36	59,12
Dihidrocarvenol	32,3	6,48	6,27
Neoisodihidrocarveol	32,4	2,0	2,11
Acetato <i>trans</i> -carvil	33,1	0,30	0,24
<i>trans</i> -carveol	33,5	0,69	0,68
<i>cis</i> -carveol	33,6	3,0	3,90
<i>cis</i> -jasmono	34,1	0,15	0,16

Para a *M. divaricatum*, o composto majoritário é o *trans*-cariofileno, contribuindo com 48,59% do óleo nas partes aéreas secas. No óleo extraído das partes aéreas frescas com e sem tratamento enzimático contribui com valores menores: 36,78 e 39,94%, respectivamente. O composto Germacreno D, que estava presente com 13,18% nas partes aéreas secas, apresenta queda para 8,9 e 12,13% respectivamente. Bicyclogermacreno, presente com 10,60%, apresentou queda nos teores, contribuindo com 6,2 e 8,73%, respectivamente. Entre os compostos minoritários houve o aparecimento de alguns e variações nos teores de outros.

Tabela 16: Concentração (%) dos compostos identificados no CG/EM do óleo essencial de *M. divaricatum* de amostras secas e frescas com e sem tratamento enzimático.

Composto	Tempo retenção (min)	Partes aéreas (%)		
		Secas	Frescas c/ tratamento	Frescas s/ tratamento
1,8 Cineol	8,0	0,01	-	-
n-Decanal	14,9	0,01	-	-
Eugenol	21,0	0,05	-	-
α -Copaeno	22,0	0,02	-	-
β -Bourboneno	22,3	0,65	1,06	0,59
β -elemeno	22,6	1,02	0,81	0,96
trans-cariofileno	23,9	48,59	36,78	39,94
β -Cedreno	24,1	0,07	-	-
Trans-alfa-Bergamoteno	24,4	0,44	0,20	0,25
Aromadendreno	24,6	0,04	-	-
β -Gurjuneno	24,9	0,11	0,20	-
α -Humuleno	25,3	2,17	1,34	1,82
Alloaromadendreno	25,4	0,01	0,70	-
α -Amorfenol	26,1	0,07	-	0,06
Germacreno D	26,4	13,18	8,90	12,13
β -Selineno	26,6	0,02	-	-
Ledeno	26,7	0,03	0,37	-
Biciclogermacreno	26,9	10,60	7,21	8,73
α -Muuroleno	27,1	0,04	-	-
Germacreno A	27,4	0,84	0,59	0,62
γ -Cadineno	27,6	0,04	-	-
δ -Cadineno	27,8	0,11	0,30	0,18
Nerolidol	28,1	0,11	-	0,09
Germacreno B	29,4	0,33	0,28	0,32
d-Nerolidol	29,6	0,31	0,15	0,24
Longipinocarvono	29,9	0,25	0,30	0,21
Espatulenol	30,1	0,87	0,89	1,62
Óxido de Cariofileno	30,3	3,00	1,76	2,28
Viridiflorol	30,8	0,08	0,60	0,10
α -Cadinol	33,1	1,15	0,57	0,28
Z,E-Farnesil Acetato	39,6	0,14	-	0,10
Octadecanol Acetato	59,6	-	0,13	0,08

Os resultados da análise dos óleos com e sem tratamento enzimático, quando avaliados estatisticamente pelo método ANOVA, não apresentaram diferenças significativas.

5.10.2 Análise cromatográfica (CCD) do óleo de *M. spicata* e *M. divaricatum*

Os resultados obtidos estão apresentados Figura 33. Comparando amostras de *M. divaricatum* com e sem tratamento enzimático, as manchas majoritárias apresentaram os seguintes valores de fator de retenção (Rf): 0,61; 0,48; 0,38; 0,24; e 0,20. Para *M. spicata* os valores de Rf obtidos foram: 0,60; 0,46; 0,36; 0,27 e 0,18.

Em ambas as espécies, não observamos alterações nos valores de Rf, sugerindo a manutenção da composição majoritária do óleo. Entretanto, na análise do óleo de *M. spicata*, podemos observar o aumento do tamanho das manchas com valores de Rf 0,46 e 0,36.

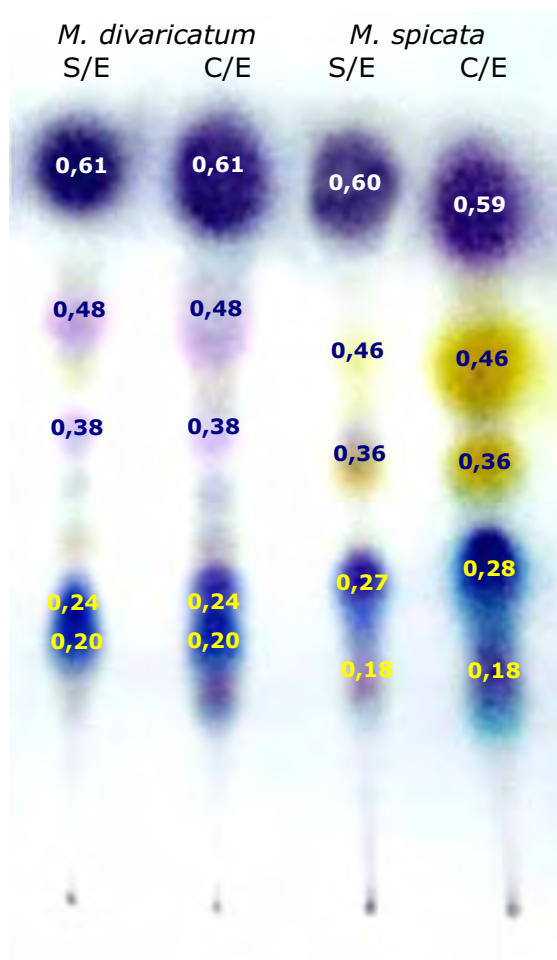


Figura 33: Compostos encontrados em CCD* de *M. divaricatum* e *M. spicata* com seus respectivos Rf's. S/E = sem tratamento enzimático C/E= com tratamento enzimático. * Concentração da amostra: 1:10 em tolueno; Volume aplicado: 10 µL; Fase móvel: tolueno:acetato de etila (93:7).

6. DISCUSSÃO

O Brasil ocupa uma posição privilegiada, tanto em termos de biodiversidade quanto em capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala (SANTOS, 2005). Em relação à tecnologia enzimática, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada em processos fermentativos e extrativos e enorme quantidade de biomassa a ser transformada por via enzimática em produtos diversificados e de maior valor agregado (SAID e PIETRO, 2004). O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da indústria, mostram perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas (COURI, 1998).

A biodiversidade da flora existente no Brasil e, em particular, na floresta amazônica, representa um grande potencial para o estudo fitoquímico, porém tal estudo deve ser realizado com responsabilidade, de modo a não acarretar o desaparecimento de suas espécies (INNOCENTINNI, 2000). Tomando como exemplo as espécies produtoras de óleos essenciais, de acordo com a família que pertencem, essas espécies acumulam esse óleo em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista da exploração da biodiversidade vegetal, quando esse órgão representa um substrato renovável (resina, folha, flor, fruto ou semente), é possível extrair-se o óleo essencial sem eliminar a planta. Isso a torna uma fonte de óleo ecologicamente correta (SIANI, et al, 2000).

O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente na última década e foi aplicado para todas as oleaginosas de interesse comercial, como mostrado nos trabalhos de revisão publicados por DOMINGUEZ et al. (1994) e FREITAS et al. (1996). A aplicação desta tecnologia está restrita, no entanto, à área alimentícia, como por exemplo, a obtenção de óleo de oliva. Esse óleo tem longa tradição na alimentação humana e a aplicação de enzimas em escala industrial representou uma contribuição da tecnologia para aumentar a quantidade e estabilidade do óleo extra-virgem, obtido na primeira prensagem do fruto (CHRISTENSEN, 1991).

Poucos dados estão disponíveis sobre a aplicação de enzimas na extração de óleos essenciais para uso na indústria farmacêutica, sendo esse um dos motivos pelo qual este trabalho foi realizado.

A primeira decisão para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas é a seleção da linhagem do microrganismo. A linhagem deve ser estável, com reprodutibilidade nas condições de cultivo e de esporulação. Deve ser considerado seu potencial de síntese de toxinas, seu grau de pureza, sua capacidade de crescer em meios simples e baratos e sua estabilidade genética. Geralmente, o microrganismo isolado de uma fonte natural pode produzir a enzima desejada, porém em níveis economicamente inviáveis. O melhoramento genético, tanto através de técnicas de DNA recombinante quanto através de técnicas de indução de mutação por agentes químicos e físicos, pode ser também uma etapa essencial no desenvolvimento do processo (COURI, et al., 2003).

Trichoderma reesei é um dos microrganismos mais eficientes para a produção de celulase e xilanase (XIONG, 2004). Vários mutantes foram criados a partir do tipo selvagem QM6a, entre eles QM9414 e Rut C-30. Na análise de produção das enzimas estudadas neste trabalho, pudemos comparar a produção entre as cepas QM9414 e Rut C-30. Na análise inicial de produção enzimática em agitador orbital, no meio de cultivo proposto, o mutante Rut C-30 apresentou os melhores resultados, o que fez com que fosse escolhido para as demais padronizações envolvendo produção das enzimas celulolíticas. Entre os muitos mutantes do *T. reesei*, o Rut C-30 é uma cepa amplamente estudada e da qual dispõe-se muitos dados que indicam alto nível de produção enzimática (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1979; BADER, 1993). Ela cresce em uma única fonte de carbono, como celulose ou xilose, e secreta ambas, celulase e xilanase. Além disso, produz enzimas mais eficientemente do que o tipo selvagem. A expressão para celulase em Rut C-30 não é reprimida por glicose, como ocorre em outras cepas (DOMINGUES et al, 2000).

A cepa de *T. reesei* Rut C-30 é altamente utilizada industrialmente e a mutação envolvendo a ausência de repressão catabólica para glicose está no gene *cre1*, normalmente relacionado com a repressão catabólica por glicose (ILMÉN et al, 1996). No nosso trabalho, a maior produção enzimática comparando-se *T. reesei* QM 9414 crescendo em agitador orbital ou biorreator ocorreu neste último. A comparação de crescimento entre as 2 linhagens de *T. reesei* mostrou que o meio 6 propiciou maior crescimento e o máximo de biomassa foi obtido no 10º dia. Quando a produção enzimática foi comparada entre ambas as cepas, *T. reesei* Rut C30 se mostrou mais eficiente para todas as enzimas testadas.

Outro fator determinante na produção enzimática é o meio de cultura. Na maioria dos estudos da produção de celulase por *Trichoderma*, materiais celulósicos são utilizados como substrato (SUTO e TOMITA, 2001). Entretanto, a quantidade elevada desses materiais em biorreatores dificulta a agitação, abaixando a disponibilidade de oxigênio e, em alguns casos, absorvendo enzimas (OASHIMA et al, 1990).

Na obtenção de enzimas, a fonte de carbono exerce um papel importante na produção final. A maioria dos estudos realizados com *T. reesei* para a produção de celulase e xilanase usou materiais celulolíticos como indutores. Entretanto, comprovou-se que uma quantidade elevada desses materiais levaria à absorção de enzimas pelos mesmos. A produção de enzimas celulolíticas é induzida por mono e dissacarídeos como a L-sorbose. Como fontes de nitrogênio, normalmente são utilizados sulfato de amônio, uréia, extrato de levedura e peptona (XIONG, 2004).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, diversos outros fatores devem ser considerados para a projeção de melhores condições de cultivo. As modificações fisiológicas e morfológicas do *T. reesei* influenciam na produção de enzimas. Relatou-se que somente o segundo estágio de crescimento do fungo *T. reesei* pode produzir enzimas e a fase miceliar preliminar não secreta enzimas eficientemente (MANDELS e WEBER, 1969).

Segundo STERNBERG e MANDELS, 1979, a celulose, como fonte de carbono, é um ótimo indutor de celulase em *T. reesei*. Além da fonte de carbono, a fonte de nitrogênio disponível também apresenta um papel importante na secreção de celulase, se utilizado na concentração máxima de 0,2%. O uso de surfactantes, como Tween 80, aumenta de 2 a 17 vezes a secreção de celulase em *T. reesei* (REESE, E.T., 1972).

A análise das condições de cultivo para a produção de enzimas celulolíticas pela linhagem QM 9414 de *T. reesei* mostrou variações na maior produção dependendo do meio. A celulase teve maior nível de produção no meio 1, enquanto a xilanase teve no meio 5. Os meios 4 e 6 foram os de maior nível enzimático para a β -glicosidase e poligalacturonase, respectivamente. Para o mutante Rut C-30 o meio proposto por nós permitiu a obtenção dos maiores níveis para todas as enzimas.

Os resultados obtidos no teste de produção das enzimas celulolíticas em 6 diferentes meios de cultura demonstraram que o meio de cultura 6, que foi proposto neste trabalho, apresentou uma produção de celulase 23,14 %, xilanase 20,3 % e β -glicosidase 131,25 % maiores em relação ao meio 1, um dos mais utilizados para a produção de celulases (DOMINGUES, et al, 1999, CHAND, et al, 2004). Foi utilizado no meio 6 Lactose na concentração de 10,0 g.L⁻¹, o que segundo XIONG (2004) é suficiente para aumentar a produção de xilanase em *T. reesei* Rut C-30.

Foi testado também o uso do sistema de "Fed-batch" ou realimentação, onde houve a adição posterior de meios nutrientes altamente concentrados no biorreator sem nenhuma remoção do meio inicial. Essa operação pode manter os níveis de nutrientes constantes para minimizar a repressão metabólica ou para estender a fase estacionária para obter o produto desejado (XIONG, 2004). A produção das enzimas por *T. reesei* Rut C-30 aumentou significativamente com o uso de "Fed-batch", com o meio proposto número 6.

Sabe-se que quando induzido, *Aspergillus niger* é capaz de produzir e secretar celulase, carboximetilcelulase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e pectinase em fermentações submersas (KIM et al, 1997). A síntese de celulase pode ser induzida por muitos açúcares oligoméricos e diméricos (MAGNELLI e FORCHIASSIM, 1999). Quatro meios de cultura foram avaliados neste trabalho, três já descritos e um proposto. Os resultados mostraram aumento na produção da ordem de 49,1 % para pectinase e 125,7 % para Poligalacturonase, quando comparados ao meio 1. O meio 4 utilizou 7,0 g.L⁻¹ de pectina cítrica e 10,0 g.L⁻¹ de glicose, e, segundo FONTANA et al, 2005, quando pectina é utilizada na concentração de 16% e glicose na concentração de 10%, ocorre ótima indução de poligalacturonase em *A. niger*.

O uso do biorreator para a produção de enzimas possui uma série de vantagens quando comparado à fermentação em frascos Erlenmeyer. O principal fator que os diferencia é o controle de vários parâmetros que influenciam diretamente a produção, como pH do meio, temperatura, aeração e agitação. Inúmeros trabalhos referentes à produção de enzimas celulolíticas utilizam frascos de Erlenmeyer, porém, um número bem menor utiliza o biorreator para o mesmo fim. Os fatores que determinam essa menor utilização incluem a dificuldade de produção em condições de esterilidade, o ajuste dos parâmetros ideais e possivelmente seu alto custo. Porém, quando existe objetivo de

escalonamento de produção, o uso do biorreator é imprescindível. Nos testes de comparação da produção de enzimas em frascos Erlenmeyer e em biorreator, ficou evidente a vantagem da utilização do biorreator, com diferenças de 169,0 % na produção de celulase.

Quando biorreatores são utilizados no cultivo de fungos filamentosos para a produção das enzimas industriais, a taxa de agitação e os níveis de aeração podem influenciar no crescimento do fungo e na secreção de enzimas. A ruptura brusca age sobre a morfologia dos fungos filamentosos e na produtividade (ILIAS E HOQ, 1998; GIBBS, et al., 2000).

Sabemos que a força ácida do meio de cultura pode interferir tanto no crescimento do microrganismo como na produção de enzimas. Tem-se observado que em pH 3,0 as celulasas são inativadas, sendo que para *T. reesei*, o pH ótimo para crescimento está em torno de 4.0, enquanto que para produção de celulasas o ideal é em torno de 3.0 (BROW e HALSTED, 1975). Nos experimentos para determinação de melhor pH, os resultados apontaram para o pH 4.0 como sendo o melhor para a produção das enzimas estudadas.

Outro importante parâmetro para o cultivo fúngico, visando à produção enzimática, é a temperatura. Para *T. reesei* a faixa de temperatura ótima de crescimento está entre 32-35° C, enquanto a temperatura de produção da enzima está entre 25-28° C. A programação da temperatura em cultivos pode ser utilizada para otimizar tanto o crescimento celular como a produção de celulasas, uma vez que a fase de crescimento antecede à de secreção de celulasas (RYU e MANDELS, 1980). Os resultados obtidos nas análises da influência de temperatura mostraram que a melhor temperatura para a produção das enzimas estudadas foi de 28° C.

Foi demonstrado na literatura (LEJEUNE et al., 1995) que a produção de enzimas por *T. reesei* QM 9414 foi gravemente afetada pela agitação quando lactose foi utilizada como substrato, a uma velocidade de 300 rpm, não havendo produção de xilanase, provavelmente devido ao estresse causado pelo cisalhamento do micélio. Os autores demonstraram que a velocidade ótima de produção foi de 200 rpm e quando celulose microcristalina foi utilizada como substrato, a velocidade de agitação foi ótima em 300 rpm para a produção de celulase e 400 rpm para a produção de xilanase. As partículas de celulose insolúvel pareciam ter um efeito protetor sobre o micélio. Em nosso trabalho, os

resultados mostraram que a 400 rpm a produção das enzimas foi consideravelmente maior do que a 500 rpm.

O efeito da saturação de oxigênio foi estudado para *T. reesei* Rut C-30 crescido em 1% celulose ou xilana (SCHAFNER e TOLEDO, 1992). Os níveis de enzimas extracelulares e proteínas não foram afetados pelo oxigênio com níveis de 20% ou mais, mas foram severamente reduzidos a 10% de saturação de oxigênio. Os baixos níveis de oxigênio dissolvido, ou mesmo a ausência de oxigênio, não influenciaram na produção de xilanase por *T. lanuginosus* (PURKARTHOFFER et al., 1993). A variação das taxas de aeração de 0,5 a 1,5 vvm mostrou atividade ligeiramente superior de xilanase quando a aeração foi aumentada de 0,5 para 1,0 vvm, enquanto que na maior taxa de aeração, 1,5 vvm, a produção de xilanase foram significativamente reduzidos (HOQ et al., 1994). Os nossos resultados obtidos no estabelecimento de condições de aeração relevaram aumento significativo na produção das enzimas quando utilizada a taxa de 1,5 vvm de aeração.

O efeito de íons e EDTA sobre a atividade das enzimas produzidas pelos 3 fungos mostrou que as atividades enzimáticas sofreram variações nos níveis ativando ou sendo inibidas dependendo do interferente testado. As enzimas de *T. reesei* Rut C-30 foram exceção pois foram ativadas frente a todos os íons, embora a xilanase tivesse sofrido pequena inativação (2,56%) frente ao EDTA. Estas considerações são importantes para o uso de preparações enzimáticas, pois a presença de determinados íons ou agentes quelantes podem influenciar na ação esperada. Segundo AKIABA et al, 1994, a atividade de celulase de *A. niger*, quando purificada, não foi afetada na presença dos íons Mn^{2+} e Zn^{2+} de modo diferente do que ocorreu na enzima produzida pela cepa testada. Segundo PITSON et al, 1997, o íon Mg^{2+} aumentou em 19% a atividade de β -glicosidase de fungos filamentosos. Somente a β -glicosidase produzida por *T. reesei* Rut C-30 teve aumento na presença de Mg^{2+} enquanto que as produzidas por *T. reesei* QM 9414 e *A. niger* sofreram inibição.p

Além dos fatores que influenciaram a produção de enzimas, é importante um conhecimento maior a respeito dos dados de termoestabilidade quando o objetivo é a aplicação industrial das enzimas. Tem se acumulado durante anos uma grande quantidade de informação sobre os fatores relacionados com a termoestabilidade de proteínas (LEHMANN E WYSS, 2001; VAN DEN BURG E EIJSINK, 2002; FÁGÁIN, 2003). As informações foram recolhidas pelos estudos

da comparação entre as estruturas de proteínas mesófilas e termófilas, comparação estatística da composição dos aminoácidos que as compõem e estudos de metagêneses de um grande número de diferentes proteínas, incluindo muitas enzimas industriais. Para melhorar a termoestabilidade da proteína, é importante encontrar os pontos fracos na estrutura protéica, que permitem revelar os sítios susceptíveis à elevação de temperatura. Simulações por computadores podem ser úteis para encontrar esses sítios. Esta informação é então usada para planejar mutações sítio-dirigidas em proteínas mesófilas. Em nosso trabalho, os ensaios de termoestabilidade realizados comparando as celulasas produzidas por *T. reesei* e uma celulase obtida comercialmente revelaram que ambas mantêm suas atividades até 60° C. Porém, as enzimas produzidas nesse trabalho, em biorreator, demonstraram resistir às temperaturas mais elevadas (65 – 75° C) e por mais tempo, em torno de uma hora, enquanto que a enzima comercial perdeu cerca de 50% de sua atividade a partir de 30 minutos de exposição à temperatura de 65° C e 70% de perda na temperatura de 70° C.

Conseguimos demonstrar em eletroforese de proteínas bandas com pesos moleculares aproximadamente semelhantes às enzimas β -glicosidase, endoglucanase I e IV.

As condições estabelecidas como as melhores para produção enzimática foram mantidas suficientemente estáveis nas condições de fermentação, o que garantiu a possibilidade do uso do extrato enzimático bruto na fase de aplicação para extração de óleos vegetais.

A aplicação de enzimas na extração de óleos vegetais só é viável quando utilizada em concentração inferior a 0,1% em relação ao peso da matéria-prima (FREITAS e COURI, 2002). Isso ocorre devido ao custo elevado das enzimas purificadas. Um dos objetivos desse trabalho foi a melhoria da produção das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, a fim de se tornar viável seu uso na extração de óleos vegetais, em escala industrial. Portanto, foi necessário o ajuste de alguns parâmetros importantes para a produção de enzimas em biorreatores: pH do meio, temperatura, aeração e agitação. As condições ideais para a produção de enzimas em biorreator para a linhagem Rut C-30 mostrou melhores níveis em pH 4,0, temperatura de 28° C, velocidade de agitação de 400 rpm e aeração de 1,5 vvm.

As condições de produção enzimática estabelecidas em nosso trabalho foram diferentes das utilizadas por KIM et al (1996), que utilizou *Aspergillus niger* KKS crescendo em biorreator com temperatura de 30° C, taxa de aeração de 1,0 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm. A atividade de xilanase obtida em nosso trabalho foi menor quando comparada ao trabalho de KIM et al (1996), porém as atividades de celulase foram maiores. Da mesma forma, quando comparadas às condições de produção enzimática produzida por XIONG (2004), que utilizou *T. reesei* Rut C-30 crescendo em biorreator com temperatura de 28° C, taxa de aeração de 1,0 vvm e velocidade de agitação de 400 rpm, os resultados obtidos em nosso trabalho foram menores para xilanase e maiores para celulase.

Trabalhos de utilização de enzimas no processamento de oleaginosas têm sido publicados: FREITAS, 1996; SHANKAR, 1997; SANTOS, 2005. Porém, os trabalhos têm se concentrado na utilização das enzimas em óleos vegetais para a indústria de alimentos. A partir das observações feitas sobre a acumulação do óleo nos espaços intracelulares em células vegetais, os pesquisadores têm estudado substâncias capazes de afetar a estrutura das células com objetivo de melhorar a extração de óleo, mas a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso. Poucos são os trabalhos que investigam o uso de enzimas para a extração de óleos de interesse e aplicação na área farmacêutica.

Existem no mercado produtos contendo enzimas celulolíticas em altas concentrações, como Celluclast® (Novozymes®), Econase CE® (Röhm Enzymes®) e Spezyme CP® (Genecor®). Porém, seus altos custos os tornam inviáveis para aplicações em plantas com baixo rendimento de óleo. Os resultados da aplicação das enzimas produzidas em biorreator contidas no extrato enzimático bruto na extração de óleos essenciais de duas espécies vegetais demonstraram um aumento médio de 60% no rendimento do óleo. Em nosso trabalho, as condições de extração de óleos auxiliada pelas enzimas fúngicas obteve maior rendimento com cerca de 17,7% de enzimas, porém, em menores concentrações, entre 2 e 4%, conseguimos aumentos de rendimento do óleo em torno de 50%, sugerindo que estas concentrações enzimáticas podem ser melhor ajustadas para esse propósito. Assim, com menores níveis enzimáticos, poderemos obter rendimentos eficientes, levando em consideração que reduziríamos o custo do processo de produção.

A análise dos óleos de *M. divaricatum* e *M. spicata* por CG/EM mostrou pequena ou nenhuma variação da concentração dos compostos majoritários quando submetidos ao tratamento enzimático. O sesquiterpeno trans-cariofileno foi encontrado em maior concentração na *M. divaricatum*. Esta substância já descrita na literatura apresenta várias atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, e inibidores enzimáticos (ABRAHAM, 2001). Na *M. spicata*, a carvona foi o composto majoritário e, segundo CARVALHO e FONSECA (2006), é um importante agente antimicrobiano contra bactérias e fungos patogênicos, daí o seu emprego como composto isolado ou através do óleo, em alimentos e produtos anti-sépticos. Alguns compostos minoritários como, por exemplo, o β -bourboneno, δ -cadineno e o viridiflorol na *M. divaricatum* e linalol e α -pinene na *M. spicata* tiveram aumento após o tratamento enzimático, assim como também pudemos observar o aparecimento de compostos como o β -gurjuneno, ledeno e o alloaromadendreno no óleo de *M. divaricatum*.

As variações nas concentrações dos compostos não implicam em alterações significativas da atividade do óleo essencial, uma vez que variações sazonais da produção de óleo podem ocasionar semelhantes alterações (GIRARD e KOEHLER, 2005; SILVA et al, 2005).

Quando analisados por CCD, notamos o mesmo perfil cromatográfico para as amostras tratadas e não tratadas com enzimas, em ambas as plantas. Entretanto, observamos o aumento de alguns compostos, podendo sugerir, que foram resultado do processo de extração mais eficiente na presença de enzimas fúngicas. Este fato pode ter sido ocasionado pelo rompimento total da parede celular, permitindo a saída de moléculas grandes e em maior quantidade.

Este trabalho constitui o primeiro relato do uso de enzimas em estado bruto produzidas em biorreator aplicadas à extração de óleos de interesse da Indústria Farmacêutica.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

Desenvolvemos um biorreator capaz de produzir enzimas nas mesmas condições.

A cepa Rut C-30 do fungo *T. reesei* se mostrou mais eficiente na produção de celulasas, xilanase e β -glicosidase nas melhores condições do que a cepa QM 9414 do mesmo fungo, quando cultivado em biorreator, indicando preferência para utilização industrial.

As condições de produção de celulase, xilanase, β -glicosidase e poligalacturonase em biorreator de 10L pelas cepas Rut C-30 e QM 9414 de *T. reesei* foram: meio de cultivo proposto número 6, pH 4,0, temperatura de 28° C, agitação de 400 rpm e taxa de aeração de 1,5 vvm. Nestas mesmas condições foram produzidas as enzimas de *A. niger* onde foi utilizado o meio de cultivo proposto número 4.

A utilização direta do EEB, sem a necessidade de purificação, na extração de óleos essenciais de interesse farmacêutico, apresentou resultados satisfatórios, aumentando em média 60% o rendimento da extração, permitindo, assim, futuros estudos para sua implantação em escala industrial.

A análise dos óleos essenciais com e sem tratamento enzimático, estatisticamente não apresentou diferença significativa.

Esses dados sugerem que a utilização de enzimas na extração de óleos essenciais não alterou significativamente a composição dos mesmos, podendo ser utilizado para diversas aplicações. Levando-se em consideração as baixas concentrações de rendimento de óleos essenciais, aliadas ao alto custo e ao efeito nocivo de extração com solventes, a aplicação dessa tecnologia pode trazer inúmeros benefícios para a Indústria Farmacêutica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA M, BRAGULAT M, CASTELLÁ G, CABAÑES F. "Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2655, 1994.

ABRAHAM, W.R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.583-606, 2001.

AGUIAR, C., MENEZES, T. Produção de Celulases e Xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

AKIBA, S., KIMURA, Y., YAMAMOTO, K., KUMAGAI, H. Purification and Characterization of a Protease-Resistant from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 79, p. 125-130, 1995.

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.

ASPINNALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P.K.& CONN, E.E. (eds.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980, cap.12, p.473-500.

BADER, J. Modeling and simulation of the growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C30. **Journal of Biotechnology**, v.29, p.121-135, 1993.

BADR, F.H., SITOHI, M.Z. Optimizing conditions for enzymatic extraction of sunflower oil. **Journal of Grasas y aceites**, v.43, p. 281, 1992.

BAILEY, J.E. Biochemical reaction engineering and biochemical reactors. **Chemical Engineering Societies**, v.35, p.1854-1886, 1980.

BARATTA, M. T, DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235-244, 1998.

BARBESGAARD, P., HELDT-HANSEN, H. P., DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.36, p.569-572, 1992.

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.

BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, U. Production of citric acid using immobilized conidia of *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 87, p. 117-125, 2000.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219-248, 1990.

BEJAOU, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBRIHI, A. Biodegradation of Ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin. A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**. v. 255, p. 203-208, 2006.

BEKRI, M.A., DESAIR, J., KEIJERS, V., PROOST, P., SEARLE-VAN LEEUWEN, M., VANDERLEYDEN, J., VANDE BROEK, A. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.8, p.2440-2447, 1999.

BELMAR-BEINY, M.T., THOMAS, C.R. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. **Biotechnology and Bioengineering** , v.37, p.456-462, 1991.

BERKA, R. M., DUNN-COLEMAN, N. S., WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus*. In: BENNETT, J. W., KLICH, M. A. (eds) *Aspergillus*, biology and industrial applications. Butterworth-Heinemann, London, pp 155–202, 1992.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. v. 18, p. 355-383, 2000.

BIOENGINEERING AG 2007. <http://www.bioengineering.ch>, acessado em 08/10/2007.

BISARIA, V.S., GHOSE, T.K. Biodegradation of celulosic materials: substrate, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.3, p. 90-104, 1981.

BOCEVSKA, M., KARLOVIC, D., TURKULOV, J. A. **World Conference & Exhibition on Oilseed Technology and Utilization**, Poster Sessions: P-28/3, 1992.

BODIE, E. A., BOWER, B., BERKA, R. M., DUNN-COLEMAN, N.L. Economically important organic acid and enzyme products. In *Aspergillus: 50 Years on*. Edited by: Martinelli, S.D; Kinghorn, J.R.; Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo; Elsevier; 1994,p. 561-602.

BORZANI, W., Coord. **Tecnologia das fermentações** , v.1, Edgard Blücher, São Paulo, 1975, p.1-18.

BRAITHWAITE, K. L., BLACK, G.W., HAZLEWOOD, G. P., ALI, B. R., GILBERT, H.J. A non-modular endo- β -1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies cellulose. **Biochemical Journal**, v.305, part 3, p.1005-1010, 1995.

BRAUN, E.J., RODRIGUES, C.A. Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, v.83, n.3, p.332-338, 1993.

BROEKHUIJSEN, M.P., MATTERN, I. E., CONTRERAS, R., KINGHORN, J. R., VAN DEN HONDEL. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein CAMJJ. **Journal of Biotechnology**. v.31, p.135-145, 1993.

BROOKE, A. G. Industrial fermentation and *Aspergillus* citric acid. In **The genus *Aspergillus*: From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications** (eds. POWELL, K. A., RENWICK, A. and PEBERDY, J. F.). Plenum Press, London. 1994, p.129-145.

BROW, D.E, HALSTED, D.J. The effect of acid pH on the growth kinetics of *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26, p.1079-1084, 1975.

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Acribia , 1991. 594p.

BUENROSTRO, M., LÓPEZ-MUNGUÍA, C.A. Enzymatic extraction of avocado oil **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 505-506, 1986.

BYRNE, G.S., WARD, O.P. Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering** , v.33, p.912-914, 1989.

CARR, R., MIKLE, New Developments in Canola Processing. **Oil Mill Gazetteer**, v. 6, p.109-115, 1995.

CARVALHO, C. C. R., FONSECA, M. M. R. Carvone. Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v.95, p.413-422, 2006.

CHISTI, M.Y. Airlift Bioreactors. **Elsevier Applied Sciences**, London, p. 345, 1989.

CHRISTENSEN, FM, Extraction by Aqueous Enzymatic Process, **INFORM** v.2, p. 984-987, 1991.

CINTRA, M.C., GLONE, O., LOPEZ-MUNGUIA, C.A., VERMON, C. J. **Journal of Food Science**, v.51, p. 695, 1993.

CLEVENGER, J. F. Apparatus for volatile oil determination. **American Perfumer and Essential Oil Review**, p.467-468, 1928.

COELHO, M. A. Z. Purificação da poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* 3T5B8. Rio de Janeiro, 1993. 124 p. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ.

COELHO, M.Z., LEITE, S.F., ROSA, M.F., FURTADO, A.L. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B. CEPPA**, Curitiba. v. 19, n.1, p. 33-42, 2001

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1997. 279p.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 3, p. 39-109, 1985.

COURI, S., FREITAS, S. P., TERZI, S. Uma alternativa para a extração enzimática de óleos vegetais a partir de sementes oleaginosas. **Óleos e Grãos Alimentos**, v. 70, p. 18-26, 2003.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2. ed. New York: New York Botanical Garden, 555p. 1988.

CUNHA, R. T. Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis. Rio de Janeiro, 1999. p. 122. Monografia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ.

DA SILVA, R., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

DE FEO, V., BRUNO, M., TAHIRI, B., NAPOLITANO, F., SENATORE, F. Chemical composition and antibacterial activity essential oils from *Thymus spinulosus* Tem. (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3849-3853, 2003.

DE VRIES, J. A. Repeating units in the structure of pectin. In: Gums and stabilizers for the Food Industry. Londres, IRL Press, 1988.

DE VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.61, p.10-20, 2003.

DIVNE, C., STAHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J.K.C., TEERI.T.T., JONES, A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, p. 524-528, 1994.

DOMINGUES FC, QUEIROZ JA, CABRAL JMS, FONSECA LP. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 394-401, 2000.

DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., LEMA, J.M. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. **Food Chemistry**, v. 49, p. 271-286, 1994.

DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., LEMA, J.M. Enzyme-assisted hexane extraction of soya bean oil. **Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 223-231, 1995.

DUNN-COLEMAN, N.S., BLOEBAUM, P., BERKA, R. M., BODIE, E., ROBINSON, N., ARMSTRONG, G., WARD, M., PRZETAK, M., CARTER, G. L. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/Technology*. v. 9, p. 976-981. 1991.

ESPOSITO, E., SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.2, p.89-98, 1998.

EVELEIGH, D.E. *Trichoderma*. In: DEMAIN, A. L., SOLOMON, N. A. (eds) *Biology of industrial micro-organisms*. 1985. pp. 487-509.

FAHN, A. Secretory tissues in plants. **London: Academic Press**, p.158-222. 1979.

FINKELSTEIN, D.B. Improvement of enzyme production in *Aspergillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.53 p. 349-352. 1987.

FOODNAVIGATOR, 2007.

<http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?id=61746-enzyme-potassium-biotechnology>. Acessado em 13/09/2007.

FOSTER, J.W. Chemical activities of fungi, **Academic Press, New York**, p.27-75, 1949.

FREITAS, S., HARTMAN, L., COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, n. 32, p. 29-32, 1996.

FROST, G. M., MOSS, D. A. **Production of enzymes by fermentation**. In: REHM, H. J., REED, G. (eds) *Biotechnology*, v. 7a. VCH, Weinheim, pp 65–102 1987.

FULLBROOK, P. D., Kinetics. In: Godfrey, T., Reichelt, J. (Eds.). *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry*. Great Britain: The Nature, 1983.

FULLBROOK, P. D., Practical applied kinetics. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*. 2nd ed. New York: Stockton Press, 1996. pp. 483–540.

GAMS, W., BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium* (CHRISTIAN, P., KUBICEK, S., GARY, E. eds), pp. 3-34. 1998.

GENBANK. <http://www.nvbi.nlm.nih.gov>. acessado em 08 de janeiro de 2008.

GIRARD, E. A. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em floresta ombrófila mista. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná (72p). Curitiba PR. 2005.

GOMEZ, R., SCHNABEL, I., GARRIDO, J. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. **Enzyme Microbiology and Technology** , v.10, n.3, p.188-191, 1988.

GUIMARÃES I.C.G., Et al. Extração de óleos essenciais de plantas. **Química Nova Escola**, v.11, p 45-46. 2000.

H., FAUS, I., MONTIJN, R., VAN DEN HONDEL, C. J. J., PUNT, P.J. Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 76 p. 164-174. 2001.

HARBONE, J.B. Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2.ed. New York: Chapman and Hall,1984. 288 p.

HELDT, H. W., HELDT, F. Plant Biochemistry & Molecular Biology. 1.ed. Oxford: Oxford University Press, 1997. 522p.

HENDY, N. A., WILKE, C. R., BLANCH, H. W. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C-30. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 6, p. 73-77, 1984.

HOQ, M. M., HEMPEL, C., DECKWER, W. D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration, and medium components on production. *Journal of Biotechnology*. v. 37 p. 49-58, 1994

HUERTA, S., FAVELA, E., LÓPEZ-ULIBARRI,R., FONSECA A., VINIEGRA-GONZÁLEZ. G., GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Absorbed substrate fermentation for Pectinase production with *Aspergillus niger*. **Biotechnology Techniques**, n.8, p.873-842, 1994.

HÜTHER, J., PASSREITER, M.C., WRAY, V., WILLUHN, G. Acylated 2-hydroxythymol 3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. **Phytochemistry**, v.51, p. 979-986, 1999.

ILMÉN, M., THRANE, C. E PENTTILÄ, M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Molecular and General Genetics**, v. 251, n. 4, p. 451-460, 1996.

INNOCENTINI, A. P. Extração e caracterização analítica do óleo essencial da espécie *Aniba canelilla*, visando o isolamento do composto majoritário, 1- nitro-2-feniletano, e seu uso toxicológico. 2000. 125f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

JOOSTEN, V., GOUKA, R. J., VAN DEN HONDEL, C. J. J., THEO VERRIPS, C., LOKMAN, B. C. Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (V H_Hs) by *Aspergillus awamori*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 66 p. 384-392.

JORGENSEN, H., MORKEBERG, A., KROGH, K. B.R., OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 42-48, 2005.

JUGE, N., SVENSSON, B., WILLIAMSON, G. Secretion, purification, and characterization of barley alpha -amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, p.385-392. 1998.

JÜSTEN, P., PAUL, G.C., NIENOW, A.W., THOMAS, C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering** , v.52, n.6, p.672-684, 1996.

KANG, S.W. PARK, Y.S. LEE, J.S. HONG, S.I. KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KARAFFA, L., KUBICEK, C. P.. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61 p.189-196. 2003.

KEEN, N.T., BOYD, C., HENRISSAT, B. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.9, n.7, p.651-657, 1996.

KIM, S.W., KANG, S.W., LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**. V. 59, p. 63-67, 1997.

KOSSEN, N.W.F. Bioreactors consolidation and innovation. In: 3rd EFB Conference, Munich, p. 10-10, September, 1984.

KUBICEK C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei* : structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in biochemical engineering, biotechnology** , v.45, p.1-27, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LANZANI, A., PETRINI, M.C., COZZOLI, O., GALLAVRESI, P., CAROLA, C., JACINI, G. On the use of enzymes for vegetable-oil Extraction. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**. v. 52, p.226, 1975.

LE TACON, F., JUNG, G., MUGNIER, J., MICHELOT, P. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Annual Science.*, v. 40, p. 165-176, 1983.

LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology** v.96, p.1959-1966, 2005.

LIAO, C.-H., GAFFNEY, T.D., BRADLEY, S.P., WONG, L.-J.C. Cloning of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and comparison of

its sequence relationship with pel genes of soft-rot *Erwinia* and *Pseudomonas*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.9, n.1, p.14-21, 1996.

LIECKFELDT E, KULLNIG C, SAMUELS GJ, KUBICEK CP. Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American soils. **Mycologia** v. 92, p. 374-380, 2000.

LIMA, L.P.C. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U.A., AQUARONE, BORZANI, W., coord. Tecnologia das fermentações, v.1, Edgar Blücher, São Paulo, 1975, p.1-18.

LORENZO, D., PAZ, D., DELLACASSA, E., DAVIES, P., VILA, R., CANIGUERAL, S. Essential oil of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguai. **Brazilian Archives of Biology Technology** v. 45, n. 4, p. 519-524, 2002.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275. 1951.

MALDONADO, M.C., STRASSER DE SAAD, A.M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 34-38, 1998.

MANDELS, M. , REESE, E. T. Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by Carbon Sources. Biology Branch, Pioneering Research Division, U. S. Army Quartermaster Research and Development Center Natick, Massachusetts. 1956

MANDELS, M., REESE, E.T. Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Bacteriology**. v.2, p.268-278, 1957.

MANDELS, M., STERNBURG, D. Recent advances in cellular technology. **Journal of Fermentation Technology** n.54, p. 267-286. 1976.

MANDELS, M., WEBER, J. Enhanced Cellulase Production by a Mutant of *Trichoderma viride*. U.S. Army Natick Laboratories, Natick, Massachusetts 01760. Received for publication 16 October. 1970.

MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANDELS, M., WEBER, J., PARIZEK, R. Enhanced Cellulase Production by a Mutant of *Trichoderma viride*. *Appl Environ Microbiol*. v.21, p.152-154, 1971.

MARTINS, L.F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2005.

MARTINS, M. B. G. Estudos de Microscopia Óptica e de Microscopia Eletrônica de Varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata x suaveolins* (Lamiaceae). **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, 205-218, 2002

MCINTYRE M. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.50, p. 291-298, 1998.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II. Lund, Sweden, 1997. 49 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Department of Biochemistry, Lund University. 1997.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

METZ, B., KOSSEN, N.W.F. The growth of molds in the form of pellets - a literature review. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.781-799, 1977.

MILL, P. J. & TUTTOBELLO, R. The peptic enzymes of *Aspergillus niger*. 2. Endopolygalacturonase. **Biochemistry Journal**, v.79, p.57-64, 1961.

MITARD, A., RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. **Biotechnology and Bioengineering** , v.32, p.835-840, 1988.

MONTENECOURT B.S., EVELEIGH D.E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. **Advanced Chemistry Series**, v.181, p.289-301, 1979.

MOSIER, N. WYMAN, C. DALE, B. ELANDER, R. LEE, Y.Y. HOLTZAPPLE, M. LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NAIDU, G.S.N., PANDA, T. Production of pectolytic enzymes ± a review. **Bioprocess Engineering**, v.19, p.355-361, 1998.

NAIR, M.C., Basic gas chromatography. New York: John Wiley , 1997. 200 p.

NOVO NORDISK. Celluclast 1,5 L: ficha técnica. [Curitiba], p.3. 1996.

OLSSON L, CHRISTENSEN T, HANSEN K, PALMQVIST E. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microbiology Technology**. V.33, p.612-619, 2003.

OXENBOLL, K. *Aspergillus* enzymes and industrial uses. In The genus *Aspergillus*: From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications (eds. POWELL, K. A., RENWICK, A. and PEBERDY, J. F.). Plenum Press, London. pp. 147-154.

PAENICOVÁ, L. Pectinases of *Aspergillus niger*: A molecular and biochemical characterization. Thesis Wageningen University – Wageningen. p. 5. 2000.

PALONEN, H. TJERNELD, F. ZACCHI, G. TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PANDA T, GRUBER H, KUBICEK CP. Stimulation of protein secretion in *Trichoderma reesei* by Tween surfactants is not correlated with changes in enzyme localization or membrane fatty acid composition. **Microbiology Letters** v.41. p.85-90. 1987

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. Microbiologia, v.1, McGraw-Hill, São Paulo, 1980, p.315-344.

PIRT, S.J., CALLOW, D.S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. **Nature** , v.184, p.307-310, 1959.

PITSON, S. M, SEVIOUR, R. J., MCDOUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21 p. 182-190, 1997.

PRADE, R.A., ZHANG, D-F., AYOUBI, P., MORT, A.J. Pectins, pectinases and lantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.361- 391, 1999.

PUNT, P. J., VAN BIEZEN, N., CONESA, A., ALBERS, A., MANGNUS, J. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production **Trends in Biotechnology**. v. 20, p.200-206. 2002.

RAMOS, L. P. Steam pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* chips. Ontario, Canada, 1992. 215 f. Tese (Ph.D., Biologia) – Instituto de Biologia de Ottawa-Carleton , Universidade de Ottawa.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., CURTIS, H. Biologia vegetal. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1976. 724p.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. Biologia vegetal. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001. 906p.

REESE, E.T. & MANDELS, M. Stability of the cellulose of *Trichoderma reesei* under use conditions. **Biotechnology Bioengineer.** V. 22, p. 323-335. 1980.

REESE, E.T. Enzyme production from insoluble substrate. **Biotechnology and Bioengineering Symposium.** n.3, p.43-62, 1972.

REINIKAINEN T. The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **VTT publications** v.206. ISBN 951-38-4644-x. 1994

RIPPEL-BALDES, A. **Grundzüge der Mikrobiologie**, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1995

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYEER, V .E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p. 111-113.

ROBERTS, I. N., JEENES, D. J., MACKENZIE, D. A., WILKINSON, A. P., SUMNER, I. G., ARCHER, D. B. Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene.* v.122, p. 155-161. 1992

ROSSI, M. J. Tecnologia para Produção de Inoculantes de Fungos Ectomicorrízicos utilizando Cultivo Submerso em Biorreator Airlift. 2006. 188 f. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2006.

ROUKAS. T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 25 p. 298-304. 2000.

RYU, D.Y., MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.2, p.91-102, 1980.

SAID, S., PIETRO R.C.L.R. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto. 2004, 440 p.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycology Research**, v.100, p.923-935, 1996.

SANTOS, R. D., FERRARI, R.A. Extração Aquosa Enzimática de Óleo de Soja. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, p.132-138, 2005.

SCALA e t al. - Multiple forms of polygalacturonase in two strains of *Rhizoctonia solani*. **Journal of Genetic and Microbiology**, v.116, p.207-211,1980

SCHIMIDEL, W. , FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. , LIMA, U.A. , AQUARONE, E. , BORZANI, W. (Eds.), Biotecnologia Industrial, Edgard Blücher Ltda., V.2, p.179-190, 2001.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, D., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 59 p.426–435. 2002.

SENGUPTA, R., BHATTACHARYYA, D.K. J. Extraction of mustard seed and rice bran. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.73, p.687-692, 1996.

SHANKAR, D., AGRAWAL, Y.C., SARKAR, B.C., SINEH, B.P.N. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for

enhanced oil availability and recovery. **Jornal of AOCS**, v. 74, n. 12, p. 1543-1547, 1997.

SIANI, A. C., SAMPAIO, F. L. A., SOUSA, C. M., HENRIQUE, O. M. G. M., RAMOS, S. F. M. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 37-43, 2000.

SILVA, D. M., DILLON, A. J. P. Produção de celulases em fermentação semisólida por uma linhagem de *Trichoderma* sp In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos. 15. p. 54. 1988.

SILVA, E. S. Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium* spp. 2006. 130 f. Dissertação de Mestrado em Química Analítica. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos. SP 2006.

SILVA, N. A., OLIVEIRA, F. F., COSTA, L. C. B., BIZZO, H. R., OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v. 3, p.52-55. 2006.

SIMÕES C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCKENKEL, E. P., GOSMANN C., MELLO, J. C. P. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2000. p. 387-415.

SKRUBIS, B. G. The drying of laurel leaves. **Perfumer & Flavorist**, v. 7, n. 5, p.37-40, 1982.

SMITH, J.J., LILLY, M.D., FOX, R.I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering** , v.35, p.1011-1023, 1990.

STERNBERG, D e MANDELS, G.R. Induction of Cellulolytic Enzymes in *Trichoderma reesei* by Sophorose. U. S. Army Natick Research and Development Command, Food Sciences Laboratory, Natick, 1979.

SUTO, M., TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.92, 4, p. 305-311. 2001.

TEPE, B., DAFERERA, D., SOKMEN, A., SOKMEN, M., POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333-340, 2005.

VECHT-LIFSHITZ, S.E., MAGDASSI, S., BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.890-896, 1990.

VELKOVSKA S, MARTEN MR, OLLIS DF. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30. **Journal of Biotechnology**, v.54, p.83-94. 1997.

VILEGAS, J. H. Y. Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras. 1997. 150f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

VOLKE-SEPÚLVEDA, T., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., FAVELA-TORRES, E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. **Bioresource Technology**. v. 97 p. 1583-1591. 2006

VROEMEN, S., HELDENS, J., BOYD, C., HENRISSAT, B., KEEN, N.T. Cloning and characterization of the bgxA gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a

β - glucosidase/xylosidase enzyme. **Molecular and General Genetics**, v.246, n.4, p.465- 477, 1995.

WAINWRIGHT, M.P., TRINCI, A.P.J., MOORE, D. Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process. **Mycological Research** , v.97, n.7, p.801-806, 1993

WARD, M., LIN, C., VICTORIA, D. C., FOX, B. P., FOX, J. A. WONG, D. L., H. J. MEERMAN, PUCCI, J. P., FONG, R. B., HENG, M. H., TSURUSHITA, N., GIESWEIN, C., PARK, M., WANG, H. Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. **Applied Environ Microbiology**. v. 70, p. 2567–2576. 2004.

WASICKY, R. Curso de análise cromatográfica em camada delgada. 1987. 104 f. Monografia (Didática) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 77-81, jan.-jun.1963.

WHITAKER, A., LONG, P.A. Fungal pelleting. **Process Biochemistry** , v.8, p.27-31, 1973.

WIEBE, M. G., KARANDIKAR, A., ROBSON, G. D., TRINCI, A. P. J., CANDIA, J. F., TRAPPE, S., WALLIS, G., RINAS, U., DERKX, P. M. F., MADRID, S. M., SISNIEGA,

WILLIAMS, J. A. Keys to bioreactor selection. **Chemical Engineering Magazine** pp. 34-46. 2002.

WULFF, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *Escherichia coli* / Nelson Arno Wulff. Piracicaba, 2002. 196 p.

WYMAN, C. E. DALE, B. E. ELANDER, R. T. HOLTZAPPLE, M. LADISCH, M. R. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, v.16, p.2023-2032, 2005.

XIONG, H. Production and characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces lanuginosus* xylanases. Espoo 2004, Helsinki University of Technology. 2005.

XIONG, H., VON WEYMARN, N., LEISOLA, M., TURUNEN O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, v.39 p.729–733, 2004.

YOKOYAMA, K., WANG, L., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Microbiology Letters**. v. 200 p. 241–246. 2001.

YUNES, R. A., CALIXTO, J.B. Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. 501 p.

ZANDONA FILHO, A. Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. Curitiba, 2001. 193 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Parana. Curitiba, PR. 2001.

9. ANEXOS

Tabela 17: Comparação da produção enzimática de *T. reesei* QM 9414 em Erlenmeyer em agitador orbital e em Biorreator, após 7 dias de incubação

Incubação	Atividade específica (UI/mg)		
	Celulase	Xilanase	β -glicosidase
Erlenmeyer	0,71	2,52	1,25
Biorreator	1,91	3,75	1,54

Tabela 18: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *T. reesei* QM 9414, após 7 dias de incubação.

	Atividade específica (UI/mg)			
	Celulase	Xilanase	β -glicosidase	Poligalacturonase
Meio 1	1,82	1,71	0,29	1,32
Meio 2	0,98	1,05	0,49	0,8
Meio 3	1,12	1,85	0,47	0,69
Meio 4	0,88	1,12	0,56	0,98
Meio 5	0,54	2,52	0,42	2,18
Meio 6	0,86	1,02	0,3	2,38

Tabela 19: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação.

	Atividade específica (UI/mg)			
	Celulase	Xilanase	β -glicosidase	Poligalacturonase
Meio 1	2,42	3,25	0,64	1,82
Meio 2	0,68	1,51	1,36	0,54
Meio 3	1,12	1,96	1,31	0,39
Meio 4	0,97	1,55	0,98	1,02
Meio 5	2,32	3,34	1,47	2,19
Meio 6	2,98	3,91	1,48	2,95

Tabela 20: Estabelecimento das condições de cultivo para produção enzimática de *A. niger*, após 7 dias de incubação.

	Atividade específica (UI/mg)				
	<i>Celulase</i>	<i>Xilanase</i>	β -glicosidase	<i>Poligalacturonase</i>	<i>Pectinase</i>
Meio 1	0,08	0,024	0,12	1,32	1,65
Meio 2	0,26	1,27	0,23	1,89	1,78
Meio 3	0,85	2,63	0,21	2,65	2,13
Meio 4	0,98	2,22	0,3	2,98	2,46

Tabela 21: Efeito do pH na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação.

	Atividade específica (UI/mg)				
	<i>Celulase</i>	<i>Xilanase</i>	β -glicosidase	<i>Poligalacturonase</i>	<i>Pectinase</i>
pH 3.0	0,08	0,024	0,12	0,32	0,65
pH 4.0	0,98	2,22	0,3	0,98	1,46
pH 5.0	0,18	0,6	0,21	0,65	0,55
pH 6.0	0	0	0	0	0
pH 7.0	0	0	0	0	0

Tabela 22: Efeito da temperatura na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação.

	Atividade específica (UI/mg)				
	<i>Celulase</i>	<i>Xilanase</i>	β -glicosidase	<i>Poligalacturonase</i>	<i>Pectinase</i>
25° C	1,65	0,32	0	0,98	0,8
28° C	2,02	2,22	0,65	0,98	1,46
30° C	1,12	1,65	0,3	0,35	0,85

Tabela 23: Efeito da velocidade de agitação na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação.

	<i>Atividade específica (UI/mg)</i>				
	<i>Celulase</i>	<i>Xilanase</i>	<i>β-glicosidase</i>	<i>Poligalacturonase</i>	<i>Pectinase</i>
400 rpm	2,65	1,79	0,85	0,65	0,52
500 rpm	1,22	0,89	0,26	0,32	0,32

Tabela 24: Efeito da taxa de aeração na produção enzimática em biorreator por *T. reesei* Rut C-30, após 7 dias de incubação.

	<i>Atividade específica (UI/mg)</i>				
	<i>Celulase</i>	<i>Xilanase</i>	<i>β-glicosidase</i>	<i>Poligalacturonase</i>	<i>Pectinase</i>
0,5 vvm	1,65	0,79	0,25	0,25	0,12
1,0 vvm	2,22	1,89	0,96	0,52	0,23

Tabela 25: Termoestabilidade da enzima celulase produzida por *T. reesei* QM 9414 e Rut C-30 em biorreator, após 7 dias de incubação, e da obtida comercialmente (C8546-10KU, Sigma®).

	Atividade Enzimática UI								
	QM 9414			Rut C-30			C8546-10KU, Sigma		
	10'	30'	60'	10'	30'	60'	10'	30'	60'
s/ incubação	5,96	7,75	7,12	6,82	6,18	6,80	6,80	6,90	6,07
térmica									
10° C	6,39	6,85	6,97	6,90	6,09	6,70	6,75	6,87	6,01
37° C	5,20	7,67	7,01	6,82	5,98	6,66	6,79	6,70	5,27
45° C	5,14	6,51	5,67	5,16	5,28	5,31	6,26	7,00	6,61
50° C	5,41	6,92	5,08	5,66	5,76	5,02	5,73	6,60	5,89
55° C	6,98	6,33	6,39	6,12	6,26	6,40	6,39	6,74	6,67
60° C	5,98	6,67	7,24	6,62	6,78	6,77	6,89	6,77	5,17
65° C	3,82	3,01	3,30	4,82	4,34	4,47	4,48	2,73	2,92
70° C	3,57	2,79	3,02	4,47	4,30	4,37	3,36	2,06	1,97
80° C	0,05	0,10	0,06	0,09	0,04	0,05	0,09	0,11	0,09