

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Avaliação da Ruptura das Estruturas Armazenadoras de Óleos Essenciais das Folhas Frescas de *Mentha arvensis* através da Aplicação de Extrato Aquoso Multienzimático

Nadabe dos Santos Reis<sup>1</sup>, Elizama Aguiar-Oliveira<sup>2</sup>, Larissa Corrêa do Bonfim Costa<sup>3</sup>, Tatielle Pereira dos Santos<sup>4</sup>, Julieta Rangel de Oliveira<sup>4</sup>, Marcelo Franco<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Departamento de Ciências Naturais  
Caixa Postal 70 – 45700-000 Itapetinga - BA

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia – Instituto Multidisciplinar de Saúde  
45029-094 Vitória da Conquista - BA

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz – Departamento de Ciências Biológicas  
45654-370 Ilhéus - BA

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz – Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas  
45654-370 Ilhéus – BA – E-mail: mfranco@uesc.br

#### RESUMO

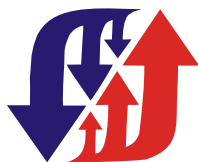
Enzimas microbianas são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, sua aplicação depende da relação entre sua especificidade e as características do processo industrial. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação do extrato multienzimático extraído do fungo filamentosso *Aspergillus niger* cultivado na palma forrageira através da técnica de fermentação em estado sólido sobre o rompimento das estruturas secretoras foliares (tricomas) de óleos essenciais das folhas frescas de *Mentha arvensis*. As variáveis analisadas foram a temperatura, tempo e carga enzimática sobre os tricomas glandulares peltados localizados em lados adaxial e abaxial o rompimento foi observado com auxílio do microscópio eletrônico de varredura e as análises estatísticas através da ANOVA com teste de Tukey a 5,0% de significância. Os resultados mostraram que o extrato enzimático promoveu danos aos tricomas e a melhor condição foi de 36 °C, 126 min e 55 mL. O tratamento enzimático com o posterior rompimento dos tricomas pode elevar o teor de óleo essencial extraído durante os processos industriais.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido, *Aspergillus niger*, Microscopia Eletrônica.

#### INTRODUÇÃO

Pesquisadores têm demonstrado que através da aplicação de extratos enzimáticos ocorre a elevação na relação custo e benefício do processo de extração de óleos fixos ou essenciais e a aplicação do extrato enzimático deve ocorrer como uma etapa de pré-tratamento (Gavahian et al. 2015; Sowbhagya et al. 2009). Jiao et al. (2012) demonstraram que a aplicação do extrato enzimático foi capaz de desorganizar e destruir as estruturas morfológicas de células externas e internas da parede celular que armazenam os óleos essenciais em *Fructus forsythia*.

Diferentemente da *Fructus forsythia*, muitas plantas armazenam o óleo essencial em estruturas especializadas denominadas tricomas como as plantas do gênero *Mentha*, que são as mais importantes da família *Lamiaceae*, devido a sua capacidade de produção de óleo essencial com elevado valor comercial, amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (Gavahian et al. 2015).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Sharma et al. (2003) demonstraram, por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a existência de duas estruturas epidérmicas na *Mentha arvensis*: os tricomas glandulares peltados e os captados, ambas tem o formato de uma semi-depressão em relação ao plano da superfície foliar, em lados adaxial e abaxial.

Nesse trabalho com auxílio do microscópio eletrônico de varredura foi possível observar o efeito do extrato multienzimático extraído do *Aspergillus niger* sobre a integridade dos tricomas das folhas frescas de *Mentha arvensis*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Produção do Extrato Multienzimático por Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido da palma forrageira foi desenvolvida conforme descrição na literatura de estudos anteriores desenvolvidos no grupo (Santos et al. 2016). A atividade das enzimas endoglucanase, celulasas totais e xilanases foram determinadas conforme Santos et al. (2012), as enzimas lacase, lignina peroxidase e manganex peroxidase foram determinadas conforme Santos et al. (2016) e a enzima amiloglucosidase foi determinada conforme descrito por Santana et al. (2012).

As atividades enzimáticas determinadas ( $U\ mL^{-1}$ ) foram, 3,55 para endoglucanase; 17,32 para celulasas totais; 35,32 para xilanase; 1,17 para lacase; 2,34 para lignina peroxidase; 1,13 para manganex peroxidase e 2,24 para amiloglucosidase.

#### Tratamento enzimático das folhas frescas de *Mentha arvensis*

As folhas frescas de *Mentha arvensis* foram coletadas no Jardim de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, Bahia, Brasil). Uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição, número de registro 14,524.

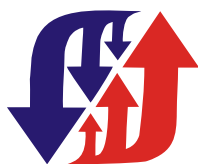
30 g destas folhas frescas foram adicionadas a um balão de fundo redondo de 1.0 L, o volume de extrato multienzimático, de água, tempo e temperatura estão presentes na Tabela 1. Ao término de cada ensaio, as folhas foram retiradas com o auxílio de uma pinça e transferidas para uma base de silicone onde foi aplicada a solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), em seguida, pequenos cortes foram feitos com uma lâmina na parte central das folhas, os pedaços retirados foram transferidos para eppendorfs contendo a solução de glutaraldeído até o momento da análise por microscopia eletrônica de varredura.

**Tabela 1** – Tratamento enzimático das folhas frescas de *Mentha arvensis*.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Extrato enzimático (mL)	Água (mL)
1	30	180	15	485
2	40	120	25	475
3	45	130	30	470
4	48	110	35	465
5	36	126	55	445

#### Análise micro-morfológica

Foram efetuadas análises da superfície foliar das folhas tratadas ou não com extrato multienzimático, no Centro de Microscopia Eletrônica da UESC. A região mediana das folhas (~ 1,0 cm) foram fixadas em com glutaraldeído (2,5% v:v) e armazenadas sob 10°C; a desidratação aconteceu em gradiente progressivo de acetona em ponto crítico. Os fragmentos secos foram metalizados com fina camada de ouro (20,0 a 30,0 nm de espessura) antes de serem fotografados em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

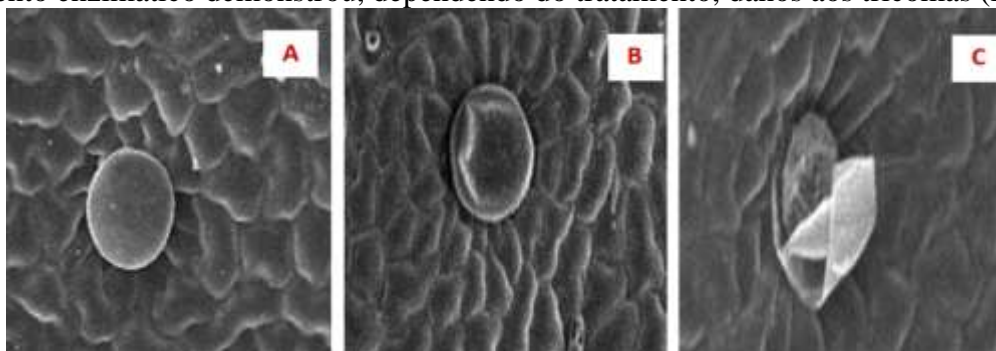


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A contagem dos tricomas foi realizada com auxílio do programa ANATI QUANTI, com cinco repetições, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5.0 % de significância.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

As eletromicrografias realizadas nas folhas de *Mentha arvensis* submetidas ao pré-tratamento enzimático demonstrou, dependendo do tratamento, danos aos tricomas (Figura 1)



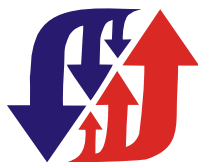
**Figura 1** – Micrografias dos tricomas granulares da *Mentha arvensis*: **a)** intacto; **b)** parcialmente rompido; **c)** rompido

A estrutura epidérmica de plantas é composta por diferentes polissacarídeos interligados e sua ruptura depende da ação sinérgica de diferentes enzimas (Hosni et al. 2013). Portanto, a ação das enzimas presentes no extrato obtido de *Aspergillus niger* se mostrou efetiva no rompimento dos tricomas de *Mentha arvensis* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Integridade dos tricomas nas superfícies abaxial e adaxial das folhas de *Mentha arvensis* submetidas a diferentes temperaturas, tempos e volume de extrato multienzimático.

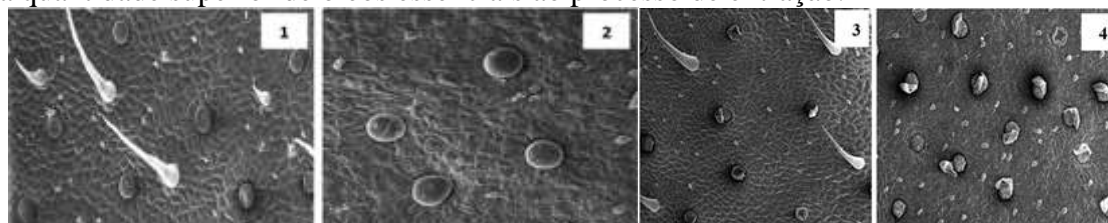
Ensaio (°C / min / mL)	Tricomas (%)		
	Intacto	Parcialmente Rompido	Rompido
<b>Face Abaxial</b>			
Controle (48/180/00)	100	00	00
E1 (30 / 180 / 15)	27	25	48
E2 (40 / 120 / 25)	36	18	46
E3 (45 / 130 / 30)	21	27	52
E4 (48 / 110 / 35)	12	33	55
E5 (36 / 126 / 55)	0	25	75
<b>Face Adaxial</b>			
Controle (48/180/00)	100	00	00
E1 (30 / 180 / 15)	38	10	52
E2 (40 / 120 / 25)	13	24	63
E3 (45 / 130 / 30)	11	43	46
E4 (48 / 110 / 35)	7	21	72
E5 (36 / 126 / 55)	4	0	96

A partir das experiências sem a aplicação do extrato multienzimático (Controle – Tabela 2), foi possível observar que todos os tricomas permaneceram íntegros, independente do tempo e da temperatura utilizados, ou seja, apenas o contato com a água não promove o rompimento dos tricomas, portanto este efeito é provocado pelas enzimas presentes na solução de tratamento das folhas de *Mentha arvensis*.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Utilizando métodos de secagem tradicionais Santana et al (2014) observaram que o rompimento dos tricomas da *Ocimum gratissimum* ocorreu eficientemente a temperatura de 60°C e com 24h, infelizmente essa temperatura e tempo provocam degradação das substâncias voláteis. A eficiência do processo enzimático, Tabela 2, está em descartar o processo de secagem, ao promover o rompimento dos tricomas nas folhas frescas e deste modo expõe uma quantidade superior de óleos essenciais ao processo de extração.



**Figura 2** – Micrografias dos tricomas granulares da *Mentha arvensis*:  
Ensaio sem tratamento enzimático: (1) abaxial (2) adaxial  
Ensaio com tratamento enzimático: (3) abaxial e (4) adaxial

### CONCLUSÕES

O pré-tratamento enzimático de folhas frescas de *Mentha arvensis* demonstrou ser uma tecnologia viável e eficiente para o rompimento controlado dos tricomas onde são armazenados os óleos essenciais da planta que possuem grande interesse comercial. Desta forma, evitou-se a etapa de secagem prévia das folhas, além disso, o tratamento enzimático foi realizado a temperatura branda, não sendo necessário o gasto adicional de energia para a elevação da temperatura, comparado ao processo de secagem. Aliado a isto há o processo de obtenção do extrato multienzimático em que um substrato agrícola, geralmente subutilizado, a palma forrageira. Dessa forma, a obtenção de óleos essenciais de plantas pode ser muito bem associada a processos biotecnológicos que conferem vantagens ecológicas, econômicas, sociais e ambientais de maior especificidade do que processos físico-químicos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gavahian, M., Farahnaky, A., Farhoosh, R., Javidnia, K., Shahidi, F. 2015. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioproducts Processing*, 94:50-58.
- Hosni, K., Hassen, I., Chaabane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus captatus L.*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 47:291-299.
- Jiao, J., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Luo, M., Wang, W., Zhang, L., Li, J. 2012. Enzyme-assisted microwave hydrodistillation essential oil from *Fructus forsythia*, chemical constituents, and its antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 134:235-243.
- Santana, A.C.M., Pereira, G.S., Boaventura, C.M., Uetenabaro, A.P., Costa, L.C.B., Oliveira, R.A. 2014. Rupture of glandular trichomes in *Ocimum gratissimum* leaves influences the content of essential oil during the drying method. *Rev Bras Farmacogn* 24:524-530.
- Santana, R.S.M., Gonçalves, Z.S., Bonomo, R.C.F., Franco, M. 2012. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a Palma Forrageira. *Rev Caatinga*, 25:188-193.
- Santos, T.C., Reis, N.S., Silva, T.P., Machado, F.P.P., Bonomo, R.C.F., Franco, M. 2016. Prickly Palm Cactus Husk as a Raw Material for Production of Ligninolytic Enzymes by *Aspergillus Niger*. *Food Sci Biotechn* 25:1-7.
- Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F., Franco, M. 2012. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chem* 133:1299-1304.
- Sharma, S., Sangwan, N.S., Sangwan, 2003. R.S. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science*, 84:544-550.
- Sowbhagya, H.B., Purnima, K.T., Florence, S.P., Rao, A.G.A., Srinivas, P. 2009. Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food Chem*. 113:1234-1238.