



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

RAQUEL APARECIDA LOSS

**SÍNTESE E ENCAPSULAMENTO DE ACETATO DE
EUGENILA OBTIDO VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E
CATÁLISE QUÍMICA HETEROGÊNEA EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE ORGÂNICO**

**Florianópolis/SC
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Raquel Aparecida Loss

**SÍNTESE E ENCAPSULAMENTO DE ACETATO DE
EUGENILA OBTIDO VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E
CATÁLISE QUÍMICA HETEROGÊNEA EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE ORGÂNICO**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense

Coorientadores:

Profa. Dra. Débora de Oliveira

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis/SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Loss, Raquel Aparecida

Síntese e Encapsulamento de Acetato de Eugenila Obtido Via Esterificação Enzimática e Catálise Química Heterogênea em Sistema Livre de Solvente Orgânico. / orientador, Haiko Hense ; coorientadora, Debora de Oliveira ; coorientador, José Vladimir de Oliveira – Florianópolis, SC, 2015

177 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referência

1. Engenharia de Alimentos. 2. óleo de cravo-da-índia. 3. esterificação. 4. fluídos supercríticos. 5. SEDS I. Hense, Haiko. De Oliveira, Débora, De Oliveira, José Vladimir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

Pai Nosso em aramaico

*Pai-Mãe, respiração da Vida,
Fonte do som, Ação sem palavras, Criador do Cosmos!
Faça sua Luz brilhar dentro de nós, entre nós e fora de nós
para que possamos torná-la útil.
Ajude-nos a seguir nosso caminho
Respirando apenas o sentimento que emana do Senhor.
Nosso EU, no mesmo passo, possa estar com o Seu,
para que caminhemos como Reis e Rainhas
com todas as outras criaturas.
Que o Seu e o nosso desejo, sejam um só,
em toda a Luz, assim como em todas as formas,
em toda existência individual, assim como em todas as comunidades.
Faça-nos sentir a alma da Terra dentro de nós,
pois, assim, sentiremos a Sabedoria que existe em tudo.
Não permita que a superficialidade e a aparência das coisas do mundo
nos iluda,
E nos liberte de tudo aquilo que
impede nosso crescimento.
Não nos deixe ser tomados pelo esquecimento
de que o Senhor é o Poder e a Glória do mundo,
a Canção que se renova de tempos em tempos
e que a tudo embeleza.
Possa o Seu amor ser o solo onde crescem nossas ações.
Que assim seja !*

Amém!

*“Podemos escolher em recuar em direção à segurança
ou avançar em direção ao crescimento...
A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes,
e o medo tem que ser superado a todo e a cada momento.”*

Abraham Maslow

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me colocar entre as pessoas certas e na hora certa.
Ao meu orientador Haiko, pela confiança repassada ao longo de todo o trabalho.

Ao meus coorientadores Débora e Vladimir, pela valiosa coorientação, incansável motivação e apoio e por serem os principais responsáveis por este trabalho ter atingido seus objetivos, vocês são exemplo a ser seguido.

A professora Natália Paroul da URI-Campus de Erechim pelo auxílio nas análises de atividade antimicrobiana.

Ao professor Rogério Dallago da URI-Campus de Erechim pelo auxílio na interpretação na Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

A minha família, em especial aos meus pais, Renato e Terezinha, meu irmão Eduardo e minha cunhada Elisângela, meu avô Otávio (*in memoriam*) pelo apoio sempre incondicional, são minha fortaleza.

Aos meus tios Maria Augusta e Moacir (*in memoriam*) e meus primos Eduardo e Gabriel por me acolher no convívio de seu lar.

Aos meus queridos compadres, amigos e irmãos do coração Júlia, Evandro, Isolda, João e Alessandra pela amizade de longas décadas e apoio incondicional. Aos meus afilhados Gabi e Lili por aquele abraço e carinho sempre gostoso e reconfortante.

Não poderia deixar de agradecer a minha prima Patricia e sua família por sempre estar presente na vida dos meus pais, cuidando dos meus tesouros.

Aos amigos Karina, Renata, Majo, Eliane, Silvia, Marieli, Luis Fernando e Luís Carlos pela paciência em ouvir meus desabafos.

As melhores amigas que alguém pode desejar, Majo e Eli, conhecer vocês foi um presente que a vida me deu, imagino nós velhinhas de cabelo branco trocando ideias de artigos e tals, levo e levarei vocês sempre no meu coração.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que fizeram destes últimos anos, tempos de verdadeiro companheirismo e alegrias, em especial ao Lindomar, Mara, Manuela, Denise, Daniela e Cláudia.

A Gabi, Daia, Gean, Juliana Machado, Denise, Majo pela ajuda na realização dos experimentos, vocês são especiais, sem vocês este sonho não estaria se concretizando.

Ao meu “Namorado” Noel que, mesmo sem entender minha escolhas, sempre me apoiou.

A todos os alunos da UNEMAT Campus Barra do Bugres, vocês me deram a certeza que escolhi a profissão certa.

Aos colegas e amigos da UNEMAT, Sumaya e Wilson por toda a amizade, vocês são fundamentais.

Aos anjos que Deus colocou na minha vida, Sidney Fernandes, Sofia Gabriela, Helen e Gabriel pela calorosa recepção quando vim para o Mato Grosso.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade e pelo precioso conhecimento repassado.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero muito obrigado!

RESUMO

Resumo da Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Síntese e encapsulamento de acetato de eugenila obtido via esterificação enzimática e catálise química heterogênea em sistema livre de solvente orgânico

Raquel Aparecida Loss

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense

Coorientadores: Prof^{al}. Dr^a. Débora de Oliveira e Prof. Dr. J. Vladimir de Oliveira

Este trabalho objetivou o estudo das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila em sistema livre de solvente. Óleo essencial de cravo-da-índia e anidrido acético foram usados como substratos para a reação catalisada por diferentes catalisadores enzimáticos (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) e químicos heterogêneos (peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16). Na síntese enzimática foi selecionado o melhor catalisador, este foi empregado na avaliação e otimização das variáveis que interferem no processo. Já a síntese química heterogênea foram empregados ambos os catalisadores. Dos ésteres obtidos, o que apresentou a melhor relação custo/baixo impacto ambiental foi avaliado em relação à atividade antimicrobiana, encapsulamento pela técnica SEDS e ensaios de liberação em isopropanol e acetato de etila. A partir dos planejamentos experimentais obteve-se a maior conversão para a síntese enzimática (83,5%) nas condições razão molar de substratos de 1:5, 5% de enzima e 70 °C, sendo que as mesmas condições foram obtidas no estudo cinético, no qual foi alcançada uma conversão próxima de 90% em 1 h de reação. Para a síntese química heterogênea, as maiores conversões obtidas foram de aproximadamente 100% para os dois catalisadores. A reutilização dos catalisadores também foi estudada. O reuso enzimático com Lipozyme TL IM apresentou uma conversão de 94,3% no primeiro ciclo, 75,2% no segundo e 53,2% no terceiro e último ciclo. Após 10 ciclos, a peneira molecular 4 Å não apresentou perda da atividade

catalítica, já o uso da Amberlite XAD-16 levou a uma queda acentuada da conversão em éster após 3 ciclos de uso. Na atividade antimicrobiana não foi observada diferença na média dos halos de inibição entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A eficiência máxima de encapsulamento foi de 58,04%, para experimento contendo 5 mg.mL⁻¹ de acetato e 20 mg. mL⁻¹ de PHBV, a 80 bar e 35 °C. A morfologia das partículas encapsuladas para a maior parte dos ensaios foi esférica e o tamanho destas variou de 0,061 a 0,276 µm. Em relação à liberação nos solventes acetato de etila e isopropanol percebe-se que quanto maior a afinidade do éster encapsulado pelo solvente, mais rápido ocorre seu pico de liberação. Estes resultados demonstram a importância da reação de esterificação do óleo essencial de cravo-da-índia e encapsulamento do éster pela técnica SEDS para que possa ser aplicado como antimicrobiano natural em alimentos e bebidas.

Palavras-chave: óleo de cravo-da-índia, esterificação, fluídos supercríticos, SEDS, encapsulamento, antimicrobiano.

ABSTRACT

Summary of Doctor's thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), as part of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering.

Synthesis and encapsulating fo eugenil acetate obtained by enzymatic esterification and heterogeneous chemical catalysis in organic solvent-free system

Raquel Aparecida Loss

Advisor: Prof. Dr. Haiko Hense

Cosupervisor: Prof.^ª. Dr.^ª. Débora de Oliveira and Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

This work aimed to study the variables that affect the synthesis of eugenil acetate in solvent-free system. Essential clove oil and acetic anhydride were used as substrates for the reaction catalyzed by different enzymatic catalysts (Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM) and heterogeneous chemical (molecular sieve 4 Å and Amberlite XAD -16). In enzymatic synthesis was selected the best catalyst, this was used in the evaluation and optimization of the variables that interfere in the process. In the heterogeneous chemical synthesis both catalysts were employed in this step. Of esters obtained, which showed the best cost / low environmental impact was evaluated for antimicrobial activity, encapsulation by SEDS technique and release assays in isopropanol and ethyl acetate. Since the experimental design was obtained the highest conversion for enzymatic synthesis (83.5%) under the conditions of substrates molar ratio of 1: 5 5% enzyme and 70 ° C, and the same conditions were obtained from the kinetic study in which one has achieved a near 90% conversion in 1 h of reaction. For heterogeneous chemical synthesis, higher conversions were obtained of approximately 100% for both catalysts. The antimicrobial activity was not observed difference in the average of the inhibition halos of Gram-negative and Gram-positive. The highest encapsulation efficiency was 58.04% for experiment with 5 mg.mL⁻¹ acetate, and 20 mg. mL⁻¹ PHBV, 80 bar and 35 ° C. The morphology of the encapsulated particles most of the trials was spherical, and the size of these ranged from 0.061 to 0.276 micrometers. Concerning release in ethyl acetate and isopropanol solvents notice that the higher the affinity of the encapsulated ester

solvent, its peak occurs faster release. These results demonstrate the importance of essential oil esterification reaction clove and encapsulation of the ester so that it can be applied as a natural antimicrobial in foods and beverages.

Keywords: clove oil; esterification, supercritical fluid, SEDS, encapsulation, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma do documento da tese.	29
Figura 2 - Síntese de acetato de eugenila por esterificação direta do eugenol com anidrido acético.....	42
Figura 3 – a) Diagrama esquemático do equipamento utilizado na precipitação de partícula a partir da técnica SEDS; b) Fundamentação da técnica.	56
Figura 4 - Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no presente estudo.	61
Figura 5 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no encapsulamento.	73
Figura 6 - Curva padrão para determinação do percentual real de encapsulamento e eficiência de encapsulamento.	77
Figura 7 - Cinética da produção enzimática catalisada por Lipozyme TL IM de acetato de eugenila empregando energia ultrassônica (100% de potência) e shaker (150 rpm) nas mesmas condições experimentais: razão molar de substratos de 1:3, concentração de enzima de 5% e temperatura de 55 °C.	86
Figura 8 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da concentração de enzima, temperatura e razão molar de substratos, na produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador...	90
Figura 9 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis razão molar e temperatura, bem como as interações entre estas variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.....	92
Figura 10 - Superfície de resposta para produção de acetato de eugenila em função da razão molar(eugenol:anidrido acético) e da temperatura, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.	96
Figura 11 - Cinética da síntese de acetato de eugenila (♦1:1, × 1:5, ▲ 1:9, ●1:12) com Lipozyme TL IM variando a razão molar eugenol:anidrido acético, com concentração de enzima de 5% (m/m) e 70 °C.	97
Figura 12 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Lipozyme TL IM variando a concentração de enzima (♦1%, ■5%, ▲ 10%) (m/m), com razão molar de substratos de 1:5 e 70 °C. ...	98

Figura 13 - Cinética para síntese química heterogênea de acetato de eugenila com teor de 0,2 g.g ⁻¹ de catalisador (● peneira molecular de 4 Å e ■ Amberlite XAD-16), razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético) e temperatura de 55 °C.	100
Figura 14 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador, temperatura e razão molar de eugenol e anidrido acético, bem como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador. 103	103
Figura 15 - Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da temperatura e da razão molar de eugenol e anidrido acético.	106
Figura 16 - Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da concentração de peneira e da razão molar de eugenol e anidrido acético.....	106
Figura 17 - Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da concentração de peneira e da temperatura.	106
Figura 18 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando a razão molar eugenol:anidrido acético (● 1:1, ■ 1:2, ▲ 1:3) a 55 °C e teor de catalisador de 0,125 g.g ⁻¹	107
Figura 19 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando o teor de catalisador (● 0,1, ■ 0,2, ▲ 0,3 g.g ⁻¹), com temperatura de 55 °C e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).....	109
Figura 20 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando a temperatura (● 40 °C, ■ 50 °C, ▲ 60 °C), com teor de catalisador 0,125 g g ⁻¹ e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).....	110
Figura 21 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador, temperatura da razão molar de eugenol e anidrido acético, bem como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.	112
Figura 22 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador e da razão molar de eugenol e anidrido acético, bem	

como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.	114
Figura 23 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando a razão molar eugenol:anidrido acético (● 1:1, ■ 1:2, ▲ 1:3), com temperatura de 55 °C e teor de catalisador 0,2 g.g ⁻¹	115
Figura 24 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando o teor de catalisador (● 0,1, ■ 0,2, ▲ 0,3 g.g ⁻¹), com temperatura de 55 °C e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).	116
Figura 25 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando a temperatura (● 45 °C, ■ 55 °C, ▲ 65 °C) e fixando teor de catalisador 0,2 (g.g ⁻¹) e razão molar de 1:3 (eugenol:anidrido acético).	117
Figura 26 - Espectro de RMN ¹ H para o padrão de acetato de eugenila.	118
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por Lipozyme TL IM.	118
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por peneira molecular de 4 Å.	119
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por Amberlite XAD-16.	119
Figura 30 - Efeito do uso sucessivo da Lipozyme TL IM, peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16 na produção de acetato de eugenila.	120
Figura 31 - Partículas encapsuladas na câmara de precipitação empregando a técnica SEDS.	126
Figura 32 - Morfologia das partículas obtidas nos ensaios de encapsulamento de acetato de eugenila empregando técnica SEDS... ..	127
Figura 33 - Efeito da temperatura e pressão no encapsulamento de acetato de eugenila empregando técnica SEDS para os experimentos ordenados de 1 a 8.	132
Figura 34 - Comportamentos de dissolução in vitro das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 28 °C e 80 rpm.	134

Figura 35 - Comportamentos de dissolução in vitro das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em isopropanol na temperatura de 28 °C e 80 rpm. 135

Figura 36 - Imagens do acetato de eugenila encapsulado em PHBV (a) em campo escuro (b) campo claro e (c) PHBV puro obtidas por microscópio confocal de fluorescência 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites recomendados para a utilização de acetato de eugenila, nas principais categorias de alimentos.....	42
Tabela 2 - Síntese de estudos encontrados na literatura relacionados a ésteres de eugenol.....	59
Tabela 3 - Especificações técnicas do óleo essencial de folha de cravo-da-índia.....	62
Tabela 4 - Características dos catalisadores empregados na produção de acetato de eugenila via síntese química heterogênea.....	63
Tabela 5 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , para a síntese de acetato de eugenila empregando energia ultrassônica.....	65
Tabela 6 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 , para síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.....	66
Tabela 7 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para a síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.....	66
Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 , para síntese de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.....	67
Tabela 9 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 , para síntese de acetato de eugenila empregando resina polimérica Amberlite XAD-16 como catalisador.....	68
Tabela 10 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para síntese de acetato de eugenila empregando resina polimérica Amberlite XAD-16 como catalisador.....	68
Tabela 11 - Condições experimentais empregadas na produção de micro/nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnica SEDS.....	76
Tabela 12 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com as variáveis e reais e codificadas, com respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando diferentes lipases comerciais como catalisadores na catálise enzimática.....	82

Tabela 13 - Comparativo do presente estudo com a literatura na produção de ésteres de aroma via síntese enzimática assistida por energia ultrassônica.....	84
Tabela 14 - Seleção do catalisador para produção de acetato de eugenila via síntese enzimática.	88
Tabela 15 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.	90
Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.	91
Tabela 17 - Comparativo do presente estudo com a literatura na produção de ésteres de aroma.	94
Tabela 18 - ANOVA para validação do modelo empírico codificado que descreve a produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.	95
Tabela 19 - Condições experimentais dos ensaios preliminares utilizando os catalisadores químicos heterogêneos e suas respectivas conversões em acetato de eugenila.	101
Tabela 20 - Matriz do DCCR 2^3 com as variáveis e reais e codificadas, com respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.	104
Tabela 21 - ANOVA para validação do modelo empírico codificado que descreve a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.	105
Tabela 22 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 , com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.	111
Tabela 23 - Planejamento de experimento 2^2 utilizando Amberlite XAD-16 como catalisador com as respostas em termos de conversão de acetato de eugenila em 30 minutos de reação e temperatura de 55 °C.	113
Tabela 24 - ANOVA para validação do modelo matemático na síntese de acetato de eugenila catalisada por Amberlite XAD-16.	114

Tabela 25- Atividade antibacteriana do acetato de eugenila, pelo método de difusão em placas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando a concentração de 20 µL de amostra por disco. 123

Tabela 26 - Condições experimentais, tamanho mínimo (Xmin), tamanho máximo (Xmax), média (X), coeficiente de variância (CV) e eficiência de encapsulamento (EE) para os ensaios de (1) a (9)..... 129

NOMENCLATURA

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEMA	<i>Flavor and Extract Manufacturers Association</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
FSC	fluido supercrítico
GAS	gás antissolvente
PGSS	partículas a partir de soluções saturadas de gás
PHBV	poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
RESS	rápida expansão de soluções supercríticas
SAS	antissolvente supercrítico;
ASES	sistema de extração de solvente em aerosol
SFEE	extração de emulsões com fluido supercrítico
SEDS	dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos
T _c	temperatura crítica em °C
P _c	pressão crítica em bar
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ANOVA	Análise de variância
[E]	concentração de eugenol em g.mL ⁻¹
[E] ₀	concentração inicial de eugenol em g.mL ⁻¹
K	constante da cinética da reação em h ⁻¹
T	Temperatura em °C
t	Tempo em horas
E _a	energia de ativação em cal.mol ⁻¹
A	fator pré-exponencial
R	constante universal dos gases em kcal.mol ⁻¹ K ⁻¹
rpm	rotações por minuto
AE	acetato de eugenila
M _w	massa molecular em g.mol ⁻¹
PRE	percentagem real de encapsulamento
EE	eficiência de encapsulamento
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
X _{mínimo}	tamanho mínimo das partículas em micrometro
X _{máximo}	tamanho máximo das partículas em micrometro
X	tamanho médio das partículas em micrometro

Σ	desvio padrão
CV	coeficiente de variação
μL	microlitros
mL	mililitros
mm	milímetros
μm	micrômetros
nm	nanômetros
H	hora
W	Watts
g	grama

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	27
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	31
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	37
3.1.1 Atividade antimicrobiana	38
3.2 EUGENOL.....	40
3.3 ACETATO DE EUGENILA	41
3.4 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS	44
3.4.1 Lipases	45
3.4.2 Síntese de ésteres de aromas catalisada por lipases	47
3.4.3 Peneiras moleculares	49
3.4.4 Resinas poliméricas não iônicas.....	51
3.4.5 Síntese de ésteres de aroma via catálise química heterogênea.....	52
3.5 ENCAPSULAMENTO.....	53
3.6 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	54
3.7 TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SEDS).....	55
3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	57
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1 SUBSTRATOS	62
4.2 CATALISADORES.....	63
4.2.1 Catalisadores para a síntese enzimática	63
4.2.2 Catalisadores para a síntese química heterogênea	63

4.3 APARATO EXPERIMENTAL PARA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	64
4.4 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM ...	64
4.5 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA EM SHAKER	65
4.5.1 Seleção do catalisador	65
4.5.2 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila via síntese enzimática em shaker	66
4.6 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE QUÍMICA HETERÔGENEA.....	67
4.6.1 Cinética preliminar	67
4.6.2 Seleção das condições operacionais.....	67
4.6.3 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila catalisada por peneira molecular de 4 Å	67
4.6.4 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila catalisada por Amberlite XAD-16.....	68
4.7 ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	69
4.8 ESTUDO DE SUCESSIVOS CICLOS DE USO DOS CATALISADORES	69
4.9 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	69
4.9.1 Determinação da conversão da reação	69
4.9.2 Recuperação do acetato de eugenila	70
4.9.3 Análise de RMN ¹H	70
4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	70
4.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	71
4.13 UNIDADE EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE EUGENILA	72
4.14 MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE EUGENILA	74

4.15 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	76
4.16 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL E EFICÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	76
4.17 COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO ACETATO DE EUGENILA ENCAPSULADO EM PHBV.....	78
4.18 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	78
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM....	81
5.2 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA.....	87
5.2.1 Seleção do catalisador.....	87
5.2.2 Avaliação das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador	89
5.2.3 Estudo cinético da síntese de acetato de eugenila via síntese catalisada por Lipozyme TL IM.....	96
5.3 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE QUÍMICA HETEROGÊNEA.....	99
5.3.1 Cinética preliminar.....	99
5.3.2 Seleção de condições operacionais para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea.....	101
5.3.3 Avaliação do efeito das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.....	102
5.3.4 Estudo cinético da produção de acetato de eugenila via síntese química catalisada pela peneira molecular de 4 Å	107
5.3.5 Avaliação do efeito das variáveis que afetam a síntese de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador	111
5.3.6 Estudo cinético da síntese de acetato de eugenila via síntese catalisada por Amberlite XAD-16.....	114
5.4 IDENTIFICAÇÃO DO ÉSTER.....	117

5.4.1 Determinação da estrutura do éster por análise de RMN ¹ H.....	117
5.5 ESTUDO DE SUCESSIVOS CICLOS DE USO DOS CATALISADORES NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA	120
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	122
5.8 ENCAPSULAMENTO DO ACETATO DE EUGENILA OBTIDO VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA UTILIZANDO TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SEDS).....	125
5.8.1 Comportamento de liberação in vitro de acetato de eugenila encapsulados em PHBV	132
5.8.2 Microscopia Confocal de Fluorescência	135
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	139
6.1 CONCLUSÕES	139
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	140
CAPÍTULO 7 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS	143
CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
ANEXO I	175
ANEXO II.....	177

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Síntese e encapsulamento de acetato de eugenila obtido via esterificação enzimática e catálise química heterogênea em sistema livre de solvente orgânico.

Por quê?

1. O acetato de eugenila é um éster com atividade antimicrobiana
2. Catalisadores enzimáticos e químicos heterogêneos são considerados de baixo impacto ambiental e podem ser reutilizados
3. A formação de micro/nanopartículas pode aumentar a velocidade de dissolução de matérias pouco solúveis em água.

Quem já fez?

1. São poucos os trabalhos de esterificação do óleo de cravo para produção de acetato de eugenila, sendo que não há relatos na literatura empregando Lipozyme TL IM, peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16.
2. Não constam na literatura trabalhos de formação de micro/nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnica SEDS

Hipóteses?

1. É possível obter elevadas conversões em éster empregando catalisadores de baixo impacto ambiental?
2. O dióxido de carbono supercrítico pode ser empregado como antisolvente de baixo impacto ambiental para o encapsulamento de acetato de eugenila?

Métodos experimentais

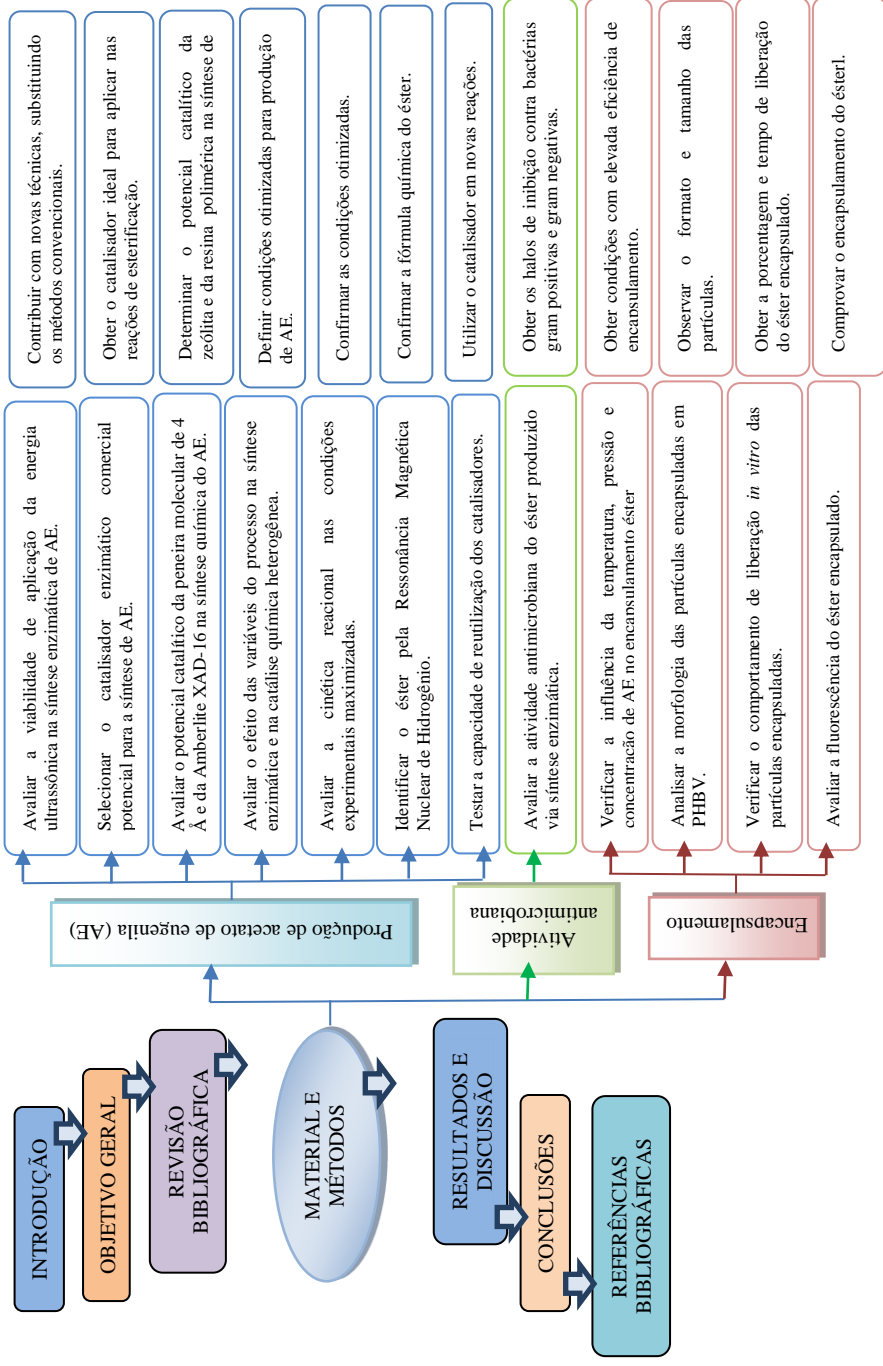
1. Quantificação dos ésteres por cromatografia em fase gasosa
2. Método de recuperação catalisador para reutilização
3. Identificação do éster por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
4. Determinação do halo de inibição
5. Formação de micro/nanopartículas empregando técnica SEDS
6. Caracterização das partículas por MEV
7. Liberação do composto ativo encapsulado
8. Confirmação do produto encapsulado por Microscopia Confocal de Fluorescência

Respostas

1. Determinar condições experimentais que conduzam a uma maior conversão em éster
2. Selecionar o catalisador com melhor benefício conversão versus impacto ambiental
3. Determinar o halo de inibição contra bactérias gram-positivas e gram-negativas

Este documento será apresentado conforme esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Organograma do documento da tese.



Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

A discussão em torno de problemas ambientais tem sido uma preocupação constante em diversos segmentos da sociedade mundial, seja por parte de organizações governamentais ou não governamentais. Desta forma, os processos que sejam ambientalmente amigáveis vem ganhando destaque no mercado de aromas e fragrâncias, representando uma meta desafiadora para a pesquisa acadêmica e industrial, em especial nas últimas duas décadas (ESCANDELL et al., 2015).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) recomenda a redução no consumo de sal, uma vez que este tem sido associado a alta incidência de doenças cardiovasculares e hipertensão (WHO, 2012). Considerando que na área de processamento de alimentos o cloreto de sódio muitas vezes age como conservante natural, a redução da concentração de sódio nestes alimentos requer a adição de conservantes para garantir a qualidade microbiológica destes (BURT, 2004). Este fato aliado ao aumento da resistência dos micro-organismos patogênicos aos produtos sintéticos (TEPE et al., 2004) faz com que a procura por novos agentes antimicrobianos, obtidos a partir de fontes naturais, seja cada vez maior.

O óleo essencial de cravo-da-índia é descrito como um eficiente agente antimicrobiano e antioxidante, sendo estas características atribuídas às de seu composto majoritário, o eugenol (BURT, 2004). Porém, a aplicação direta tanto do óleo quanto do eugenol apresenta algumas desvantagens, como a baixa estabilidade, devido à presença de um radical hidroxila na sua molécula que é particularmente instável na presença de fatores como luz, ar, umidade, e altas temperaturas, o que faz reagir rapidamente com outras moléculas (HUANG et al., 2002; CARRASCO et al., 2008; KARMAKAR et al., 2012). Desta forma, modificações moleculares, como a adição de grupos funcionais à estrutura da molécula do eugenol, através de reações de esterificação, surgem como uma alternativa para minimizar os problemas de estabilidade. Dentre uma infinidade de catalisadores atualmente disponíveis, pesquisas têm sido focadas na utilização de catalisadores enzimáticos e químicos heterogêneos.

Entre as várias enzimas, as lipases recebem destaque como biocatalisadores em processos de esterificação tanto em sistemas livres de solventes quanto em sistemas contendo solventes orgânicos (ESCANDELL et al., 2015). Como as propriedades biológicas dos ésteres dependem da natureza química dos reagentes de partida, é

possível obter ésteres com propriedades aromatizantes e surfactantes. Alguns ésteres também demonstram propriedades interessantes, tais como atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo empregados em produtos com sabores de frutas (bebidas, doces, geleias, compotas), produtos de panificação, vinhos e produtos lácteos (manteiga, creme de leite, iogurte e queijo), cosméticos, suplementos médicos e produtos de higiene bucal (LONGO; SANROMÁN, 2006; PAROUL et al., 2010).

Além da síntese enzimática, a síntese química heterogênea tem conquistado um espaço cada vez maior na obtenção de compostos químicos para as mais variadas aplicações. A síntese química heterogênea tem se mostrado útil no desenvolvimento de processos seletivos e com geração reduzida de resíduos, tornando-a atraente tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico (SARTORI et al., 2004). Sólidos inorgânicos porosos (óxidos metálicos, peneiras moleculares, resinas poliméricas, entre outros) são atraentes, devido a sua capacidade de catalisar reações químicas, maximizando os rendimentos e reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis durante os processos. Além disso, estes sólidos podem ser separados do meio reacional por filtração e apresentam possibilidade de reciclagem (SANSEVERINO, 2000). A presença de porosidade permite que as moléculas tenham acesso a elevadas áreas superficiais, aos quais estão associadas com altas atividades catalíticas (BECK, 1991; KRESGE et al., 1992).

O acetato de eugenila é um éster que apresenta particular interesse para a indústria de alimentos devido a sua atividade antimicrobiana, podendo ser empregado como conservante natural em alimentos e bebidas. Porém, este composto é pouco solúvel em água, o que dificulta sua utilização direta em alimentos e bebidas.

Uma alternativa para viabilizar a utilização do acetato de eugenila seria a obtenção de micro ou nanopartículas deste composto, uma vez que estas podem aumentar a dissolução de materiais pouco solúveis em água. Outras vantagens associadas as micro ou nanopartículas é a modificação das propriedades de superfície das partículas e proteção à estabilidade dos materiais incorporados (BAHRAMI et al., 2007).

A obtenção de micro ou nanopartículas podem ser realizada pelo processo de microencapsulamento, onde geralmente emprega-se um biopolímero como agente encapsulante. Dentre os biopolímeros destaca-se o poli (3-hidroxi-butirato-co-valerato) (PHBV) que possui estrutura química similar aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados (POUTON; AKNTAR, 1996).

O uso de fluidos supercríticos surge como alternativa aos processos convencionais, motivado pela exploração das suas

características peculiares, especialmente do dióxido de carbono (CO₂). Este fluido não é tóxico nem inflamável, quimicamente inerte, de baixo custo e suas condições supercríticas são relativamente brandas (NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

Esta tecnologia apresenta algumas vantagens como a formação de micro e/ou nanopartículas, estreita distribuição de tamanho das partículas formadas, boa eficiência de encapsulamento, alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termossensíveis, processo de um único estágio e tecnologia limpa (FAGES et al., 2004). Assim, o encapsulamento do acetato de eugenila empregando fluidos supercríticos se justifica por apresentar uma tecnologia inovadora no encapsulamento de ésteres aromáticos com propriedades antimicrobianas, sendo que estes apresentam potencial para serem empregados como conservantes e aditivos na indústria de alimentos.

Nesse contexto, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento da síntese de acetato de eugenila empregando catalisadores de baixo impacto ambiental. Apesar da abundância de trabalhos encontrados na literatura descrevendo a síntese de ésteres, ainda existe um constante esforço na busca por condições operacionais (concentração de catalisador, razão molar dos substratos, temperatura, tipos de reatores, modo de operação, tempo reacional) que alcancem maiores rendimentos e pureza do produto, bem como a aplicação de catalisadores de origem natural. Para tanto, determinaram-se as condições ótimas de produção do éster (quantidade de catalisador, razão molar de substratos e temperatura) empregando diferentes catalisadores enzimáticos e químicos heterogêneos. Nesta etapa também foi avaliada a possibilidade de utilização de energia ultrassônica como ferramenta para aumentar a transferência de massa da reação. Em um segundo momento, foi selecionado o catalisador que apresentou condições mais favoráveis em relação ao binômio conversão e impacto ambiental e este foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana. Visando à completude da tese foram realizados ensaios para avaliar o encapsulamento do éster pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) empregando CO₂ como fluido supercrítico e PHBV como agente encapsulante.

Capítulo 2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO

Estudar a síntese catalítica da de acetato de eugenila a partir de óleo de cravo em sistema livre de solvente e o seu encapsulamento pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade de aplicação de energia ultrassônica na síntese enzimática de acetato de eugenila;
2. Avaliar o potencial catalítico de lipases comerciais, da peneira molecular de 4 Å e da Amberlite XAD-16 na síntese química do acetato de eugenila;
3. Avaliar o efeito das variáveis do processo na síntese enzimática e na catálise química heterogênea, empregando técnicas de delineamento experimental;
4. Avaliar a cinética reacional nas condições experimentais maximizadas determinadas na etapa anterior;
5. Testar a capacidade de reutilização dos catalisadores;
6. Avaliar a atividade antimicrobiana do éster produzido via síntese enzimática;
7. Verificar a influência da temperatura, pressão e concentração do acetato de eugenila no processo de encapsulamento do éster produzido via síntese enzimática;
8. Caracterizar as partículas produzidas no encapsulamento;
9. Determinar a eficiência de encapsulamento do acetato de eugenila encapsulado em PHBV;
10. Verificar o comportamento de liberação *in vitro* das partículas de acetato de eugenila encapsuladas;

Capítulo 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão do estado da arte no qual o presente trabalho se insere, buscando evidenciar a relevância do tema sob investigação. Desta forma, será apresentada uma visão geral sobre óleos essenciais e seus componentes de interesse nesta pesquisa, lipases e suas aplicações na síntese enzimática de ésteres de aroma bem como a utilização de peneiras moleculares e resinas como catalisadores na síntese heterogênea destes ésteres. Posteriormente será feita uma breve explanação sobre o encapsulamento de compostos com atividades biológicas interessantes para a indústria de alimentos, química e farmacêutica, evidenciando a carência de trabalhos na literatura relatando o uso de fluídos supercríticos, sendo esta uma rota alternativa diante das convencionalmente utilizadas.

3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Os óleos essenciais são produtos de origem natural que representam uma importante vertente econômica, sendo empregados nas indústrias de perfumes, cosméticos (aromatizantes), agricultura (fungicida em plantações de banana), medicina (tratamento de doenças como asma e diabetes), nutrição e alimentos (aditivos de sabor e aroma e agente antimicrobiano e antioxidante) e odontologia (tratamento de cáries) (BAKKALI et al., 2008; MOON; KIM; CHA, 2011).

A composição química de um óleo essencial de uma mesma espécie vegetal pode variar dependendo de uma série de fatores, tais como condições climáticas, época da colheita, tipo de solo, ação de predadores, idade da planta, métodos de extração e parte da planta usada no processo de extração (SIMÕES; SPITZER, 2007; GOBBO NETO; LOPES, 2007). Porém, de maneira geral, os álcoois terpênicos são os constituintes presentes nos óleos essenciais em maior concentração e são responsáveis pelo aroma característico de cada óleo, além de serem ótimos substratos para a síntese de compostos de interesse nas indústrias química, farmacêutica e na conservação de alimentos (KOLLMANNBERGER; NITZ, 1993). Entre eles destacam-se álcoois mono e sesquiterpênicos tais como geraniol, linalol, citronelol, elemol, eugenol, mentol, entre outros.

A árvore *Syzygium aromaticum* L pertence à família das Mirtáceas, nativa da Indonésia e produz pequenos botões de flores,

conhecido como cravo-da-índia, sendo amplamente empregado como condimento, na medicina e odontologia, devido à presença de um constituinte majoritário biologicamente ativo chamado eugenol (CHAIÉB et al., 2007). Além do eugenol (50 a 90%), o óleo essencial de cravo também contém β -cariofileno (4-21%), acetato de eugenila (0,5 a 21%), α -humuleno (<1%) e concentrações traço de outros elementos (SANTOS et al., 2009). No Brasil, esta especiaria somente é produzida na Bahia, na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha) além do município de Una, mais ao sudeste baiano (SACRAMENTO; CASALI; PEREIRA, 2001).

3.1.1 Atividade antimicrobiana

O interesse no uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos é atribuído ao constante questionamento sobre a segurança dos aditivos químicos, o que tem levado a uma tendência no uso de substâncias naturais de plantas (ISMAIEL; PIERSON, 1990). A literatura na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado cada vez mais o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais bem como sua utilização como bioconservantes em alimentos, uma vez que são capazes de garantir satisfatória segurança microbiológica nos alimentos (FIORENTINI et al., 2001; RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002; UTAMA et al., 2002).

Óleos essenciais de tomilho, canela, louro e cravo-da-índia são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana (BURT, 2007; BAKKALI et al., 2008) A atividade antimicrobiana destes compostos é atribuída à atividade citotóxica de fenóis, aldeídos e álcoois, presentes na composição destes óleos, em muitas bactérias patogênicas causadoras de infecções alimentares (BRUNI et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005).

Devido à natureza lipolítica, os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática e provocam o rompimento da estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos, permeabilizando as células. Em bactérias, a permeabilização das membranas está associada com a perda de íons e redução do potencial de membrana, colapso de prótons e esgotamento da reserva de ATP (HELANDER et al., 1998; DI PASQUA et al., 2006). Esta teoria foi comprovada por alguns estudos, como o desenvolvido por Parveen et al. (2004) que observaram danos na parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando α -terpineno, um monoterpene monocíclico, foi empregado como agente antimicrobiano. Pinto et al. (2009) empregaram óleo de cravo e eugenol como agentes

antimicrobianos em *Candida albicans* e *Aspergillus* sp. e observaram uma lesão na membrana celular, sendo que estes agentes antimicrobianos também causaram uma redução considerável na quantidade de ergosterol, um componente específico da membrana celular de fungos.

Além disso, os óleos essenciais podem coagular o citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998) e causar danos na estrutura de lipídeos e proteínas (BURT, 2004). Danos à parede celular e membrana podem levar à perda de macromoléculas e lise celular (GUSTAFSON et al., 1998; LAMBERT et al., 2001; OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006). Assim, pesquisas envolvendo a ação inibitória do óleo essencial de cravo e eugenol em diferentes micr-organismos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas (STECCHINI; SARAI; GIAVEDONI, 1993; DORMAN; DEANS, 2000; VRINDA; MENON; GARG, 2001; USHIMARU et al., 2007; PEREIRA et al. 2008), leveduras (CONNER, BEUCHAT; 1984; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999) e fungos filamentosos (BULLERMAN; LIEU; SEIER, 1977; SOUZA et al., 2004) são bastante difundidas.

Na literatura é possível encontrar estudos avaliando o potencial de óleos essenciais como agentes antimicrobianos, usando estes agentes diretamente em alimentos ou em meios de cultivo sintéticos. Estudos realizados por diversos autores mostraram que concentrações na faixa de 5 a 20 $\mu\text{L/g}$ de óleo de cravo foram satisfatórias na inibição do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila* em produtos cárneos (HAO; BRACKETT; DOYLE, 1998a; HAO; BRACKETT; DOYLE, 1998b; STECCHINI; SARAI; GIAVEDONI, 1993; VRINDA; MENON; GARG, 2001). Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) e Cava et al. (2007) também observaram o efeito inibitório do óleo de cravo contra *L. monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* em produtos lácteos. Em alimentos lácteos, o óleo de cravo também inibiu o desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica* e *Candida* sp. (TRAJANO et al., 2009). Bullerman, Lieu e Seier (1977) observaram o efeito inibitório do óleo de cravo para *Aspergillus parasiticus* em produtos de panificação, sendo que uma concentração de 125 ppm apresentou efeito inibitório tanto para o crescimento do microrganismo quanto para a produção da toxina. Suhr e Nielsen (2003) estudaram o efeito de óleos essenciais sobre a deterioração de pão de centeio por fungos e observaram que os óleos de capim-limão, canela, cravo, mostarda e tomilho apresentaram efeito positivo na preservação do pão.

3.2 EUGENOL

O eugenol (4-alilo-2-metiloxifenol) apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro (que escurece quando exposto a luz), volátil, sabor forte e picante e tem baixa solubilidade em água, sendo miscível em temperaturas menores que 16 °C (MOUCHREK FILHO, 2000; OZTURK; OZBEK, 2005). No entanto, em altas temperaturas, o eugenol é imiscível, devido a sua alta densidade relativa (1,0676 g/cm³ a 20 °C) (SAYDMOHAMMED; PAL, 2009; WANNISSORN et al., 2009), mas é solúvel em solventes orgânicos (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). Este composto é o principal componente ativo do óleo de cravo-da-índia, sendo caracterizado como um fenilpropeno de cadeia curta de hidrocarbonetos. O eugenol pode ser sintetizado pela alilação do guaiacol com cloreto de alila (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Este composto é empregado como aromatizante natural e intensificador de sabor, em bebidas alcoólicas, como *whisky*, como agente flavorizante em sorvetes, produtos de padaria e doces em geral. Também é utilizado em cosméticos, perfumes, farmacêuticos, em químicos como detergentes e sabonetes e nas formulações de cimento dental e antisséptico bucal (ROJO et al., 2008; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Entre as principais atividades biológicas atribuídas ao eugenol a que apresenta maior interesse para a indústria de alimentos é a sua atuação como agente antimicrobiano. Dorman e Deans (2000) compararam o potencial antibactericida do óleo essencial de cravo com o eugenol em 25 espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo que tanto o óleo quanto o eugenol inibiram o crescimento de todas as espécies estudadas, atribuindo, desta forma, a ação antibactericida do óleo essencial à presença de elevadas concentrações de eugenol. A mesma reposta foi obtida em um estudo desenvolvido por Pinto et al. (2009), no qual o óleo essencial de cravo e o eugenol também foram empregados como agentes antimicrobianos contra *Candida albicans* e *Aspergillus* sp., sendo que ambos foram capazes de inibir o desenvolvimento dos micro-organismos testados.

Porém, em elevadas concentrações o eugenol pode causar efeitos adversos como alergias e inflamações, possivelmente devido à formação de radicais fenoxil e posteriormente, de quinina pela atividade pró-oxidante (ROMPERLBERG et al., 1996). Para minimizar a oxidação do eugenol vários compostos têm sido sintetizados a partir deste, bem como a investigação das atividades biológicas dos ésteres

resultantes, uma vez que acredita-se que seus derivados acilados, esterificados, acetilados, entre outros, apresentem propriedades ainda melhores que o eugenol.

Exemplos de pesquisas bem sucedidas foram relatadas por Yadav e Yadav (2012) e Horchani et al. (2010) que observaram uma maior atividade antioxidante quando o eugenol foi esterificado com ácido benzóico, empregando catalisadores químicos heterogêneos e enzimáticos, respectivamente. Karmakar et al. (2012) estudaram o eugenol e seus derivados (precursores de flavonas, isoflavonas, flavonoides, sesquiterpenos e outros), onde obtiveram resultados positivos na eficácia contra a osteoporose. Huang et al. (2002) estudaram a toxicidade do eugenol, isoeugenol e metileugenol em insetos responsáveis pela deterioração em cultivares de milho, obtiveram uma maior efetividade com o isoeugenol.

Carrasco et al. (2008) investigaram as propriedades antioxidante e anticancerígena do eugenol e de seus análogos obtidos por reações de acetilação e nitração e observaram que os compostos 5-alil-3-nitrobenzeno-1,2-diol e acetato de 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol foram significativamente mais ativos que o eugenol, sugerindo que a presença dos grupos nitro e hidroxila podem ser importantes na atividade destes compostos.

Alimuddin et al. (2011) sintetizaram o 7-hidroxi-3',4'-dimetoxi isoflavona a partir do eugenol via metilação, oxidação e acilação e observaram que os compostos podem ser empregados no tratamento contra câncer de mama e de fígado, entre outros. Desta forma, como se pode observar, é possível modificar a molécula de eugenol substituindo o grupo hidroxila por outros compostos que melhorem as características funcionais.

3.3 ACETATO DE EUGENILA

O acetato de eugenila, assim como o eugenol, é classificado como substância aromatizante pertencente ao grupo químico definido como benzenodiol. Este composto também é conhecido como acetato de eugenol, acetato de 4-alil-2-metoxifenil e acetoeugenol e é considerado seguro para uso em alimentos por dois conceituados comitês internacionais, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e European Food Safety Authority (EFSA), relacionados à segurança de alimentos. Segundo estes comitês, para o eugenol recomenda-se uma concentração na faixa de 5 a 25 mg/kg de alimento,

com uma pequena margem de segurança (2 a 6), enquanto que concentrações de 1 a 5 mg/kg de acetato de eugenila apresentam uma maior margem de segurança (10 a 30). Estas concentrações são indicadas para todas as espécies animais, com exceção de peixe, cujo uso é contra indicado.

Assim, o acetato de eugenila consta no banco de dados da União Europeia como substância aromatizante autorizada para aplicação em alimentos. A Tabela 1 mostra os limites de utilização deste aromatizante para as principais categorias de alimentos.

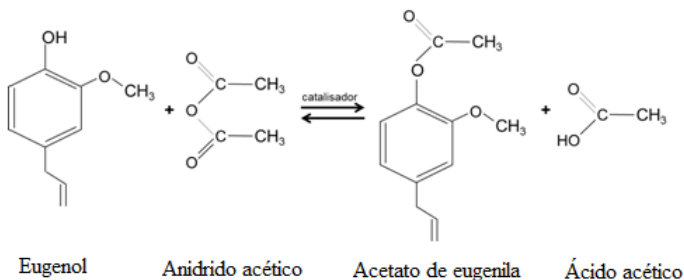
Tabela 1 - Limites recomendados para a utilização de acetato de eugenila, nas principais categorias de alimentos.

Categoria de alimento	Usual (ppm)	Máximo (ppm)
Assados	15,98	19,00
Condimentos	10,00	20,00
Lacticínios congelados	5,65	7,56
Gelatinas e pudins	5,82	7,78
Produtos cárneos	20,00	25,00
Bebidas não alcoólicas	1,88	2,83

Fonte: EFSA, (2011)

O acetato de eugenila pode ser encontrado, em pequenas concentrações, em óleo essencial de cravo-da-índia, sendo que esta concentração pode variar entre 0,5 até 21% (SANTOS et al., 2009; SCHERER et al., 2009; BARBOSA et al., 2012). Este composto também pode ser obtido a partir de uma reação de esterificação direta do eugenol com anidrido acético, na presença de catalisador (Figura 2).

Figura 2 - Síntese de acetato de eugenila por esterificação direta do eugenol com anidrido acético.



Na literatura é possível encontrar estudos que apontam a utilização de acetato de eugenila devido às suas interessantes propriedades biológicas, tais como o estudo desenvolvido por Charu et al. (2012) que demonstrou que o acetato de eugenila foi capaz de inibir a descalcificação dentária, além de ajudar na remineralização causada por erosão dentária. Além disso, o acetato de eugenila apresenta menor toxicidade que os compostos fluorados, compostos tradicionalmente empregados no tratamento de erosão dentária.

Pasay et al. (2010) relataram que o benzoato de benzila, acaricida tradicionalmente utilizado, pode ser substituído pelo acetato de eugenila, uma vez que este composto foi eficaz contra sarna humana. No estudo desenvolvido por Pandey et al. (2013) foi observado que tanto o eugenol quanto seu derivado acetilado (acetato de eugenila) apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue. Além disso, Chiaradia et al. (2012) observaram que o acetato de eugenila obtido via síntese enzimática foi eficiente na inibição tanto de bactérias gram positivas quanto gram negativas, causadoras de toxinfecções alimentares.

Radhiah, Suhaila e Noordin (2010) avaliaram os efeitos *in vivo* do óleo de cravo-da-índia na dieta de ratos diabéticos e observaram uma redução significativa de açúcar no sangue e na peroxidação dos lipídios. Além disso, os autores observaram que o uso de óleo de cravo na dieta dos ratos restaurou os níveis de enzimas antioxidantes e reduziu lesões nos tecidos dos olhos, músculos cardíacos e fígado, sendo que o estudo atribuiu todos estes benefícios a dois componentes presentes no óleo: o eugenol e o acetato de eugenila.

O acetato de eugenila também apresenta atividade anticancerígena, conforme foi observado no estudo de Carrasco et al. (2008) que avaliaram a atividade do eugenol e acetato de eugenila em duas linhagens de células de câncer humano (próstata e câncer escamoso oral), as quais apresentaram inibição de crescimento nos compostos estudados. O acetato de eugenila também encontra aplicações como aditivo na melhoria da qualidade de combustíveis (diesel), conforme relatado no estudo de Kadarohman et al. (2012).

Apesar do acetato de eugenila apresentar potencial para ser usado nas indústrias de alimentos e farmacêutica, sua aplicação ainda é pouco explorada, o que motivou a investigação da produção de acetato de eugenila através da acetilação direta do eugenol, presente no óleo essencial de cravo-da-índia, com anidrido acético. Para atingir tal

objetivo, a presente pesquisa fez uso de catalisadores enzimáticos (lipases) e catalisadores químicos heterogêneos (Peneira molecular 4 Å e Amberlite XAD-16).

3.4 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS

Os processos convencionais de produção de ésteres empregam catalisadores homogêneos ácidos ou básicos, sendo que as principais desvantagens destes processos consistem na necessidade de remoção dos catalisadores, gasto excessivo de energia, uso de substâncias perigosas, condições de reação drásticas e longos períodos de reação (ISO et al., 2001). Assim, a busca por catalisadores eficientes e práticos para síntese de compostos de interesse é uma importante vertente para a pesquisa acadêmica (CORNILS et al., 2007; SHELDON; ARENDS; HANEFELD, 2007).

Comparado com processos convencionais, os processos enzimáticos apresentam uma série de vantagens tais como: condições de operação brandas, obtenção de produtos puros, menor tempo de reação e possibilidade de reuso do biocatalisador (FREITAS et al., 2010). Dependendo das condições empregadas e da enzima é possível obter maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas à ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (KOBLOITZ, 2003).

Nos últimos anos, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento, uma vez que apresentam habilidade para realizar biotransformações altamente específicas, tornando-as populares em indústrias de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; HASAN; SHAH; HAMEE, 2006; SHU et al., 2010; TREICHEL et al., 2010).

A síntese por catálise química heterogênea tem sido amplamente empregada na química orgânica para a síntese de compostos orgânicos finos e farmacêuticos (SHELDON; VAN

BEKKUM, 2001). A alta organização e discriminação entre moléculas pelos sólidos com suas propriedades de seletividade de forma permitem que a síntese de compostos por catálise química heterogênea concorra com a síntese enzimática. Além disso, o emprego de catalisadores químicos heterogêneos apresenta-se como alternativa aos catalisadores homogêneos, podendo-se citar como principais vantagens o caráter não corrosivo dos catalisadores heterogêneos; a facilidade de separação dos produtos e reagentes, os quais podem ser facilmente separados no final da reação através de filtração; a possibilidade de reutilização dos catalisadores em novos ciclos e a possível inibição de reações laterais, levando a um maior grau de pureza do produto final (ALTIOKKA; CITAK, 2003; SARTORI et al., 2004). Desta forma, diversos catalisadores sólidos tais como resinas, zircônia sulfatada, sulfato de polianilina, heteropolíácido, complexos de metal, sulfatados de óxido de estanho, zeólitas, entre outros, têm sido explorados como potenciais catalisadores químicos heterogêneos (SHARMA; SINGH; KORSTAD, 2011).

3.4.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem a um grupo especial de esterases, classificadas como hidrolases, e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (VILLENEUVE, 2003). Em determinadas condições, elas também catalisam reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise) e aminólise. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (PANDEY et al., 1999; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; REIS et al., 2009). Estas enzimas são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos, leveduras e bactérias (HASAN et al., 2006). É importante enfatizar que qualquer processo catalisado por lipase, incluindo a síntese, é influenciado pela estabilidade e seletividade destas enzimas bem como a transferência de massa (substrato para o sítio ativo da enzima) e outros fatores (TUFVESSON et al., 2011).

A utilização industrial de lipases apresenta vantagens como: especificidade (controle dos produtos gerados e minimização de reações laterais indesejadas), estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas,

podem ser submetidas às condições industriais típicas, com reatores a temperaturas superiores a 70 °C por longos períodos de tempo e menor produção de resíduos (menor custo no tratamento de resíduos e contribuição desprezível da enzima para a Demanda Bioquímica de Oxigênio) (HASAN et al., 2006). Estas vantagens têm proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). É possível utilizar lipases em sua forma livre ou imobilizada, sendo que enzimas imobilizadas geralmente apresentam atividade catalítica superior e maior estabilidade térmica, quando comparado com sua forma livre (DALLA-VECCHIA et al., 2004; CIPOLATTI et al., 2014).

A maior vantagem do uso de lipases em relação a catalisadores químicos convencionais encontra-se no fato dessas enzimas apresentarem como características a especificidade ou seletividade em relação a um substrato (químico), à posição (regio) e a isômeros (estéreo). A quimioespecificidade está relacionada com as diferentes atividades apresentadas por uma mesma lipase em relação a substratos variados. As lipases podem apresentar especificidade por tri-, di- e monoacilgliceróis e outros ésteres de ácido graxo, formados pela mesma molécula de ácido carboxílico, também podem diferenciar moléculas de ácido graxo de diferentes tamanhos de cadeia, de diferentes níveis e posição de insaturação entre outros (BERTOLINI et al., 1995). A regioespecificidade se refere às diferentes atividades enzimáticas apresentadas pela mesma lipase sobre as distintas posições do ácido graxo no triacilglicerol (VILLENEUVE, 2003). Por outro lado, a estereoespecificidade está relacionada com as diferentes atividades enzimáticas apresentadas por uma mesma lipase sobre distintos isômeros de uma molécula (KAMIYA et al., 1995; MARGOLIN, 1996).

A maioria das lipases apresentam uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005), temperatura ótima entre 30 e 40 °C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE; HAMMOND, 1985). Estas propriedades, entretanto, podem variar, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil (FREITAS, 2006).

3.4.2 Síntese de ésteres de aromas catalisada por lipases

Lipases têm sido empregadas na produção de ésteres a partir de diferentes substratos e sistemas reacionais, sendo possível encontrar muitos estudos na literatura científica evidenciando o potencial destas enzimas na obtenção de ésteres variados. Porém, como as propriedades biológicas dos ésteres dependem da natureza química dos reagentes de partida e como o foco da presente pesquisa é a produção de um éster derivado de eugenol, atenção especial será dada para a utilização de lipases como catalisadores na produção de ésteres a partir de substratos com atividades biológicas diferenciadas, em especial as atividades antimicrobiana e antioxidante, empregando sistema livre de solvente orgânico.

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, por vários anos. Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que demandava grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível (AYRES-BARROS, 2002).

Porém, sistemas contendo solventes orgânicos apresentam algumas desvantagens, tais como o preço elevado, toxicidade e inflamabilidade dos solventes, acarretando em investimentos mais altos, a fim de atender aos requisitos de segurança (GOLDBERG et al., 1990; BLOOMER; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1992). Assim, o uso de sistemas livres de solvente é de grande interesse para a indústria de alimentos, uma vez que é possível reduzir custos e problemas de toxicidade, associados à recuperação do solvente. Além disso, a eliminação de solventes dos meios reacionais contribui para a redução do impacto ambiental, uma vez que a maioria dos solventes orgânicos são agentes poluidores (GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOĞLU, 2002; SANTOS et al., 2007).

Sínteses de ésteres por via enzimática em sistemas livres de solventes podem apresentar diversas vantagens. São mais compactos, apresentam produtividade volumétrica mais elevada e exigem menores concentrações de catalisadores em relação aos reagentes (KARRA-CHÂABOUNI et al., 1996; CASTRO et al., 1997; CHATTERJEE; BHATTACHARYYA, 1998). Alguns trabalhos encontrados na

literatura demonstram a viabilidade dos sistemas livres de solvente, em reações catalisadas por lipases, para a produção de ésteres aromáticos, uma vez que foram alcançados rendimentos satisfatórios. Entre as variáveis que podem influenciar na síntese enzimática, destacam-se a concentração e características das enzimas, razão molar dos substratos, natureza do substrato, temperatura, agitação, entre outros (ZAKS; KLIBANOV, 1988; PAROUL et al., 2012; STERGIOU et al., 2013).

Gryglewicz, Jadownicka e Czerniak (2000) avaliaram a síntese enzimática de fenil e terpenil valeratos, terpenil acetatos, hexil e benzil benzoatos em sistemas livres de solventes usando lipases de *Candida antarctica* e *Mucor miehei*. Altos rendimentos (90%) foram obtidos usando *C. antarctica* enquanto que experimentos realizados com lipase de *M. miehei* alcançaram rendimentos inferiores a 25%, nas mesmas condições reacionais. Porém, a enzima de *Mucor miehei* foi favorável na síntese enzimática de geranil butirato e geranil valerato em sistema livre de solvente, obtendo conversões de 85% após 75 horas de reação (KARRA-CHÂABOUNI et al., 1996).

Chatterjee e Bhattacharyya (1998) investigaram a produção de ésteres de geraniol e citronelol através da síntese catalisada por Lipozyme RM IM, em sistema livre de solvente e observaram que rendimentos em ésteres foram maiores em concentrações mais elevadas do agente acilante e menores concentrações do álcool terpênico. O efeito inibidor do geraniol também foi observado por Chulalaksananukul, Condoret e Combes (1993) e Claon e Akoh (1994) em lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM), sendo que o grau de inibição depende principalmente do tipo de enzima utilizada.

Os efeitos da razão molar, da temperatura e da agitação na síntese de geranil butirato catalisada pela lipase de *Mucor miehei* foram investigados por Karra-Châabouni et al. (1996). A atividade da enzima aumentou com aumento linear da cadeia do ácido e do álcool utilizado, sendo que a enzima foi irreversivelmente inativada a 60 °C. Já no estudo de Chaibakhsh et al. (2012), a enzima comercial Lipozyme TL IM, que também é produzida por *Mucor miehei*, não sofreu inibição da sua atividade na temperatura de 60 °C, sendo que a máxima conversão (72%) em ésteres de eugenol foram obtidas na temperatura de 65 °C, razão molar de 2 mol de eugenol:1 mol de ácido caprílico, 100 mg de enzima e agitação de 250 rpm e temperatura de 50 °C.

Chiaradia et al. (2012) também avaliaram a síntese de ésteres de eugenol em sistema livre de solvente, porém os autores empregaram anidrido acético e Novozym 435 e observaram a máxima conversão em ésteres (99%) na razão molar de 1:3 (eugenol:anidrido acético),

concentração de enzima de 5,5%, agitação de 150 rpm e temperatura de 50 °C. Em um estudo prévio, Chiaradia et al. (2011) utilizaram o anidrido acético como agente acilante na síntese de ésteres de mentol, catalisada por Novozym 435 em sistema livre de solvente. A máxima conversão (49,7%) foi obtida na razão molar de 1:5 (mentol:anidrido acético), concentração de enzima de 10%, 150 rpm e temperatura de 60 °C.

Liu e Huang (2010) avaliaram o ácido acético e anidrido acético como doadores do grupo acetato na esterificação de terpenila em reação catalisada por lipase de *Candida rugosa*, e observaram que na presença de ácido acético a conversão foi de 26%, enquanto que para o anidrido acético a conversão foi de 53%. As maiores conversões com o anidrido acético podem estar associadas ao fato que este composto não acidifica o meio reacional.

Guyot et al. (1997) investigaram a síntese de ésteres a partir de ácidos fenólicos catalisada por Novozym 435, em sistema livre de solvente e demonstraram a afinidade da lipase por diferentes substratos. Elevadas conversões em ésteres (97%) foram obtidas quando ácido cinâmico e butanol foram empregados como substratos, enquanto que nenhuma conversão foi observada com ácido caféico e butanol e concentrações traços foram obtidas com ácido ferúlico e butanol, nas mesmas condições reacionais.

3.4.3 Peneiras moleculares

Peneiras moleculares são sólidos com porosidade definida e capacidade de diferenciar moléculas através de suas diferentes dimensões e geometrias (BU; FENG; YANG, 2003). Esta seletividade geométrica originou a denominação de peneira molecular dada por McBain, em 1932 (GIANNETO, 1989). As peneiras moleculares mais conhecidas e de maior importância comercial são as aluminossilicatos, conhecidas por zeólitas. Zeólitas são aluminossilicatos hidratados altamente cristalinos, cuja estrutura é formada por uma rede tridimensional de tetraedros do tipo TO_4 (onde T representa Si ou Al), ligados por átomos de oxigênio, para formar subunidades e, finalmente, enormes redes constituídas por blocos idênticos (McCUSKER; BAERLOCHER, 2001).

A estrutura microporosa faz com que as zeólitas apresentem uma enorme superfície interna em relação à externa, permitindo a transferência de matéria entre os espaços intracristalinos e o meio externo. Esta transferência é limitada pelo diâmetro dos poros das

zeólitas, ou seja, só poderão entrar ou sair deste espaço cristalino aquelas moléculas cujas dimensões são inferiores a certo valor crítico, o qual varia de uma zeólita para outra. Assim, somente moléculas com dimensões menores que o tamanho crítico podem entrar nas cavidades e alcançar as posições de catálise, e então reagir. (GIANETTO, 2000; MAIA, 2007). O tamanho do poro é a abertura bidimensional da zeólita e é determinada pelo número de átomos tetraédricos ligados em sequência. As zeólitas são classificadas de acordo com o tamanho: poros pequenos (3 a 5 Å), médios (5 a 6 Å) ou grandes (>9 Å). Peneiras moleculares com poros maiores que 20 Å, com paredes amorfas, são classificadas como mesoporosas (LUNA; SCHUCHARDT, 2001).

As zeólitas possuem algumas características interessantes para diversas aplicações industriais, tais como: alto grau de hidratação, baixa densidade e grande volume de vazios quando desidratada; alta estabilidade da estrutura cristalina; área superficial específica elevada, dimensões moleculares dos poros, canais e cavidades, que lhes conferem diferentes tipos de seletividade (seletividade de reagente, de produto e seleção de reação), capacidade de adsorção elevada (variam desde altamente hidrofóbicas a altamente hidrofílicas), propriedades catalíticas, que são influenciadas pela densidade e força dos sítios ácidos, que podem ser controlados de acordo com a aplicação desejada; propriedades ácidas e básicas; adsorção seletiva de gases, vapores e fluidos, principalmente se suas moléculas forem polares (CORMA, 2003). Além disso, também apresentam estabilidade a elevadas temperaturas, possuem acidez moderada, podem ser reutilizadas e não são corrosivas. O tamanho de poros e cavidades são compatíveis com a maioria das moléculas usadas como matéria-prima nos mais variados processos de síntese de compostos de interesse para diferentes setores industriais (BROWN, 2009).

Assim, as zeólitas são empregadas na agricultura, no tratamento de licores radioativos e solos contaminados, na remoção de metais tóxicos, abrandamento de águas industriais e domésticas, purificação e separação de gases industriais, nutrição animal, catálise e refino de petróleo, controle de odor, limpeza de derramamento de óleo, desenvolvimento de processos alternativos para conversão do metanol, obtido a partir do gás natural, até espécies que sejam mais rentáveis, como as olefinas (etileno, propileno e buteno), obtenção de parafinas lineares, como o dodecil, para produção de surfactantes usados em detergentes, produção de oxigênio puro (90 a 95%) usado em hospitais por pacientes com enfisema ou doenças de obstrução pulmonar crônica, como purificadores em ar-condicionado automotivos, contribuindo para

um aumento de sua vida útil de duas a três vezes (LUNA; SCHUCHARDT, 2001; BRAGA, MORGON, 2007). Além disso, peneiras moleculares têm sido empregadas no aperfeiçoamento de processos químicos industriais, substituindo catalisadores ácidos em uma variedade de reações, muitas delas extremamente específicas (BRAGA, MORGON, 2007).

Entre as zeólitas, as classificadas como zeólitas A são de particular interesse neste estudo, uma vez que as peneiras moleculares de 4 Å compõem este grupo. Estas zeólitas A apresentam em sua composição uma razão Si/Al igual a 1, e são normalmente sintetizadas sob a forma sódica, tendo o sódio como cátion trocável. Outras formas catiônicas podem ser preparadas através de troca iônica em solução aquosa (BRECK, 1984). O diâmetro efetivo do poro pode variar dependendo do tipo de cátion de compensação. Se o cátion é o potássio (K^+), o diâmetro efetivo do poro é de aproximadamente 3 Å e a zeólita é conhecida como zeólita de 3 Å; se o cátion é o sódio (Na^+), a abertura é de 4 Å e tem-se a zeólita NaA e com o cálcio (Ca^{+2}) o diâmetro é de 5 Å, chamada de zeólita de 5 Å. Cada um desses materiais apresenta uma aplicação industrial específica, sendo principalmente utilizados como trocadores iônicos (abrandadores de água) e adsorventes (GIANETTO, 2000).

3.4.4 Resinas poliméricas não iônicas

Resinas são materiais sólidos, de natureza complexa, com alta massa molecular, chamadas de polímeros, sendo muito pouco solúveis em água e em solventes orgânicos (JEFFERY et al., 1989). Resinas Amberlite XAD são esferas poliméricas porosas que diferem entre si na composição química, grau de polaridade, porosidade e área da superfície (VOLPÉ; MALLET, 1979). Estas resinas apresentam propriedades físicas como distribuição uniforme dos poros e grande área superficial e apresentam estrutura química não-iônica (FERREIRA, 2007). Entre suas características atrativas destacam-se a fácil regeneração para múltiplos ciclos de sorção-dessorção, boa estabilidade química, características de sorção reprodutíveis, boa seletividade e estabilidade mecânica (TEWARI; SINGH, 2002).

Para que a resina possa atuar como catalisador de um processo, o material a ser adsorvido deve ser capaz de migrar através dos poros da superfície do adsorvente. Entre os parâmetros que afetam a capacidade de uma resina se ligar a um determinado material estão o tamanho do poro e a área superficial, sendo que quanto maior a área superficial do

adsorvente maior será sua capacidade de adsorção (SIGMA ALDRICH, 2007).

A resina Amberlite XAD-16, que é investigada como possível catalisador para a reação de acetilação entre o óleo essencial de cravo-da-índia e anidrido acético, é descrita pela fabricante como sendo uma resina constituída de matriz polimérica de estireno-divinilbenzeno, com tamanho médio de poro de 200 Å. Esta resina absorve e libera espécies iônicas através de interações hidrofóbicas e polares (SIGMA ALDRICH, 2014).

3.4.5 Síntese de ésteres de aroma via catálise química heterogênea

A síntese de acetato de eugenila empregando catalisadores químicos heterogêneos não foi relatada na literatura. Porém, alguns autores descreveram a produção de outros ésteres de aroma através de catálise química heterogênea. Yadav e Yadav (2012) avaliaram a produção de benzoato de eugenol empregando zircônia UDCaT-5 com catalisador e obtiveram conversões de 88%. Chavan et al. (2001) exploraram a acidez superficial de diferentes tipos de zeólitas como catalisadores em reações de acetilação de álcoois e fenóis empregando anidrido acético, agente acilante e obtiveram uma conversão de 91% em ésteres de acetato, após 2 h de reação quando FERzeólita foi empregado como catalisador. Ballini et al. (1998) avaliaram a acetilação de álcoois e fenóis empregando anidrido acético como doador do grupo acila, em reação catalisada pela zeólita Ycomercial HSZ-360.

Pande e Samant (2013) avaliaram a esterificação de compostos fenólicos empregando anidrido acético como doador do grupo acetato e peneira polimérica de troca iônica Amberlyst 15 como catalisador e obtiveram 96% de conversão em 15 minutos. Manawwer et al. (2014) também estudou a esterificação de compostos fenólicos, porém empregaram como catalisador Ni/SiO₂ e obtiveram 80% de conversão em ésteres e 100% de seletividade.

Sá et al. (2007) avaliaram a substituição de catalisadores ácidos e básicos (piridina e H₂SO₄) por as peneiras moleculares (13X, 4 Å e 5 Å) na síntese de nucleotídeos e observaram que os catalisadores sólidos se mostraram mais eficientes que os convencionais por fornecer os produtos commelhores rendimentos e empregar catalisadores heterogêneos de fácil remoção e com possibilidade de reutilização e reciclagem.

3.5 ENCAPSULAMENTO

Encapsulamento é um processo de empacotamento de solutos em cápsulas. O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula é o agente encapsulante, cobertura ou parede. As partículas obtidas podem ser classificadas por tamanho em macro ($>5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2-5000 \mu\text{m}$) ou nanopartículas ($<0,2 \mu\text{m}$) (AZEREDO, 2005; MATTÉ; ROSA, 2013).

Na área de alimentos atenção especial tem sido dada no encapsulamento de células vivas como os micro-organismos probióticos e enzimas (alimentos funcionais), compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos, acidulantes e corantes, óleos essenciais e extratos naturais contendo compostos fenólicos que atuam como antioxidantes e antimicrobianos (DESAI; PARK, 2005; FAVARO TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; NAZZARO et al., 2012).

A utilização de compostos micro e nanoencapsulados tem viabilizado a utilização de muitos produtos que antes eram considerados tecnicamente inviáveis (SUAVE et al., 2006; GHARSALLAOUI et al., 2007). Entre as vantagens de utilização destes compostos destacam-se a capacidade de modificar e melhorar a aparência de uma substância; proteger o núcleo ativo de fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de sabor ou perda de valor nutricional, conferindo assim proteção contra oxidação e uma maior estabilidade ao composto ativo; diminuir a velocidade de difusão do agente ativo do interior da célula para o meio (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados), permitir que o material do núcleo seja liberado lentamente com o tempo ou a partir da ocorrência de um evento; mascarar odores e sabores desagradáveis; aumentar a solubilidade em água de ingredientes hidrofóbicos, resultando em um aumento da biodisponibilidade do composto ativo, além de facilitar a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (SILVA et al., 2003; RODRÍGUEZ-NÚÑES et al., 2012; WORANUCHA; YOKSAN, 2013).

O agente encapsulante deve seguir alguns critérios tais como baixa viscosidade em altas concentrações, ser de fácil manipulação durante o processo, não ser altamente higroscópico, não ser reativo com o composto a ser encapsulado e, principalmente, proteger o ativo quanto às condições adversas (luz, pH, oxigênio, calor e outros compostos presentes) e ainda, possuir as propriedades desejadas de liberação do

ingrediente encapsulado; além de não possuir sabor desagradável e ser de baixo custo (MATTE; ROSA, 2013). Na indústria alimentícia os agentes encapsulantes normalmente são compostos naturais, sendo estes reconhecidos como seguros para a saúde humana (NAZZARO et al., 2012). Para o encapsulamento de óleos ou extratos vegetais o material encapsulante também precisa ser solúvel em água, biodegradável, apresentar propriedades específicas (não higroscópico, não poroso, solúvel, estável, etc.) e ser de fácil secagem (MARTÍN et al., 2010).

Entre os agentes encapsulantes, os biopolímeros têm recebido especial atenção devido à propriedade de biodegradabilidade, gerando subprodutos biocompatíveis ou não tóxicos (MAIA et al., 2004; COCERO et al., 2009). O poli (hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) é um termoplástico (POUTON; AKNTAR, 1996), sendo produzido como material de reserva energética por fermentação de uma variedade de cepas bacterianas, destacando-se a *Ralstonia eutropha* e a *Burkholderia saccharina* (SHARMA; RAY, 1995). A liberação de princípios ativos com baixa massa molar, a partir do PHBV, pode se processar pela penetração de água e pela formação de poros nas matrizes poliméricas (POUTON; AKNTAR, 1996), tornando este interessante para ser aplicado como material de revestimento (agente encapsulante) em compostos bioativos.

Segundo Taberero, Martín e Galán (2012) as técnicas tradicionais de obtenção de partículas como secagem por pulverização, recristalização e emulsificação não fornecem partículas cristalinas com uma adequada distribuição de tamanho. Segundo Dirksen e Ring (1991) a adição de fluidos supercríticos reduz o poder de solubilização do solvente, acarretando assim em uma rápida supersaturação, que de acordo com a teoria de nucleação, é o critério mais importante para a formação partículas pequenas, com uma adequada distribuição de tamanho. Desta forma, os fluidos supercríticos (FSC) tem sido utilizados, a fim de superar as desvantagens das tecnologias convencionais, além de também evitar a degradação térmica e química do produto de interesse e oferecer uma maior estabilidade das partículas (GUNEY-ALTAY et al., 2006, YEO; KIRAN, 2005).

3.6 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Os fluidos supercríticos têm recebido cada vez mais atenção em diferentes campos de pesquisa em especial nas áreas de extração, cromatografia, engenharia de reações químicas e biológica e no processamento de materiais (nanomateriais, materiais nanoestruturados,

filmes finos, revestimentos e partículas) (KANG et al., 2008). Este interesse tem sido atribuído as suas excelentes características tais como baixa viscosidade, o que faz que com que estes fluidos apresentem facilidade de penetração na matriz; densidade relativamente elevada, o que permite uma maior solubilização do soluto; alta difusão e tensão superficial praticamente nula. O aumento da densidade ocorre devido ao fato que no ponto crítico a densidade da fase gasosa se torna igual à da fase líquida devido ao desaparecimento da interface entre as fases. A difusividade dos fluidos supercríticos é semelhante à dos gases e aproximadamente duas vezes maior que a dos solventes líquidos, resultando em uma transferência de massa facilitada, quando comparado com os solventes tradicionais (REVERCHON; DELLA PORTA, 2003).

Dentre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono (CO_2) é o mais utilizado por suas condições críticas serem relativamente brandas ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $P_c = 7,38 \text{ MPa}$), não ser tóxico e nem inflamável e apresentar baixo custo (JUNG; PERRUT, 2001; NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

A utilização de fluidos supercríticos, como solventes ou anti-solventes na formação de partículas através da precipitação tem sido investigada como um meio útil para a modificação das propriedades dos materiais tais como tamanho de partícula, distribuição de tamanho e morfologia (REVERCHON; DELLA PORTA, 2003).

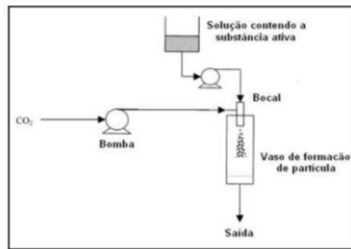
Segundo Kang et al. (2008) nas últimas décadas foram desenvolvidas várias tecnologias de formação de partículas empregando CO_2 supercrítico, sendo elas a) Fluido supercrítico como solvente: Rápida expansão de soluções supercríticas (RESS); b) Fluidos supercríticos como soluto: Partículas de soluções saturadas de gás (PGSS) e c) Fluidos supercríticos como antissolventes: GAS/SAS/PCA/ASES/SEDS/SFEE. Dentre as tecnologias que empregam fluidos supercríticos as mais avaliadas são aquelas que usam estes fluidos como antissolventes, como é o caso da técnica empregada no presente estudo (Técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos - SEDS).

3.7 TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SEDS)

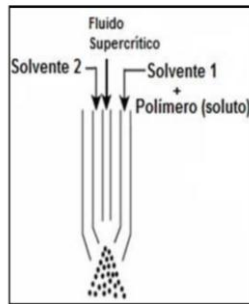
Esta técnica consiste na pulverização da solução líquida contendo o soluto, o solvente orgânico e o fluido supercrítico através do bocal coaxial (BOSCHETTO, 2013). A configuração específica deste bocal

foi desenvolvida para promover uma mistura do fluido supercrítico e a solução, e assim aumentar a transferência de massa, além de oferecer condições uniformes para a cristalização e consequentemente precipitação das partículas em tamanhos menores (SHARIATI et al., 2003). A Figura 3 mostra um esquema do equipamento empregado na obtenção de partículas empregando esta técnica.

Figura 3 – a) Diagrama esquemático do equipamento utilizado na precipitação de partícula a partir da técnica SEDS; b) Fundamentação da técnica.



(a)



(b)

Fonte: Jung e Perrut (2001) e Yeo e Kiran (2005).

Nestes sistemas o fluido supercrítico é usado tanto como um anti-solvente devido às suas propriedades químicas como um potencializador de pulverização devido aos efeitos mecânicos. A temperatura e a pressão, em conjunto com as vazões da solução e do fluido supercrítico, fornecem as condições ideais para a formação de partículas. A morfologia e o tamanho de partícula do produto pode ser controlada através da utilização parâmetros de processo otimizados (JUNG; PERRUT, 2001; ADAMI; REVERCHON; JÄRVENPÄÄ, 2007). Esta variação de tamanho de partícula foi reportada no estudo de Franceschi

et al. (2008) utilizaram técnica SEDS na precipitação de partícula de β -caroteno e observaram que o tamanho destas variaram de 246,8 a 6,2 μm quando a pressão foi reduzida de 12 para 8 MPa, sendo as demais condições experimentais iguais em ambos os ensaios. Em contrapartida, Machado et al. (2014), empregando a mesma técnica, observaram que maiores pressões (100 bar) contribuíram para a obtenção de partículas menores quando o dióxido de carbono foi empregado como antisolvente no encapsulamento de astaxantina em PHBV. Já no encapsulamento de bixina em PHBV Boschetto et al. (2014) observaram que a redução de temperatura contribuiu para a formação de partículas menores, também empregando a técnica SEDS.

Na atual literatura não foram encontrados estudos sobre o encapsulamento de acetato de eugenila, nem com o emprego de técnicas tradicionais, nem empregando fluidos supercríticos. Porém, o encapsulamento de óleos essenciais (contendo acetato de eugenila) ou compostos de aroma tem sido objeto de análise de diversos estudos. Cortés-Rojas, Souza e Oliveira (2014) avaliaram o encapsulamento de extrato de óleo de cravo, contendo principalmente eugenol e acetato de eugenila empregando diferentes métodos e observaram que o encapsulamento em cápsulas lipídicas contribuiu para o aumento da solubilidade em água, um vez que o composto encapsulado apresentou solubilidade de 72%. Choi et al. (2009) observaram que nanoencapsulamento de eugenol em policaprolactona pelo método de emulsão por difusão aumentou a sua estabilidade na presença de luz e umidade. Já no estudo de Woranuch e Yoksan (2013) o aumento da estabilidade térmica do eugenol foi observado pela formação de nanopartículas, as quais foram obtidas empregando quitosana como agente encapsulante pelo método de emulsão seguido de gelificação iônica.

3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Po meio da avaliação do estado da arte apresentado até o presente momento é possível observar uma quantidade significativa de estudos envolvendo a eficiência do óleo essencial de cravo-da-índia como agente antimicrobiano e antioxidante, sendo estas propriedades atribuídas às características de seu composto majoritário, o eugenol. Porém, a aplicação direta destes óleos apresenta algumas desvantagens, tais como a instabilidade na presença de luz, ar, umidade, e altas

temperaturas, o que pode provocar rápida evaporação e degradação de alguns componentes ativos (LAI et al., 2006; MARTINS, 2011). Uma alternativa seria a substituição do óleo essencial de cravo-da-índia por eugenol, porém, este apresenta baixa solubilidade em água. Desta forma, modificações moleculares, como a adição de grupos funcionais à estrutura da sua molécula por reações de acetilação ou esterificação, surgem como uma alternativa, uma vez que estes processos melhoram as propriedades específicas dos substratos, tais como emulsificação e dispersão, melhorando a qualidade global do produto (SHIMODA et al., 2006; SANTOS et al., 2009). Além disso, Awasthi et al. (2008) relatam que ésteres de eugenol podem ser futuramente introduzidos em medicamentos contra muitas doenças.

Existem várias técnicas convencionais conhecidas para o encapsulamento de princípios ativos, porém, em alguns casos elas não são capazes de proporcionar certas características, tais como a possibilidade de obter o controle do tamanho e distribuição de tamanho das partículas, que podem ser obtidas pelas técnicas envolvendo fluidos supercríticos.

A Tabela 2 apresenta uma síntese dos trabalhos visando à produção de ésteres de eugenol localizados na literatura consultada até o momento, na qual é possível observar que tanto a produção quanto as suas atividades biológicas ainda são pouco exploradas. É importante ressaltar que não foi encontrado nenhum estudo envolvendo o encapsulamento destes ésteres empregando técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS).

Tabela 2 - Síntese de estudos encontrados na literatura relacionados a ésteres de eugenol.

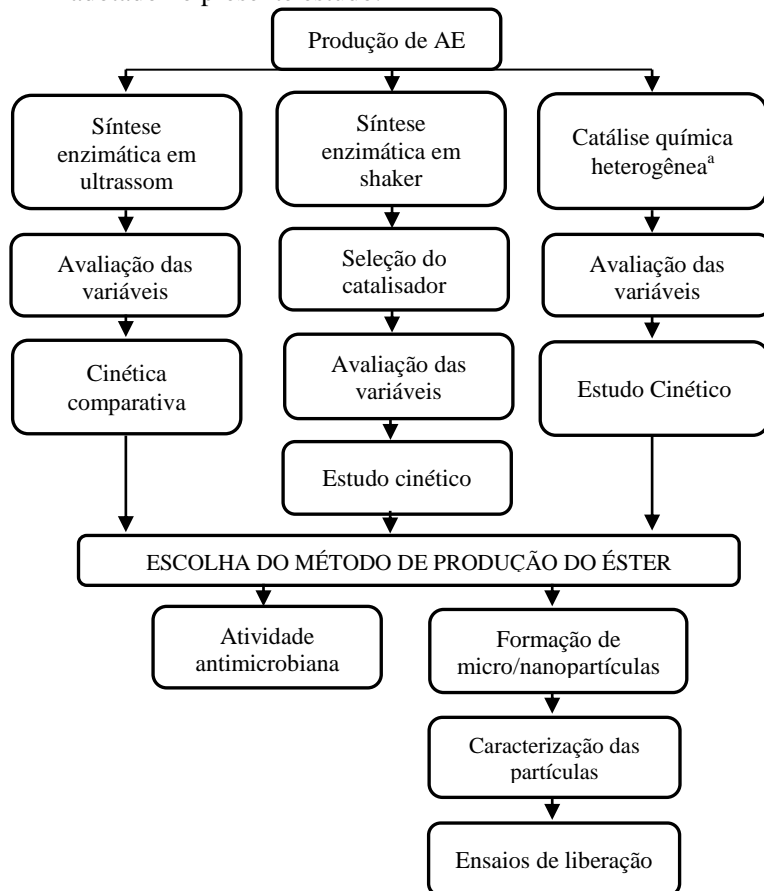
Produção de ésteres			
Éster	Substrato	Catalisador	Autor
Acetato de eugenila	Eugenol e anidrido acético	Novozym 435	Chiaradia et al. (2012)
Acetato de eugenila	Óleo de cravo e anidrido acético	Novozym 435	Vanin (2014)
Benzoato de eugenol	Eugenol e ácido benzóico	Lipase de <i>Staphylococcus aureus</i>	Horchani et al. (2010)
Benzoato de eugenol	Eugenol e ácido benzóico	UDCaT-5 (zircônia)	Yadav e Yadav (2012)
Eugenol caprilato	Eugenol e ácido caprílico	Lipozyme TL IM	Chaibakhshet al. (2012)
Atividades biológicas			
Éster	Antioxidante (IC 50) ^a µg.mL ⁻¹	Antimicrobiana (mm)	Autor
Acetato de eugenila	283,5	15,72	Vanin (2014)
Benzoato de eugenol	20,2	-	Horchani et al. (2010)

^aConcentração necessária para 50% de inibição in vitro

Capítulo 4 – MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são descritos os procedimentos laboratoriais que foram utilizados neste estudo. O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia e Bioquímica (ENGEBIO) e no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A Figura 4 apresenta o fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado.

Figura 4 - Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no presente estudo.



^aProcedimento empregado para ambos os catalisadores químicos heterogêneos.

Para facilitar a compreensão do procedimento experimental empregado no presente estudo, este capítulo foi dividido em três etapas:

Etapa 1: Produção de acetato de eugenila (AE) via síntese enzimática e catálise química heterogênea;

Etapa 2: Avaliação da atividade antimicrobiana do éster;

Etapa 3: Encapsulamento do éster empregando técnica SEDS.

Etapa 1: Produção de acetato de eugenila via síntese enzimática e catálise química heterogênea

Nesta etapa serão descritos os procedimentos experimentais e as determinações analíticas referentes à produção de acetato de eugenila empregando catalisadores enzimáticos e químicos heterogêneos.

4.1 SUBSTRATOS

Como substratos para reação de esterificação foi utilizado óleo essencial de folha de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) da Ferquima como fonte de eugenol e anidrido acético (97% de pureza) da VETEC como agente acilante. A Tabela 3 apresenta a composição do óleo essencial de cravo folha, segundo o fornecedor.

Tabela 3 - Especificações técnicas do óleo essencial de folha de cravo-da-índia.

Características	Especificações
Estado Físico	líquido
Cor	amarelo Palha a Castanho
Impurezas	isento
Odor	típico do tempero
Densidade (20 °C) em g.cm ⁻³	1,030 - 1,050
Índice de Refração (20 °C)	1,520 - 1,540
Composição ^a	%
Eugenol	86,1
β-cariofileno	9,8
α-humuleno	2,3

^aCromatograma do CG/MS no Anexo I

Fonte: FERQUIMA (2012)

4.2 CATALISADORES

4.2.1 Catalisadores para a síntese enzimática

Como catalisadores enzimáticos utilizaram-se três diferentes lipases de origem microbiana:

- Novozym 435 - Produzida via fermentação submersa por *Candida antarctica* e imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR.
- Lipozyme RM IM - Produzida via fermentação submersa por *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária - PR.
- Lipozyme TL IM - Produzida via fermentação submersa por *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em sílica gel, pela Novozymes Brasil/Araucária - PR.

4.2.2 Catalisadores para a síntese química heterogênea

A Tabela 4 apresenta as características dos catalisadores utilizados para a síntese de acetato de eugenila via síntese química heterogênea, segundo o fornecedor. Ambos os catalisadores foram previamente submetidos à secagem em estufa a 105 °C por 12 horas, para remoção de água.

Tabela 4 - Características dos catalisadores empregados na produção de acetato de eugenila via síntese química heterogênea.

Característica	Amberlite XAD-16 ^a	Peneira molecular 4 Å
Diâmetro dos poros (Å)	150	4
Tamanho da partícula (mm)	0,56-0,71	4,6-4,8
Área superficial (m ² g ⁻¹)	800	940-1000
Matriz	EDVB ^b	Na-Al-Si ^c

^aResina não iônica; ^bEstirenodivinilbenzeno; ^cSódio aluminossilicato.

Fonte: SIGMA-ALDRICH (2014).

4.3 APARATO EXPERIMENTAL PARA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

O éster acetato de eugenila foi sintetizado a partir de catálise enzimática e química. O procedimento experimental empregado em ambas as catálises consistiu inicialmente na mistura dos substrato, em erlenmeyer de 125 mL, óleo essencial de folha de cravo-da-índia como fonte de eugenol e anidrido acético. Após dissolução completa dos substratos, o catalisador foi adicionado, sendo o tempo reacional contado a partir da adição deste.

Ao final da reação, o catalisador foi filtrado em papel filtro e hexano (solvente de lavagem) para uma maior remoção do éster produzido aderido na superfície do catalisador e nas paredes dos frascos. As amostras foram evaporadas sob vácuo por 10 minutos a 40 °C, para a remoção do solvente de lavagem. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar e sob refrigeração, até o momento das análises.

Todos os ensaios realizados com temperaturas até 60 °C foram conduzidos em shaker com agitação orbital (MA 410/CFT, marca MARCONI, 220 volts, 700 W) Os ensaios com temperaturas superiores foram conduzidos em banho termostatzado com agitação orbital, (marca DUBNOFF) e os ensaios nos quais foi avaliada a influência da energia ultrassônica no processo foram conduzidos em banho ultrassônico (Unique, modelo: USC1880A, 220 V, frequência de 40 kHz e potência de 132 W), com controle de temperatura, que apresenta um transdutor de ultrassom (área de superfície de 282,2 cm²) no fundo do banho na horizontal ao longo do comprimento (FIAMETTI et al., 2012).

4.4 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A fim de verificar a potencialidade do uso do ultrassom como ferramenta auxiliar na transferência de massa no processo de produção de acetato de eugenila via síntese enzimática, foram avaliadas as variáveis do processo através de um planejamento experimental fracionado 2⁴⁻¹ com três pontos centrais. Nesta etapa, foram empregados três catalisadores diferentes (Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM), sendo que para todos os catalisadores foram avaliados os efeitos da razão molar de substratos, temperatura, concentração de enzima e potência do ultrassom, conforme mostra a Tabela 5. O tempo da reação foi fixado em 2 horas, tendo como base estudos de Chiaradia et al. (2012) para este sistema reacional.

Tabela 5 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , para a síntese de acetato de eugenila empregando energia ultrassônica.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (%m/m)	Potência do ultrassom (%)
-1	1:1	40	1	40
0	1:3	50	5	70
1	1:5	60	10	100

^aeugenol:anidrido acético

Após o estudo das variáveis que interferem na síntese enzimática de acetato de eugenila assistida por ultrassom, o catalisador que apresentou as maiores conversões em éster foi avaliado em uma cinética. Para tanto, foi empregada energia ultrassônica (100% de potência) e agitação em shaker (150 rpm). Ambas as cinéticas foram conduzidas por 6 h, nas mesmas condições experimentais: razão molar de substratos de 1:3, concentração de enzima de 5% e temperatura de 55 °C.

4.5 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA EM SHAKER

Após avaliar a utilização do ultrassom na síntese enzimática de acetato de eugenila, procedeu-se ao estudo da síntese enzimática sem utilização de energia ultrassônica, no qual foi realizada a etapa de seleção de catalisador, determinação dos parâmetros que interferem na reação e estudo cinético, conforme relatado a seguir.

4.5.1 Seleção do catalisador

Para a seleção do catalisador enzimático para a produção de acetato de eugenila, foram realizados ensaios em triplicata, empregando as condições experimentais otimizadas por Chiaradia et al. (2012), na produção de acetato de eugenila via síntese enzimática. As enzimas testadas foram as lipases comerciais: Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM na concentração de 5,5% (m/m em relação à massa total de substratos), razão molar eugenol:anidrido acético 1:3, temperatura de 50 °C, velocidade de agitação 150 rpm e tempo de reação de 2 h.

4.5.2 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila via síntese enzimática em shaker

Após a seleção dos catalisadores para a síntese enzimática foi adotada uma estratégia sequencial de planejamentos fatoriais, a fim de determinar as condições experimentais que maximizassem a síntese do éster acetato de eugenila, resultante da catálise enzimática. O catalisador empregado nesta etapa do trabalho foi previamente selecionado no item anterior.

No estudo das variáveis que afetam a síntese enzimática, inicialmente optou-se por um planejamento experimental completo 2³. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da razão molar de substratos, da temperatura e da concentração de enzima, conforme mostra a Tabela 6. O tempo de reação (2 h) e a velocidade de agitação (150 rpm) foram mantidos fixos.

Tabela 6 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2³, para síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (% m/m)
-1	1:1	40	5
0	1:3	50	10
1	1:5	60	15

^aeugenol:anidrido acético

Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2², apresentado na Tabela 7. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da razão molar de substratos e da temperatura, mantendo-se fixos o tempo de reação (2 h), a concentração de enzima (5%, m/m) e a velocidade de agitação (150 rpm).

Tabela 7 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², para a síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)
-1	1:5	50
0	1:7	60
1	1:9	70

^aeugenol:anidrido acético

4.6 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE QUÍMICA HETERÔGENEA

4.6.1 Cinética preliminar

Para determinar o tempo de reação foram realizadas cinéticas prévias, para cada um dos catalisadores. Os ensaios foram realizados em shaker sem agitação, a 55 °C, razão molar de substratos de 1:3 e teor de catalisador de 0,2 g.g⁻¹ (grama de catalisador por grama de substrato). As condições iniciais de estudo foram determinadas a partir dos resultados obtidos na síntese enzimática.

4.6.2 Seleção das condições operacionais

Para avaliar condições operacionais, tais como o uso de banho ultrassônico ou shaker e necessidade de agitação do meio reacional, foram realizados ensaios preliminares. Os ensaios preliminares foram realizados em shaker com agitação orbital (150 rpm e sem agitação) e em banho ultrassônico (100% da potência de 132 W), na razão molar de substratos de 1:3 (eugenol: anidrido acético) e temperatura de 55 °C, teor de catalisador de 0,2 g.g⁻¹, tanto para a peneira molecular de 4 Å quanto para a Amberlite XAD-16, sendo o tempo reacional estabelecido na cinética preliminar.

4.6.3 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila catalisada por peneira molecular de 4 Å

No estudo das variáveis que interferem na síntese química heterogênea empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, optou-se por um Delineamento Composto Central Rotacional 2³. Neste planejamento foram avaliados a razão molar de substatos, temperatura e teor de catalisador (Tabela 8). O tempo da reação foi mantido fixo em 2 h.

Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no Delineamento Composto Central Rotacional 2³, para síntese de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Teor de catalisador (g.g ⁻¹)
-1,68	1:0,48	38	0,03
-1	1:1	40	0,1
0	1:3	50	0,2
1	1:5	60	0,0
1,68	1:5,52	72	0,37

^aeugenol:anidrido acético

4.6.4 Determinação dos parâmetros que interferem na síntese de acetato de eugenila catalisada por Amberlite XAD-16

No estudo das variáveis que interferem na síntese química heterogênea empregando Amberlite XAD-16 como catalisador, inicialmente optou-se por um planejamento experimental 2^3 . Neste planejamento foram avaliados a razão molar dos substratos, temperatura e teor de catalisador (Tabela 9). O tempo da reação foi mantido fixo em 30 min.

Tabela 9 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 , para síntese de acetato de eugenila empregando resina polimérica Amberlite XAD-16 como catalisador.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Teor de catalisador (g.g ⁻¹)
-1	1:1,5	45	0,1
0	1:3	55	0,2
1	1:4,5	65	0,3

^aeugenol:anidrido acético

Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^2 e com triplicata do ponto central, totalizando 7 experimentos, apresentados na Tabela 10. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da razão molar e do teor de catalisador, mantendo-se fixos o tempo de reação (30 min.) e a temperatura (55 °C).

Tabela 10 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para síntese de acetato de eugenila empregando resina polimérica Amberlite XAD-16 como catalisador.

Variáveis/Níveis	Razão molar (mol:mol) ^a	Teor de catalisador (g.g ⁻¹)
-1	1:3	0,025
0	1:6	0,175
1	1:4,5	0,100

^aeugenol:anidrido acético

4.7 ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Após otimizar as condições experimentais para obtenção de acetato de eugenila via síntese enzimática e catálise química heterogênea, foram avaliados os efeitos das variáveis razão molar, teor de catalisador e temperatura na cinética da reação, para os três catalisadores empregados neste estudo. Os valores destas variáveis foram definidos conforme os resultados obtidos nos planejamentos experimentais.

4.8 ESTUDO DE SUCESSIVOS CICLOS DE USO DOS CATALISADORES

Partindo das condições otimizadas obtidas pelos planejamentos experimentais e estudo cinético, os catalisadores recuperados foram filtrados e lavados com 30 mL de hexano para retirar os resíduos remanescentes da reação. Após secagem em estufa a 40 °C por 4 h, os catalisadores foram deixados em dessecador por 18 h. Os catalisadores assim recuperados foram utilizados em um novo meio reacional, nas condições experimentais do primeiro uso e assim sucessivamente. Os catalisadores foram testados até se observar um declínio na conversão em acetato de eugenila.

4.9 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.9.1 Determinação da conversão da reação

A quantificação dos ésteres produzidos foi realizada por cromatografia em fase gasosa (Shimadzu GC-2010), conforme descrito no trabalho de Chairadia et al. (2012). As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30 m x 250 µm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180 °C (3 °C/min), 180-230 °C (20 °C/min), 230 °C (20 min), temperatura do injetor 250 °C, detector 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste N₂, volume injetado 0,4 µL de amostra diluída em diclorometano (1:10).

A determinação da conversão das reações foi realizada acompanhando a redução na área do sinal do agente limitante (eugenol) bem como o aparecimento do pico de produto. A área do pico da mistura reacional sem o catalisador (branco) e a área do pico da reação foram relacionadas pela Equação 1:

$$AE(\%) = \frac{100 - (100 \cdot A_{\text{reação}})}{A_{\text{branco}}} \quad (1)$$

Sendo: AE (%) a porcentagem convertida em acetato de eugenila, $A_{\text{reação}}$ a área do pico da reação e A_{branco} a área do pico do branco.

4.9.2 Recuperação do acetato de eugenila

A recuperação dos produtos das reações foram realizadas em evaporador rotativo à vácuo a 45 °C por 4 horas. Após esse tempo, as amostras foram analisadas em cromatógrafo em fase gasosa, nas mesmas condições descritas anteriormente a fim confirmar o desaparecimento dos picos referentes aos substratos remanescentes.

4.9.3 Análise de RMN ^1H

Para confirmar a estrutura do produto acetato de eugenila foi realizada a análise de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), pela detecção dos hidrogênios presentes na estrutura do éster. As análises foram realizadas nas amostras purificadas.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, no equipamento de Ressonância Magnética Nuclear, modelo Varian Mercury Plus AS-400 MHz, em 100 MHz, usando TMS (tetrametilsilano) como padrão interno e clorofórmio- d_1 (CDCl_3) como solvente.

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados experimentais obtidos em cada planejamento experimental foram tratados estatisticamente. A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e maximização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais e os preditos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistic 7.0 (Statsoft Inc, USA).

Etapa 2: Atividade antimicrobiana

Nesta etapa serão descritos todos os procedimentos experimentais e as determinações analíticas referentes à avaliação da atividade antimicrobiana do acetato de eugenila.

4.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ao final da primeira etapa, foi selecionado um dos processos baseado nos critérios de conversão, custo e baixo impacto ambiental e o éster obtido nas condições otimizadas e purificado do processo selecionado foi então avaliado em relação a sua atividade antimicrobiana.

Para a realização dos testes antimicrobianos, foi utilizada a metodologia de difusão em placas descrita por Ostrosky et al. (2008). Foram avaliadas 12 bactérias, entre Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Proteus vulgaris*, *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*) crescidas previamente em meio Luria Bentani (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl) durante 24 h a 36 °C.

Os referidos testes foram realizados em discos de papel Whatmann n° 3 com 9 mm de diâmetro. As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril em placas contendo meio de cultura Ágar Müller-Hinton. Após inoculação foram feitos poços no ágar, perfurados com o auxílio de um tubo de Durham e um volume de 20 µL de acetato de eugenila foi adicionado aos poços. Em cada placa foi depositado um disco de controle negativo (branco). Após a incubação das placas a 36 °C durante 24 h, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com uma régua.

Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores, em mm, dos halos obtidos nas três repetições de cada bactéria, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de confiança, utilizando o programa Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).

Etapa 3: Encapsulamento do acetato de eugenila empregando técnica SEDS

Nesta etapa serão descritos todos os procedimentos experimentais e as determinações analíticas referentes ao encapsulamento do acetato de eugenila empregando técnica SEDS.

4.12 ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS PARA ENCAPSULAMENTO

Para os ensaios de encapsulamento foram empregados os materiais listados abaixo:

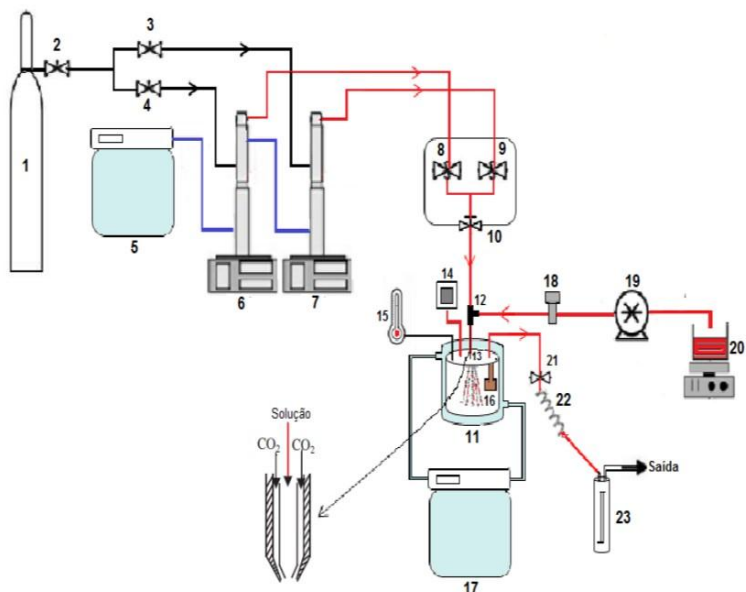
- Dióxido de Carbono (White Martins S.A., pureza de 99,8%);
- Diclorometano CH_2Cl_2 (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza);
- Acetato de eugenila: O éster encapsulado é o mesmo que foi analisado em relação à atividade antimicrobiana;
- Copolímero, Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (Mw) de 196.000 e índice de dispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A.

O copolímero foi submetido a uma pré-purificação, pela sua dissolução em clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) e posterior precipitação em *n*-heptano P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) para retirada de impurezas (BOSCHETTO et al., 2014).

4.13 UNIDADE EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE EUGENILA

O procedimento experimental utilizado para o encapsulamento em PHBV do acetato de eugenila foi baseado nos trabalhos de Franceschi et al. (2008), Machado et al. (2014) e Boschetto et al. (2014) que estudaram precipitação e encapsulamento de β -caroteno, astaxantina e bixina em PHBV, respectivamente. O aparato experimental foi fundamentado na técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes baseada no método *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS). A Figura 5 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Figura 5 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no encapsulamento.



Fonte: Boschetto (2013)

Conforme apresentado na Figura 5, o aparato experimental para ensaios de encapsulamento do acetato de eugenila é constituído dos seguintes elementos:

- (1) reservatório de dióxido de carbono (CO_2);
- (2) válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check-Valve HIP, Modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar);
- (3) e (4) válvulas de esfera (Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) banho ultratermostático de recirculação (Nova Ética, Modelo 521/2D);
- (6) e (7) bombas de alta pressão (ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL min^{-1});
- (8) e (9) Válvulas de esfera (Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (10) válvula métrica tipo agulha (HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);

- (11) câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm);
- (12) entrada central coaxial – conexão tipo T (Swagelok);
- (13) tubo capilar de sílica fundida;
- (14) entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, SMAR, Modelo LD 301);
- (15) entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado a um indicador de temperatura (Universal, NOVUS, Modelo N 1500);
- (16) suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno;
- (17) banho ultratermostático de recirculação (Nova Ética, Modelo 512/2D);
- (18) válvula de regulação de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (Back Pressure Regulator, GO-Regulador, Série BP-66, Modelo 1A11QE151);
- (19) bomba de HPLC Digital Série III (Acuflow);
- (20) recipiente para solução orgânica na qual o princípio ativo a ser precipitado é dissolvido no solvente orgânico;
- (21) válvula métrica tipo agulha (HOKE, Modelo 1315G2Y);
- (22) fita de aquecimento (FISATON, Modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21);
- (23) Trap de segurança, recheado com algodão.

4.14 MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE MICRO/NANOPARTÍCULAS DE ACETATO DE EUGENILA

O método empregado para a obtenção de micro e/ou nanopartículas de acetato de eugenila também foi baseado nos trabalhos de Franceschi et al. (2008), Boschetto et al. (2014) e Machado et al. (2014). Primeiramente, foi preparada uma solução com acetato de eugenila e polímero (PHBV) solubilizados em diclorometano. Após, procedeu-se o carregamento das bombas (6) e (7) com dióxido de carbono que estava armazenado. Foram utilizadas duas bombas de alta pressão, para que o CO₂ permanecesse em fluxo contínuo. As válvulas de (2) a (4) foram mantidas abertas, para que ocorresse o deslocamento do fluido do cilindro para a câmara de cada bomba. A temperatura da camisa foi ajustada a 7 °C com o banho de recirculação (5), para liquefazer o CO₂.

Na montagem da câmara de precipitação foram inseridos filtros de retenção, para evitar o arraste do material precipitado. Em seguida, a tampa foi fechada e a vazão e pressão da solução na bomba de HPLC foram ajustadas para então fazer as conexões. Nesta etapa e na limpeza utilizou-se diclorometano puro. A pressão foi ajustada com a Back pressure (18), evitando a passagem de fluxo aumentando a pressão até 200 bar, para assim evitar que o anti-solvente entrasse pela linha de solução.

Finalmente, as conexões da linha de entrada de CO₂ e o da solução, do sensor de temperatura, da linha de saída foram conectados, e a câmara interligada ao banho termostático, e então a válvula (10) aberta para que houvesse o enchimento da câmara com CO₂. Estando a câmara preenchida com CO₂, a válvula foi fechada e a recirculação (17) acionada. As válvulas de (2) a (4) também foram fechadas, de modo a pressurizar as válvulas (8) e (9) até a (10) em 200 bar, para assim, manter um gradiente de pressão para evitar refluxos da câmara para as linhas, causando precipitação do composto ou polímero.

Atingindo a pressão desejada, a válvula (21) foi aberta, com a (10) ainda aberta, para ajustar a vazão de anti-solvente na câmara de precipitação. Dependendo da condição experimental, a válvula (21) poderia congelar. Para evitar esse problema, uma fita de aquecimento foi colocada ao redor desta. A temperatura foi mantida a 200 °C. Com a pressão e temperatura constantes, o CO₂ foi deixado fluir para assim, alcançar o estado estacionário, iniciando posteriormente a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. O volume adicionado nos experimentos foi de 45 mL.

Após injetar o volume da solução, a bomba de HPLC foi desligada. Para a secagem das partículas precipitadas e a retirada do solvente, o fluxo de CO₂ foi mantido por 120 minutos aproximadamente, a uma vazão de 20 mL.min⁻¹, baseado em trabalhos anteriores (KIM et al., 2007; KANG et al., 2008; HONG et al., 2007). Em seguida, foi iniciada a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, abrindo-se a válvula (21). Este procedimento levou em torno de 40 minutos.

Por fim, a temperatura do experimento foi reduzida pelo banho (17), e as conexões foram desconectadas, abrindo-se a câmara cuidadosamente para a então retirada do material encapsulado, sendo em seguida armazenado em frascos âmbar e posteriormente mantidos a 8 °C.

As condições experimentais empregadas nesta etapa foram baseadas na condições de Boschetto et al. (2014) e são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições experimentais empregadas na produção de micro/nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnica SEDS.

Ensaio	Razão AE:PHBV (mg.mL ⁻¹)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
1	20:20	80	35
2	20:20	80	40
3	20:20	100	35
4	10:20	80	35
5	10:20	80	40
6	5:20	80	35
7	5:20	80	40
8	5:20	100	35

*AE: acetato de eugenila

4.15 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

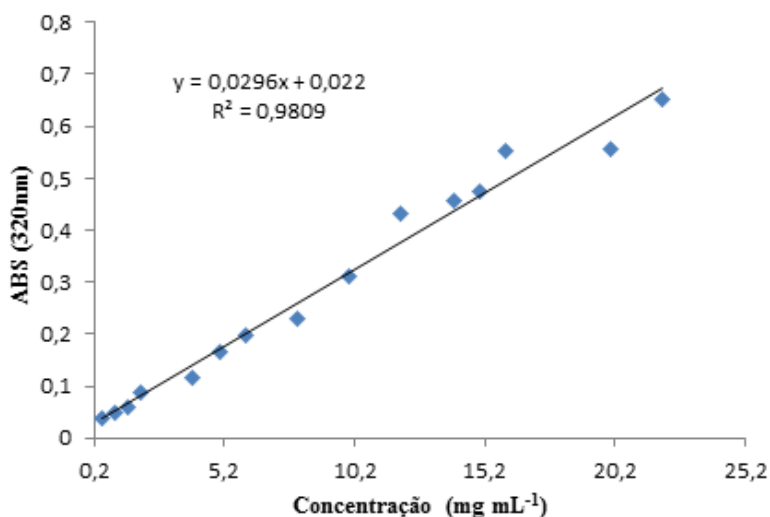
A morfologia das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV foi avaliada por micrografias, realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com um Microscópio Eletrônico marca JEOL, modelo JSM-6390LV. Com as micrografias de MEV, procedeu-se à determinação do tamanho das partículas encapsuladas, utilizando software Size Meter versão 1.1 (CARLSON; BOLZAN, 2001). O método consiste nas medidas do comprimento e espessura, sendo levada em consideração a maior medida. Segundo o autor do software, avaliava-se a maior dimensão característica das partículas, sendo assim, possível verificar o tamanho real da partícula. Também foram calculados os desvios padrão e variância.

4.16 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL E EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO

O percentual real e a eficiência do encapsulamento de acetato de eugenila foram determinados por espectrometria na região UV visível, utilizando o método descrito por Franceschi et al. (2008), Boschetto et al. (2014) e Machado et al. (2014). O método utilizado baseia-se na quantificação da massa de encapsulado (princípio ativo e polímero) em solvente, pela leitura em espectrofotômetro UV-VIS.

Primeiramente, foi construída uma curva de calibração para o acetato de eugenila, utilizando o diclorometano como solvente. Fez-se a varredura para obter o comprimento de onda no qual ocorre a maior absorção no UV-VIS, fazendo-se em seguida as leituras das absorbâncias para soluções com diferentes concentrações, obtendo-se assim, a curva de calibração (Figura 6).

Figura 6 - Curva padrão para determinação do percentual real de encapsulamento e eficiência de encapsulamento.



A curva de calibração foi utilizada para a realização dos cálculos de percentual real (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE). Para as análises no espectrofotômetro, primeiramente pesou-se aproximadamente 0,100 g da amostra encapsulada em balança analítica (AY220 Shimadzu) e avolumou-se com diclorometano em balões de 10 mL. A solução foi então analisada no espectrofotômetro de UV-VIS 800XI FEMTO a 320 nm. Como branco foi empregado PHBV solubilizado em diclorometano.

Após as leituras de absorbância do acetato de eugenila, determinou-se a concentração deste composto em diclorometano com a curva de calibração. Com base no resultado de concentração, obteve-se a massa de acetato de eugenila encapsulada para as diferentes amostras, e a partir disso obteve-se então o percentual real de encapsulado (PRE) e

eficiência de encapsulamento (EE), a partir das seguintes equações (4) e (5) (KALOGIANNIS et al., 2006).

$$PRE (\%) = \frac{\text{massa do composto encapsulado}}{\text{massa do composto} + \text{massa de PHBV}} \times 100 \quad (4)$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Percentual real de encapsulamento}}{\text{percentual teórico de encapsulamento}} \times 100 \quad (5)$$

O percentual teórico encapsulado é a razão entre a massa do acetato de eugenila e a soma das massas do composto e PHBV, sendo este, o percentual máximo de encapsulamento de acetato de eugenila em PHBV.

4.17 COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO ACETATO DE EUGENILA ENCAPSULADO EM PHBV

Para avaliar o comportamento de liberação in vitro de acetato de eugenila encapsulado em PHBV, adotou-se o procedimento semelhante ao de Lionzo (2007) e Priamo (2011). Sendo que nesta etapa, as partículas encapsuladas foram submetidas aos solventes puros isopropanol e acetato de etila, para assim obter o comportamento de liberação.

Nas amostras já encapsuladas (aproximadamente 0,01 mg.mL⁻¹) foram adicionados 50 mL dos solventes (isopropanol e acetato de etila separadamente). Os recipientes foram fechados e colocados em shaker (incubadora com agitação orbital MA 410 CFT – MARCONI) a 28 °C e agitação de 80 rpm, conforme sugerido por Priamo (2011).

Em tempos específicos foram retiradas alíquotas de 2 mL, sendo que a mesma quantidade de solvente puro adicionada ao sistema, para manter o volume constante. As amostras foram filtradas e em seguida levadas ao espectrofotômetro para leitura da absorbância a 320 nm, a fim de determinar a concentração de acetato de eugenila no meio de liberação em função do tempo.

4.18 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

Esta técnica foi utilizada para detectar a presença e a forma como o acetato de eugenila foi encapsulado. Utilizou-se a amostra que obteve melhor eficiência de encapsulamento, preparando lâminas com água e uma pequena quantidade da amostra. A análise de microscopia

óptica confocal foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho. Em um primeiro momento serão apresentados os resultados referentes à produção de acetato de eugenila via síntese enzimática e catálise química heterogênea. Em seguida serão discutidos os resultados referentes a atividade antimicrobiana finalizando com o encapsulamento empregando fluido supercrítico.

5.1 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A avaliação da produção de acetato de eugenila via síntese enzimática em sistema de livre de solvente assistida por ultrassom foi realizada por meio do estudo das variáveis que exercem influência no processo. Para tanto, optou-se pelo uso de planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , no qual se estudou o efeito da razão molar dos substratos, temperatura, concentração de enzima e potência de ultrassom na conversão em acetato de eugenila. Foram empregadas três diferentes lipases comerciais como catalisadores enzimáticos: Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, sendo o tempo de reação fixado em 2 horas para todos os ensaios. A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , com as variáveis reais e codificadas, e as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila.

Tabela 12 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2⁴⁺¹ com as variáveis e reais e codificadas, com respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando diferentes lipases comerciais como catalisadores na catálise enzimática.

Ensaio	Razão molar (mol/mol) ^a	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (% m/m)	Potência ultrassom (%)	Acetato de eugenila (%)		
					Novozym 435	Lipozyme TL IM	Lipozyme RM IM
1	-1(1:1)	-1(40)	-1(1)	-1(40)	60,9	49,4	52,9
2	1(1:5)	-1(40)	-1(1)	1(100)	58,7	99,7	98,6
3	-1(1:1)	1(60)	-1(1)	1(100)	5,0	27,4	22,1
4	1(1:5)	1(60)	-1(1)	-1(40)	56,8	99,8	86,4
5	-1(1:1)	-1(40)	1(10)	1(100)	4,6	48,4	22,4
6	1(1:5)	-1(40)	1(10)	-1(40)	56,8	99,6	98,9
7	-1(1:1)	1(60)	1(10)	-1(40)	63,7	40,9	27,3
8	1(1:5)	1(60)	1(10)	1(100)	69,8	99,6	90,2
9	0 (1:3)	0 (50)	0(5,5)	0(70)	69,5	87,2	93,9
10	0 (1:3)	0 (50)	0(5,5)	0(70)	69,6	89,4	95,1
11	0 (1:3)	0 (50)	0(5,5)	0(70)	69,5	88,4	99,8

^a mol de eugenol: mol de anidrido acético

Na Tabela 12 observa-se que as maiores conversões em acetato de eugenila foram obtidas quando Lipozyme TL IM foi empregada como catalisador, sendo que a maior conversão alcançada foi de 99,8% (ensaio 4) empregando razão molar de eugenol e anidrido acético de 1:5, 60 °C, concentração de enzima de 1% e potência de ultrassom de 40% de 132 W. Porém, conversões próximas também foram alcançadas em menor temperatura e maior potência de ultrassom (ensaio 2), bem como maior concentração de enzima e potência do ultrassom (ensaio 8). A reprodutibilidade dos dados apresentados na Tabela 12 pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) que apresentaram valores próximos entre si, cujas médias foram de 69,53±0,06%, 88,33±1,10% e 96,27±3,12% para a Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, respectivamente.

Desta forma, o uso de ultrassom se apresenta como uma tecnologia alternativa para a produção ésteres onde a lipase também já obteve sucesso como catalisador em diversos relatos encontrados na literatura, uma vez que foram apresentadas elevadas conversões em ésteres em sistemas onde as mesmas atuaram como catalisadores, conforme mostra a Tabela 13. Por esta tabela é possível observar que as conversões obtidas no presente estudo são semelhantes ou superiores às reportadas na literatura na produção de ésteres de aroma (Tabela 13). Além disso, as condições experimentais de razão molar, temperatura e potência de ultrassom estão de acordo com os estudos reportados na literatura. Em relação à concentração de enzima a comparação geral é um pouco dificultada devido à heterogeneidade de unidades nas quais este parâmetro é expresso, porém, é possível observar que a concentração de enzima que favoreceu a conversão em acetato de eugenila é inferior às reportadas na literatura.

Tabela 13 - Comparativo do presente estudo com a literatura na produção de ésteres de aroma via síntese enzimática assistida por energia ultrassônica.

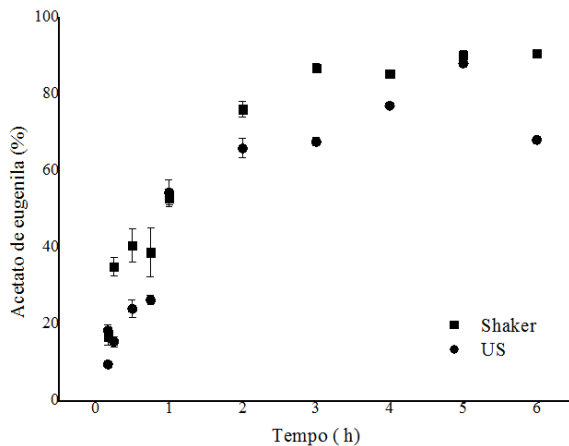
Éster	Catalisador	Condições experimentais	Conversão (%)	Referência
Acetato de eugenila	Lipozyme TL IM	1:5, 60 °C, 1% de enzima, 40% de potência do US ^a , 2 h	99,8	Presente estudo
Ésteres de ácido caféico	Novozym 435	72.66 °C, potência do US 1,64 W.m ⁻² , 0,046 mL.min ⁻¹	92,11	Chen et al. (2011)
Ascorbil palmito	Novozym 435	1:9, 70°C, 5% de enzima, 100% de potência do US ^a , 3 h	27	Lerin et al. (2011)
Ésteres de fitoesteróis	Lipase de <i>Canadita</i> sp.	1:1,5, 60 °C, 20 mg.mL ⁻¹ de enzima, 100% de potência do US ^b , 8 h	85,7	Zheng et al. (2012)
4-Metoxi-cinamoil-glicerol	Novozym 435	1:5, 65 °C, 15 mg.mL ⁻¹ de enzima, 100% de potência do US ^c , 24 h	55	Guo et al. (2013)
Acetato de butila	Novozym 435	1:3,6, 46 °C, 7% de enzima, 100% de potência do US, 2,5 h	94	Martins et al. (2013)
Ésteres de resveratrol	Novozym 435	1:5,5, 60 °C, 1000 PLU de enzima, 100% de potência do US ^c	77	Kuo et al. (2013)
Butirato de isoamila	Novozym 435	1:2, 60 °C, 2% de enzima, 83% de potência do US ^d , 3 h	96	Bansode e Rathod (2014)
Metil cafeato	Novozym 435	75 °C, 60 g.L ⁻¹ de enzima, 100% de potência do US ^c , 9 h	99,8	Wang et al. (2015)

** US: Ultrassom; ^aultrassom de 132 W; ^bultrassom de 200 W; ^cultrassom de 150 W; ^dultrassom de 100 W.

Embora o uso do ultrassom tenha alcançado resultados satisfatórios, ao longo do trabalho estes não foram reproduzidos. Ao final do tempo reacional, a mistura apresentava um aspecto pastoso e cor esbranquiçada, provavelmente devido ao rompimento do suporte da enzima. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato que não foi possível determinar a atividade da enzima no final da reação nos dois métodos empregados. Primeiramente a atividade da enzima foi determinada empregando a metodologia descrita por Oliveira et al. (2006) onde a atividade enzimática foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico, sendo que a enzima apresentou atividade negativa. Então optou-se pelo método descrito por Cavalcanti-Oliveira et al. (2005). O sistema reacional foi composto por uma emulsão de azeite de oliva e goma arábica em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, sob agitação mecânica, porém também não foi possível quantificar a atividade enzimática, provavelmente devido à perda de sua atividade catalítica. Batistella et al.(2012b) avaliaram a estabilidade da Lipozyme IM submetida à energia ultrassônica e observaram que tanto o uso de etanol como solvente quanto a energia ultrassônica causaram danos ao suporte utilizado para a imobilização da enzima.

Além dos danos observados no biocatalisador, a reação apresentou conversões abaixo de 10%, o que também impossibilitou o avanço para as demais etapas do presente estudo. Desta forma, para a continuidade do estudo foi avaliada a possibilidade do uso do shaker. A Figura 7 apresenta a cinética da produção de acetato de eugenila catalisada pela Lipozyme TL IM nos ensaios empregando energia ultrassônica (100% de potência) e agitação em shaker (150 rpm). Ambas as cinéticas foram conduzidas por 6 h, nas mesmas condições experimentais: razão molar de substratos de 1:3, concentração de enzima de 5% e temperatura de 55 °C.

Figura 7 - Cinética da produção enzimática catalisada por Lipozyme TL IM de acetato de eugenila empregando energia ultrassônica (100% de potência) e shaker (150 rpm) nas mesmas condições experimentais: razão molar de substratos de 1:3, concentração de enzima de 5% e temperatura de 55 °C.



A partir da Figura 7 é possível observar que conversões mais elevadas em acetato de eugenila foram obtidas nas reações conduzidas em shaker, após 3 h de reação. Embora o ultrassom não tenha contribuído para o aumento da conversão em éster, a utilização deste resultou em um aumento da velocidade inicial da reação, $46,86 \text{ h}^{-1}$, enquanto que a velocidade inicial nos ensaios conduzidos em shaker foi de $27,89 \text{ h}^{-1}$. Esta informação está de acordo com Cintas e Luche (1999) e Lerin et al. (2014) que apontam que um dos principais benefícios atribuídos ao uso do ultrassom em reações enzimáticas é o aumento da velocidade inicial da reação. Quando ondas de ultrassom são propagadas através de um meio líquido, ocorre a interação entre as ondas, o líquido e o gás dissolvido, acarretando em um fenômeno conhecido como cavitação acústica (CHANDRAPALA, 2012). A cavitação consiste na criação e implosão de microbolhas de gás e vapor no centro do líquido, devido às oscilações de pressão (BARBOSA; SERRA, 1992). Ciclos periódicos de oscilação de pressão provocam um aumento do tamanho das bolhas que ao atingirem um tamanho crítico implodem, liberando grande quantidade de energia em pontos localizados no líquido, proporcionando uma eficiente agitação do meio, o que pode resultar em

um aumento da velocidade inicial da reação (YACHMENEV et al., 2004; LORIMER; MASON, 1987; YU et al., 2010).

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram obtidos por Xiao et al. (2005) avaliando a produção de éster de açúcar através de reação catalisada por lipase em diferentes solventes, empregando energia ultrassônica e shaker. Os autores não observaram aumento na conversão em éster quando acetonitrila foi empregada como solvente.

Rufino et al. (2010) avaliaram o efeito do ultrassom na produtividade de ésteres de xilitol via esterificação catalisada por diferentes lipases, e observaram que embora para alguns catalisadores o ultrassom não tenha contribuído para obtenção de maiores conversões, o uso deste resultou em maior velocidade média de produção, $5,03 \text{ mmol.h}^{-1}$, enquanto que nos ensaios conduzidos em shaker obteve-se $1,61 \text{ mmol.h}^{-1}$. O mesmo efeito pode ser observado no estudo desenvolvido por Martins et al. (2013) que obtiveram conversões mais elevadas na produção de acetato de butila empregando agitação mecânica, porém velocidade média de produção significativamente mais elevada empregando radiação ultrassônica (800 mmol.L^{-1}) quando comparada com a agitação mecânica (115 mmol.L^{-1}). Já no estudo de Wang et al. (2015) o ultrassom contribuiu para a redução do tempo reacional e aumento da velocidade máxima da reação, sendo que quando os ensaios foram incubados em banho ultrassônico a conversão foi de 99,79% após 9 h e velocidade máxima de $1,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto que ensaios conduzidos em shaker alcançaram conversões de 96,54% em 36 h e velocidade máxima de $0,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na produção de metil cafeato.

Assim, diante do exposto, como o uso de shaker alcançou conversões semelhantes às obtidas com o uso de ultrassom, no mesmo tempo reacional e o sistema agitado mecanicamente sem auxílio do ultrassom foi capaz de manter a integridade da enzima/suporte, optou-se pela continuidade do trabalho empregando shaker.

5.2 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA

5.2.1 Seleção do catalisador

A seleção do catalisador enzimático para a produção de ésteres é considerada uma das mais importantes etapas no processo de esterificação, uma vez que as lipases oriundas de diferentes microorganismos podem apresentar diferentes especificidades frente aos

substratos empregados no processo. Este fato pode ser observado no estudo de Yadav e Lathi (2004) que avaliaram diferentes lipases comerciais (Novozym 435, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Lipozyme PS) como catalisadores na produção de citronelol laurato e observaram, para as mesmas condições experimentais, conversões de 50% para a Novozym 435, 40% para a Lipozyme RM IM, enquanto que para a Lipozyme TL IM a conversão em éster foi de 12% e nenhuma conversão foi observada com a Lipozyme PS. Gamgui et al. (2006) também demonstraram que diferentes lipases apresentam diferentes especificidades pelo mesmo substrato. Os autores observaram que a Novozym 435 favoreceu a conversão em acetato de isoamila (30%) enquanto que a lipase não comercial de *Staphylococcus simulans* imobilizada em alginato de cálcio apresentou conversões de 18%, nas mesmas condições operacionais.

Desta forma, na seleção do catalisador para a síntese enzimática de acetato de eugenila foram avaliadas três lipases comerciais: Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, conforme mostra a Tabela 14. Para tanto, foram utilizadas as condições otimizadas obtidas por Chiaradia et al. (2012) que avaliaram a síntese de acetato de eugenila catalisada por Novozym 435, as quais foram: concentração de enzima 5,5% (m/m), em relação a massa total de substrato, razão molar 1:3 (mol de eugenol: mol de anidrido acético), temperatura 50 °C, agitação 150 rpm e tempo reacional de 2 h.

Tabela 14 - Seleção do catalisador para produção de acetato de eugenila via síntese enzimática.

Catalisador	Acetato de eugenila (%)
Novozym 435	41,37 ± 2,02
Lipozyme TL IM	87,21 ± 7,64
Lipozyme RM IM	67,11 ± 8,41

Na Tabela 14 é possível observar que a Lipozyme TL IM apresentou maior conversão (87,21%), enquanto que as conversões obtidas pela Novozym 435 e Lipozyme RM IM foram de 41,37 e 67,11%, respectivamente. Desta forma, a Lipozyme TL IM foi considerada como catalisador potencial para a produção de acetato de eugenila via síntese enzimática e utilizada nas etapas subsequentes deste trabalho.

A Lipozyme TL IM é descrita na literatura como biocatalisador na produção de biodiesel (YADAV; LATHI, 2004; KHOR et al., 2010;

BASRI et al., 2013). Porém, estudos também apontam esta enzima como uma alternativa interessante na síntese de outros ésteres de interesse industrial. Chaibakhsh et al. (2012) obtiveram conversões de 72,2% na esterificação enzimática do eugenol e ácido caprílico empregando Lipozyme TL IM como biocatalisador. Skoronski et al. (2010) também usaram este catalisador na síntese do éster alifático octanoato de pentila, obtendo conversões de 95%. Além disso, o uso da Lipozyme TL IM apresenta uma vantagem de importância econômica, uma vez que comparada com a Novozym 435, este catalisador apresenta um custo reduzido, fato que pode vir a viabilizar economicamente o processo de produção de ésteres através da síntese enzimática (WANG et al., 2015). Ainda segundo informações obtidas do fornecedor Novozymes, a Lipozyme TL IM apresenta um custo aproximado de 100 USD, a Lipozyme RM IM encontra-se em torno de 150 USD e a Novozym 435 1500 USD.

5.2.2 Avaliação das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador

Para avaliar o efeito da razão molar dos substratos, temperatura e concentração de enzima na conversão em acetato de eugenila, via síntese catalisada Lipozyme TL IM, primeiramente, optou-se por um planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a melhor condição para a produção de acetato de eugenila. A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais e codificadas, e com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Lipozyme TL IM como catalisador, em 2 horas de reação e 150 rpm de velocidade de agitação.

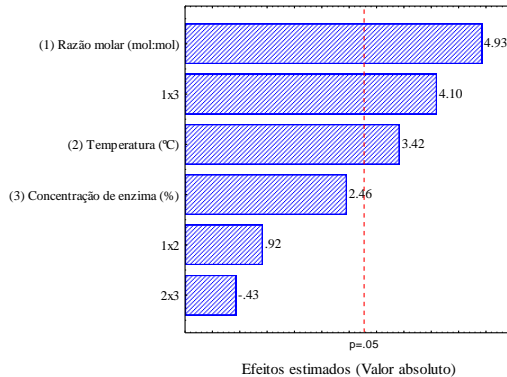
Pela Tabela 15 pode-se observar que o ensaio 8 foi o que conduziu à maior conversão em acetato de eugenila (91,76%) na razão molar de 1:5 mol eugenol:anidrido acético, 60 °C de temperatura e 15% de enzima. A reprodutibilidade dos dados apresentados nesta na Tabela 15 pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) que apresentaram valores próximos entre si, cuja média foi de $47,53 \pm 1,58\%$. Estes resultados foram tratados estatisticamente e os efeitos absolutos são mostrados na Figura 8.

Tabela 15 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Ensaio	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (% m/m)	Conversão (%)
1	1:1 (-1)	40 (-1)	5 (-1)	30,06
2	1:5 (1)	40 (-1)	5 (-1)	38,89
3	1:1 (-1)	60 (1)	5 (-1)	53,58
4	1:5 (1)	60(1)	5 (-1)	52,76
5	1:1 (-1)	40 (-1)	15 (1)	33,45
6	1:5 (1)	40 (-1)	15 (1)	63,53
7	1:1 (-1)	60 (1)	15 (1)	34,20
8	1:5 (1)	60 (1)	15 (1)	91,76
9	1:3 (0)	50 (0)	10 (0)	45,88
10	1:3 (0)	50 (0)	10 (0)	47,69
11	1:3 (0)	50 (0)	10 (0)	49,02

^a eugenol:anidrido acético

Figura 8 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da concentração de enzima, temperatura e razão molar de substratos, na produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.



O diagrama de Pareto da Figura 8 demonstra que as razões molares entre os substratos e a temperatura apresentam um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão em acetato de eugenila, cujo aumento pode conduzir a maiores conversões. Já a concentração da enzima apresentou efeito não significativo positivo

sobre a conversão em acetato de eugenila. Também pode-se observar um efeito significativo positivo na interação razão molar e concentração de enzima, sendo esta única interação que apresentou efeito significativo. Com base nestes resultados do primeiro planejamento experimental, foi realizado um segundo planejamento (Tabela 16), no qual as variáveis estudadas foram a razão molar de substratos e a temperatura. A concentração de enzima foi fixada em 5%. Embora o emprego de maiores concentrações de enzima tenham conduzido a conversões mais elevadas, optou-se pela menor concentração, uma vez que o custo do biocatalisador é amplamente citado na literatura como uma das principais desvantagens da síntese enzimática. Esta decisão foi reforçada pelo diagrama de Pareto, que demonstrou que o efeito da concentração de enzima não foi significativo na síntese de acetato de eugenila. Os ensaios foram conduzidos em shaker com agitação orbital, com 150 rpm por 2 h.

Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Ensaio	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Conversão Experimental (%)	Conversão Predita (%)	DPR ^b
1	1:5 (-1)	50 (-1)	25,03	22,03	11,98
2	1:9 (1)	50 (-1)	47,71	44,69	6,32
3	1:5 (-1)	70 (1)	82,58	79,57	3,65
4	1:9 (1)	70(1)	93,54	90,51	3,24
5	1:7 (0)	60 (0)	54,76	59,2	8,12
6	1:7 (0)	60 (0)	54,30	59,2	9,03
7	1:7 (0)	60 (0)	56,51	59,2	4,77

^a mol de eugenol: mol de anidrido acético

^b Erro Padrão relativo

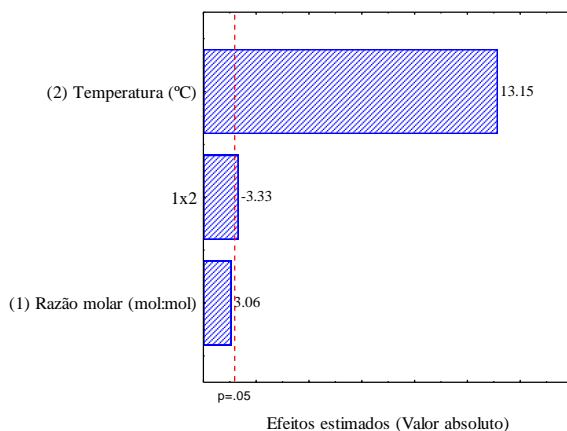
Pode-se observar na Tabela 16 que as maiores conversões em acetato de eugenila foram obtidas nos ensaios 3 (82,58%) e 4 (93,54%), ambos a 70 °C, com razão molar 1:5 e 1:9 eugenol:anidrido acético, respectivamente. reprodutibilidade dos dados apresentados nesta tabela pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) que apresentamos valores próximos entre si, cuja média foi de $55,19 \pm 1,17\%$.

As maiores conversões em temperaturas mais elevadas pode estar relacionado com o aumento da velocidade de reação por unidade de enzima (GOMES et al., 2006). Já para a razão molar de substratos,

deve-se levar em consideração que a reação de esterificação é reversível e que o aumento na quantidade de um dos reagentes poderá resultar em conversões mais elevadas, uma vez que, deslocará o equilíbrio químico na direção do produto. Além disso, o excesso de de um dos reagentes, em geral o ácido garante a formação do complexo enzima-grupo acila para posterior reação com o álcool, que no caso é o eugenol, conduzindo assim à formação do éster, e reduzindo desta forma a competição entre os aceptores, parâmetro essencial para uma reação de esterificação (OLIVEIRA et al., 2000).

Desta forma, a partir deste segundo planejamento fatorial, foi considerada como a melhor condição o ensaio 3, que utiliza menor excesso de anidrido acético em comparação ao ensaio 4. É importante ressaltar que o excesso de anidrido acético deve ser removido na etapa de purificação do éster, portanto, mesmo que o ensaio 3 tenha apresentado uma menor conversão em acetato de eugenila, sua escolha pode ser justificada pelo menor gasto energético na etapa de purificação do produto. Além disso, a razão molar entre os substratos não apresentou efeito significativo na produção do éster, quando Lipozyme TL IM foi empregada como catalisador, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis razão molar e temperatura, bem como as interações entre estas variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.



A Figura 9 evidencia que a temperatura é a variável que exerce maior influência na síntese de acetato de eugenila. Além disso, a interação entre as variáveis apresentaram efeito significativo e negativo, o que também influenciou na decisão de definir 70°C como temperatura ótima para a produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador. Elevar a temperatura ($> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) poderia acarretar em uma maior conversão em acetato de eugenila, porém, decidiu-se fixar a temperatura em 70 °C, para evitar danos à ação do catalisador em temperaturas maiores, uma vez que o fabricante recomenda a utilização deste no intervalo de temperatura de 40 a 70 °C. Richetti (2009) estudou a esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila, empregando Novozym 435 e Lipozyme RM IM como catalisadores, obtendo as maiores conversões a 70 °C. Além disso, estes resultados estão de acordo com o estudo de Ferraz et al. (2015) que também apontam a temperatura como variável mais significativa na síntese de geranyl propionato em sistema livre de solvente

A Tabela 17 mostra um comparativo do trabalho atual com trabalhos encontrados na literatura envolvendo a produção de ésteres de aroma, onde é possível observar que tanto as condições maximizadas quanto as conversões, foram semelhantes, superiores ou inferiores aos trabalhos encontrados na literatura. No entanto, deve-se salientar que as conversões superiores reportadas na literatura foram obtidas em tempos reacionais mais elevados ou empregando catalisadores mais caros, o que pode resultar em um processo oneroso. Desta forma, os resultados obtidos podem ser considerados promissores, uma vez que foi possível obter uma elevada conversão em éster empregando um catalisador de baixo custo.

Tabela 17 - Comparativo do presente estudo com a literatura na produção de ésteres de aroma.

Éster	Catalizador	Substratos	Solvente	Condições experimentais	Conversão (%)	Referência
Acetato de eugenila	Lipozyme TL IM	Óleo de cravo e anidrido acético	**	1:5, 70 °C, 5% de enzima, 150 rpm, 2 h.	82,58	Presente estudo
Citronelol laurato	Novozym 435	Citronelol e ácido láurico	Heptano	1:1, 30 °C, 3% de enzima, 500 rpm, 2 h	53,8	Yadav e Lathi (2004)
Acetato de isoamila	Lipase de <i>Staphylococcus simulans</i> Imobilizada em CaCO ₃	Ácido acético e álcool isoamílico	**	1:2, 37 °C, 60 IU de enzima, 200 rpm, 65 h.	64,0	Ghangui et al. (2006)
Benzoato de eugenol	Lipase de <i>Staphylococcus aureus</i> imobilizada em CaCO ₃	Ácido benzoico e eugenol	Clorofórmio	1,22, 240 IU, 41 °C	75	Horchani et al. (2010)
Geranyl oleato	Novozym 435	Óleo de citronela e ácido oléico	**	1:1, 70 °C, 10% de enzima, 150 rpm, 6 h.	82,5	Paroul et al. (2010)
Valerato de etila	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em MBGs ^a	Ácido valérico e etanol	Ciclohexano	37 °C, 150 rpm, 8 dias	100	Raghavendra, Sayania e Madamwar (2010)
Acetato de eugenila	Novozym 435	Eugenol e anidrido acético	**	1:3, 5,5% de enzima, 50 °C 6 h	99	Chiaradia et al. (2012)
Eugenil caprilato	Lipozyme TL IM	Eugenol e ácido caprílico	**	65 °C, 250 rpm, 100 mg de enzima, 1:2, 4 h	72,2	Chaibakhsh et al. (2012)
Geranyl propionato	Lipase de <i>Penicillium crustosum</i> imobilizada em alginato de sódio	Óleo de citronela e ácido propiônico	**	1:5, 150 rpm, 60 °C, 50% de enzima	76,0	Ferraz et al. (2015)

** Sistema livre de solvente orgânico; ^a microemulsão baseada em gel

A análise estatística dos resultados da Tabela 16 também permitiu a construção de um modelo empírico codificado para a conversão em acetato de eugenila em função da razão molar dos substratos e da temperatura. O modelo empírico resultante foi validado estatisticamente ($p < 0,05$) pela análise de variância (ANOVA), conforme pode ser observado na Tabela 18.

Tabela 18 - ANOVA para validação do modelo empírico codificado que descreve a produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

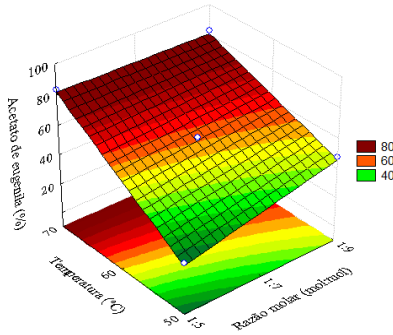
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	p-valor
Regressão	2437,88	3	812,63	64,38	0,003
Residual	37,87	3	12,62		
Total	2475,49	6			

$$R^2=0,9847; F_{\text{Tabelado}}=9,28$$

Verifica-se que o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9847 sugere que o modelo gerado com os dados da Tabela 16 pode explicar aproximadamente 98% da variação total dos resultados. O valor F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro, e indica a significância de cada fator do modelo. O valor de F calculado foi 64,38, o qual é aproximadamente 6 vezes maior que o F tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo.

A Figura 10 mostra a superfície de resposta para produção de acetato de eugenila em função da razão molar e da temperatura, onde é possível observar que a maior conversão em acetato de eugenila (93,54%) foi obtida com razão molar de eugenol: anidrido acético de 1:9, concentração de enzima de 5% a 70 °C com tempo reacional de 2 h e 150 rpm de agitação.

Figura 10 - Superfície de resposta para produção de acetato de eugenila em função da razão molar (eugenol:anidrido acético) e da temperatura, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.



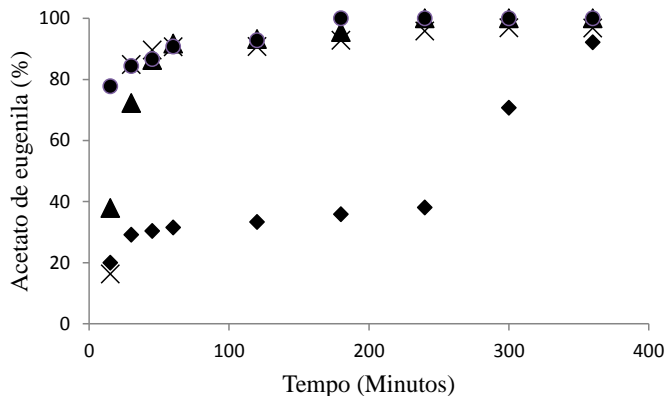
5.2.3 Estudo cinético da síntese de acetato de eugenila via síntese catalisada por Lipozyme TL IM

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas na produção de acetato de eugenila através do uso de delineamentos experimentais, os efeitos do teor de catalisador e a razão molar de substratos foram avaliados na cinética da reação a fim de definir um tempo reacional ideal. Foram realizadas cinéticas destrutivas, incubadas em skaker com agitação orbital de 150 rpm e 70 °C.

Efeito da razão molar de substratos

A razão molar entre os substratos é um dos parâmetros mais importantes nas reações de esterificação enzimática. Como a reação é reversível, um aumento na concentração de um substrato pode deslocar o equilíbrio químico, resultando em maiores conversões. Por outro lado, altas concentrações podem reduzir a taxa de reação devido ao efeito de inibição (HSIEH; NAIR; WU, 2006). Assim, o efeito da razão molar do eugenol e anidrido acético na produção de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 1:1 a 1:12 (eugenol:anidrido acético), sendo que a temperatura e a concentração de enzima foram mantidos fixos em 70 °C e 5% (m/m), respectivamente. Todos os ensaios foram conduzidos em shaker com agitação orbital de 150 rpm. A Figura 11 apresenta as conversões em acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Figura 11 - Cinética da síntese de acetato de eugenila (♦1:1, × 1:5, ▲1:9, ●1:12) com Lipozyme TL IM variando a razão molar eugenol:anidrido acético, com concentração de enzima de 5% (m/m) e 70 °C.



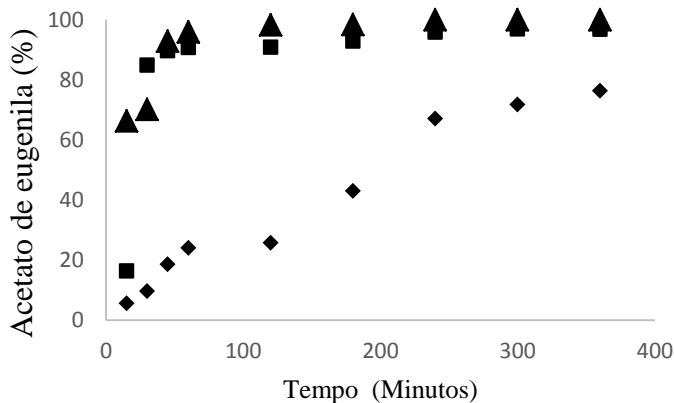
A partir da Figura 11 pode-se observar que as conversões obtidas usando uma razão molar de eugenol e anidrido acético de 1:1 são baixas ao longo dos 360 minutos. Já nas razões molares 1:5; 1:9 e 1:12 foram alcançadas conversões maiores que 90% em 60 min. Desta forma, levando-se em consideração que um excesso de anidrido acético na reação leva a um maior tempo de purificação do éster, e gera um maior custo de reagente, e uma vez que as conversões obtidas foram similares, foi selecionada como a melhor condição a razão molar de 1:5 em 120 min, que alcançou uma conversão de 92,86% em acetato de eugenila.

Os resultados obtidos no estudo cinético estão de acordo com os obtidos na etapa de seleção de variáveis significativas na produção de acetato de eugenila, onde foi selecionada a razão molar de 1:5 como melhor condição.

Efeito da concentração de enzima

O efeito do teor da concentração de enzima na produção de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 1 a 10% (m/m) sendo que a temperatura e a razão molar de substratos foram mantidas fixas em 70 °C e 1:5, respectivamente. A Figura 12 apresenta as conversões em acetato de eugenila obtidas no estudo cinético, empregando Lipozyme TL IM como catalisador.

Figura 12 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Lipozyme TL IM variando a concentração de enzima (◆1%, ■5%, ▲10%) (m/m), com razão molar de substratos de 1:5 e 70 °C.



A partir da Figura 12 pode-se observar que com 1% de enzima obteve-se as menores conversões em éster, sendo que a máxima (76,30%) foi alcançada em 360 minutos. Porém, com o aumento da concentração de enzima, observa-se um aumento na conversão em éster. Quando a enzima foi utilizada na concentração de 5% obteve-se 90,73% em 60 minutos e com 10% foi alcançada uma conversão de 92,81% em 45 minutos de reação. Como a diferença entre as conversões obtidas nas concentrações de 5 e 10% de enzima foram baixas, optou-se por considerar a concentração de 5% em 60 minutos como a melhor condição para a produção de acetato de eugenila via síntese enzimática catalisada por Lipozyme TL IM.

Os resultados obtidos no estudo cinético estão de acordo com os obtidos na etapa de seleção de variáveis significativas na produção de acetato de eugenila, onde foi selecionada a concentração de enzima de 5% (m/m substrato) como melhor condição. Nesta condição se reduz os custos de produção, uma vez que com menor quantidade de catalisador é possível obter conversões tão elevadas quanto às obtidas em concentrações mais elevadas de enzima. Além disso, um excesso de enzima pode propiciar a formação de aglomerados, tornando o sítio ativo da enzima menos disponível para os substratos no meio reacional, o que pode contribuir para uma diminuição da conversão da reação (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

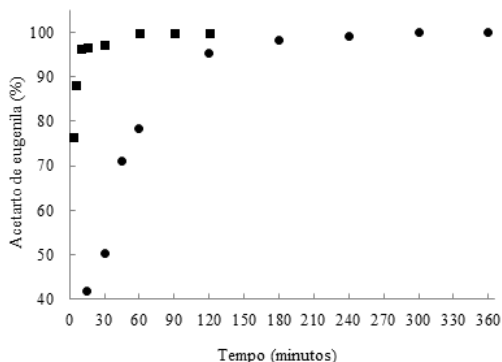
A síntese catalisada pelo Lipozyme TL IM é uma alternativa promissora para a produção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente, sendo que este fato pode ser observado a partir dos resultados obtidos na otimização das variáveis através dos delineamentos experimentais e estudo cinético. É importante ressaltar que os resultados mostraram que é possível obter elevadas conversões empregando tanto um catalisador quanto um processo (sistema livre de solvente orgânico) ambientalmente correto. Além disso, a maioria dos trabalhos da literatura descrevem a lipase comercial Novozym 435 como catalisador para a síntese de ésteres aromáticos. O fato da Lipozyme TL IM ter apresentado conversões elevadas também é um fator importante, uma vez que este catalisador é mais barato, apresentando vantagem econômica.

5.3 PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA VIA SÍNTESE QUÍMICA HETEROGÊNEA

5.3.1 Cinética preliminar

Na produção de acetato de eugenila via catálise heterogênea foram empregados dois diferentes catalisadores, peneira molecular de 4 Å e resina polimérica Amberlite XAD-16. Para determinar o tempo de reação foram realizadas cinéticas prévias, para cada um dos catalisadores (Figura 13). Os ensaios foram realizados em shaker sem agitação, a 55 °C, razão molar de substratos de 1:3 e teor de catalisador de 0,2 g.g⁻¹.

Figura 13 - Cinética para síntese química heterogênea de acetato de eugenila com teor de $0,2 \text{ g.g}^{-1}$ de catalisador (● peneira molecular de 4 \AA e ■ Amberlite XAD-16), razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético) e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.



Pela Figura 13 é possível observar conversão de 95,3% em 2 horas para a peneira molecular de 4 \AA e 97,1% em apenas 30 minutos para a Amberlite XAD-16. Assim, esses tempos foram escolhidos para a etapa de avaliação do efeito das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila via catálise química heterogênea.

Os resultados obtidos apontam que tanto a peneira molecular quanto a resina não iônica podem ser alternativas interessantes para a síntese de acetato de eugenila. A peneira molecular de 4 \AA foi empregada como catalisador na acetilação de nucleosídeos, sendo que as maiores conversões foram observadas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 horas (MEIER; PERGHER; SÁ, 2006). Kirumakki, Nagaraju e Narayanan (2004) avaliaram três diferentes zeólitas ($\text{H}\beta$, HY e HZSM5) como catalisadores na esterificação de álcool benzílico e ácido acético e observaram que HZSM5 foi mais específica para a produção de acetato de benzila, quando comparados com $\text{H}\beta$ e HY. A zeólita $\text{H}\beta$ apresentou uma conversão em acetato de benzila de 50% enquanto que a zeólita HZSM5 converteu 37%. Porém, a HZSM5 apresentou 100% de seletividade ao passo que $\text{H}\beta$ obteve uma seletividade de 80% com formação de produto secundário (éter dibenzil).

Em uma busca pela literatura atual, não foram encontrados trabalhos que utilizem Amberlite XAD-16 como catalisador. Porém, alguns autores empregaram diferentes resinas como catalisadores na esterificação de ésteres diversos. Lilja et al. (2001) avaliaram diferentes catalisadores químicos heterogêneos para a esterificação de diferentes

ácidos e os melhores resultados foram obtidos com a resina Amberlyst 15.

5.3.2 Seleção de condições operacionais para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea

Para avaliar as condições operacionais, tais como o uso de banho ultrassônico ou shaker e necessidade de agitação do meio reacional, foram realizados ensaios preliminares, conforme mostra a Tabela 19. Os ensaios preliminares foram realizados em shaker com agitação orbital e em banho ultrassônico, na razão molar de substratos de 1:3 (eugenol: anidrido acético) e temperatura de 55 °C, teor de catalisador de 0,2 g.g⁻¹, tanto para a peneira molecular de 4 Å quanto para a resina polimérica Amberlite XAD-16, sendo o tempo reacional de 2 horas para a peneira molecular e de 30 minutos para a Amberlite (cinética preliminar).

Tabela 19 - Condições experimentais dos ensaios preliminares utilizando os catalisadores químicos heterogêneos e suas respectivas conversões em acetato de eugenila.

Condições experimentais	Acetato de eugenila (%)
Peneira molecular de 4 Å, ultrassom (100%)	84,80
Peneira molecular de 4 Å, shaker (150 rpm)	87,20
Peneira molecular de 4 Å, shaker sem agitação	85,20
Amberlite XAD-16, shaker sem agitação	100,00
Sem catalisador, shaker (150 rpm)	0,00

Na Tabela 19 é possível observar que quando a peneira molecular de 4 Å foi empregada como catalisador, a maior conversão em acetato de eugenila (87,20%) foi obtida quando o sistema reacional foi mantido em shaker com agitação orbital de 150 rpm. Porém, conversão semelhante (85,20%) foi obtida quando o mesmo sistema foi mantido em shaker, sem agitação. A alta conversão no meio reacional sem agitação pode ser devido ao fato que estas podem agir como bombas moleculares, atraindo para o seu interior substratos pelos quais apresentam afinidade e após formação do produtos, este é expulso para o meio reacional (LUNA; SCHUCHARDT, 2001).

A resina polimérica Amberlite XAD-16 apresentou uma conversão de 100%, em shaker sem agitação. Desta forma, com o objetivo de simplificar o aparato experimental, nas etapas subsequentes deste trabalho optou-se pela incubação do sistema reacional em shaker sem agitação, uma vez que ambos os catalisadores alcançaram elevadas conversões nestas condições.

5.3.3 Avaliação do efeito das variáveis que interferem na síntese de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador

Para avaliar o efeito da razão molar entre os substratos, temperatura e teor de catalisador na conversão em acetato de eugenila, via catálise química heterogênea catalisada por peneira molecular de 4 Å, um delineamento composto central rotacional 2^3 (DCCR) com triplicata do ponto central foi realizado. Os ensaios foram realizados em banho termostatizado, sem agitação por 2 horas. A Tabela 19 apresenta a matriz do DCCR 2^3 com as variáveis reais e codificadas, sendo as respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila.

A partir da Tabela 20 pode-se verificar que as maiores conversões foram obtidas nos ensaios 8 (96,9%) e 12 (97,7%), sendo que, entre os dois ensaios, não prevaleceu nenhuma condição experimental avaliada. No ensaio 8 foram empregadas razão molar de substratos e teor de catalisador superiores às utilizadas no ensaio 12, no entanto, neste ensaio utilizou-se uma temperatura mais elevada. Assim, através das conversões obtidas no DCCR 2^3 , é possível observar que todas as variáveis estudadas influenciam na produção de acetato de eugenila. A reprodutibilidade dos dados apresentados nesta tabela pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 15, 16 e 17) que apresentaram valores próximos entre si, cuja média foi de $84,23 \pm 0,06\%$.

Este planejamento permitiu a obtenção de modelo empírico codificado com parâmetros lineares e quadráticos das variáveis estudadas. Foram calculados os efeitos principais e de interação das variáveis, apresentado na forma de gráfico de Pareto, como seus respectivos coeficientes para o modelo matemático (Figura 14), bem como a análise de variância (ANOVA) (Tabela 21) para determinar a validade do modelo.

Figura 14 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador, temperatura e razão molar de eugenol e anidrido acético, bem como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.

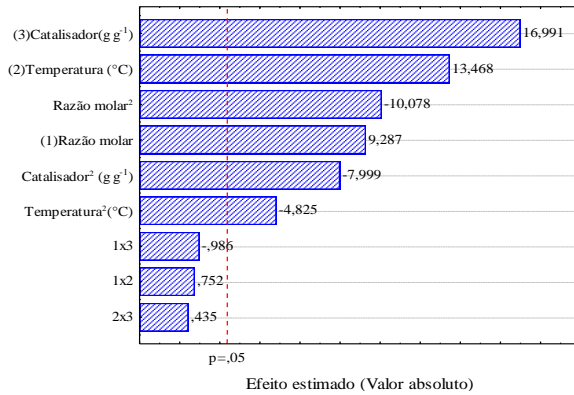


Tabela 20 - Matriz do DCCR 2³ com as variáveis e reais e codificadas, com respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.

Ensaio	Razão Molar ^a (mol: mol)	Temperatura (°C)	Catalisador (g.g ⁻¹)	Conversão Experimental (%)	Conversão Preditada (%)	Erro Padrão Relativo ^b (%)
1	-1 (1:1,5)	-1 (45)	-1 (0,1)	12,4	10,04	19,03
2	+1 (1:4,5)	-1 (45)	-1 (0,1)	30,3	31,30	3,30
3	-1 (1:1,5)	+1 (65)	-1 (0,1)	37,0	40,88	10,49
4	+1 (1:4,5)	+1 (65)	-1 (0,1)	60,0	62,14	3,57
5	-1 (1:1,5)	-1 (45)	+1 (0,3)	52,6	48,94	6,96
6	+1 (1:4,5)	-1 (45)	+1 (0,3)	65,2	70,20	7,67
7	-1 (1:1,5)	+1 (65)	+1 (0,3)	80,4	79,78	0,77
8	+1 (1:4,5)	+1 (65)	+1 (0,3)	96,9	101,04	4,27
9	-1,68 (1:0,48)	0 (55)	0 (0,2)	27,9	30,70	10,03
10	+1,68 (1:5,52)	0 (55)	0 (0,2)	72,6	66,42	8,52
11	0 (1:3)	-1,68 (38)	0 (0,2)	40,2	41,34	2,83
12	0 (1:3)	+1,68 (72)	0 (0,2)	97,7	93,15	4,66
13	0 (1:3)	0 (55)	-1,68 (0,032)	24,9	23,28	6,52
14	0 (1:3)	0 (55)	+1,68 (0,368)	90,4	88,63	1,96
15 (C)	0 (1:3)	0 (55)	0 (0,2)	84,3	84,43	0,15
16 (C)	0 (1:3)	0 (55)	0 (0,2)	84,2	84,43	0,27
17 (C)	0 (1:3)	0 (55)	0 (0,2)	84,2	84,43	0,27

^a mol de eugenol: mol de anidrido acético^b Erro Padrão relativo.

Pela Figura 14 pode-se observar que o teor de catalisador, a temperatura e a razão molar entre os substratos apresentaram efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de acetato de eugenila, sendo o catalisador o mais representativo, seguido da temperatura e razão molar eugenol:anidrido acético. Consta-se que o efeito de interação entre as variáveis estudadas não foi significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de acetato de eugenila.

A ANOVA apresenta valores de p-valor inferiores a 0,05. O valor de $F_{\text{calculado}}$ é superior ao valor de F_{tabelado} . Toda vez que o $F_{\text{calculado}}$ for maior que o F_{tabelado} rejeita-se a hipótese de que os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta são iguais, validando a diferença significativa ($p < 0,05$) (VIEIRA, 2006). Assim, o valor de coeficiente de correlação (R^2) e o $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para a regressão mostraram que o modelo foi capaz de representar os dados experimentais de conversão em acetato de eugenila no intervalo dos fatores investigados e permitiu a construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 15 a 17. Isso implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo empírico, conforme ilustrado pela conversão predita e erro padrão relativo, apresentados anteriormente na Tabela 20.

Tabela 21 - ANOVA para validação do modelo empírico codificado que descreve a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	P_{valor}
Regressão	12305,21	9	1367,24	76,44	<0,0001
Resíduos	125,21	7	17,89		
Total	12430,42	16			

$R^2 = 0,989$; $F_{\text{tabelado}0,95;9} = 3,68$

Figura 15 - Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da temperatura e da razão molar de eugenol e anidrido acético.

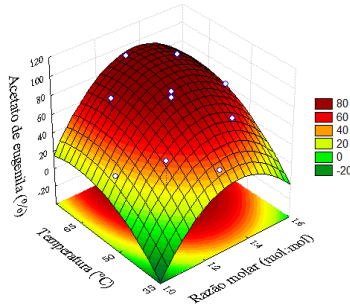


Figura 16 - Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da concentração de peneira e da razão molar de eugenol e anidrido acético

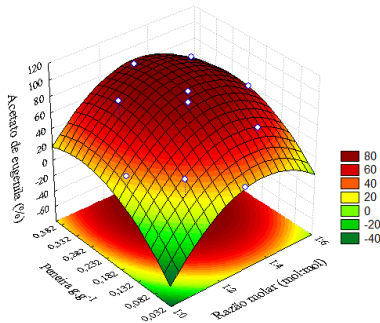
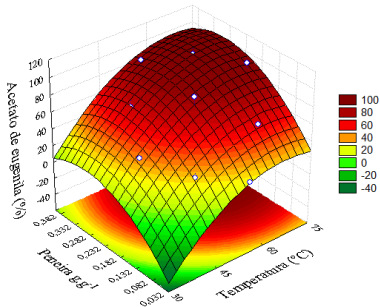


Figura 17- Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador, em função da concentração de peneira e da temperatura.



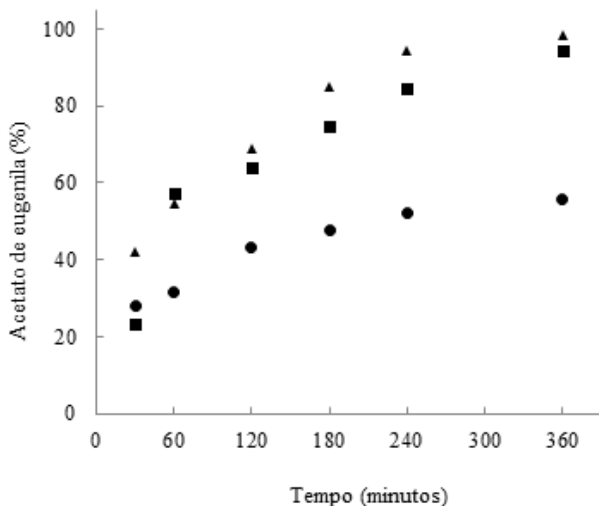
5.3.4 Estudo cinético da produção de acetato de eugenila via síntese química catalisada pela peneira molecular de 4 Å

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas na produção de acetato de eugenila através do uso de delineamentos experimentais, os efeitos do teor de catalisador, razão molar de substratos e temperatura foram avaliados na cinética da reação a fim de definir um tempo reacional ideal. Para tanto foram realizadas cinéticas destrutivas, incubadas em skaker sem agitação.

Efeito da razão molar de substratos

O efeito da razão molar do eugenol e anidrido acético na cinética de produção de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 1:1 a 1:3 (eugenol:anidrido acético), sendo que a temperatura e o teor de catalisador foram mantidos fixos em 55 °C e 0,125 g.g⁻¹, respectivamente. A Figura 18 apresenta as conversões em acetato de eugenila empregando peneira molecular de 4 Å como catalisador.

Figura 18 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando a razão molar eugenol:anidrido acético (● 1:1, ■ 1:2, ▲ 1:3) a 55 °C e teor de catalisador de 0,125 g.g⁻¹.



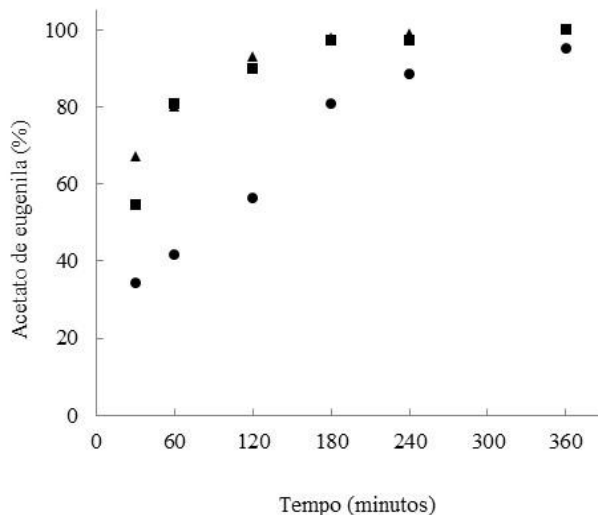
O aumento da razão molar de substratos resultou em maiores conversões, sendo que em 6 h obteve-se uma conversão de 98,6% na razão molar de 1:3. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no planejamento de experimentos, discutidos na seção anterior, que destacou a razão molar de 1:3 como sendo mais adequada para o sistema reacional utilizado na produção de acetato de eugenila. Além disso, sendo a reação de esterificação é reversível, o aumento na quantidade de um dos reagentes poderá deslocar o equilíbrio químico no sentido da formação de produto, resultando em maiores conversões.

Efeito do teor de catalisador

O efeito do teor de catalisador na produção de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 0,1 a 0,3 (g.g⁻¹) sendo que a temperatura e a razão molar de substratos foram mantidas fixas em 55 °C e 1:3 (mol de eugenol:mol de anidrido acético), respectivamente. A Figura 19 apresenta as conversões em acetato de eugenila obtidas no estudo cinético.

Pela Figura 19 pode-se observar que os teores de catalisador de 0,2 e 0,3 g.g⁻¹ apresentaram o mesmo efeito na conversão em acetato de eugenila, sendo que ambas obtiveram conversões de 100 % em 6 horas. Assim, a concentração de 0,2 g.g⁻¹ foi selecionada como a mais adequada para o sistema reacional utilizado na produção de acetato de eugenila. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na análise do planejamento experimental discutido na seção anterior, que mostrou que os teores de 0,2 e 0,3 g.g⁻¹ de peneira apresentaram conversões semelhantes.

Figura 19 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando o teor de catalisador (● 0,1, ■ 0,2, ▲ 0,3 g.g⁻¹), com temperatura de 55 °C e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).



Yadav e Yadav (2012) estudaram síntese de eugenil benzoato catalisada por UDCaT-5 e também observaram que o aumento do teor de catalisador de 0,012 e 0,015 g.cm⁻³. não favoreceu a conversão em éster. Laroque (2014) explica que esta redução pode ser devido ao fato que acima de uma determinada quantidade de catalisador, o número de sítios ativos podem ser maiores do que realmente exigido pelos substratos, inibindo a reação.

Kirumakki, Nagaraju e Narayanan (2004) observaram que o aumento do teor de catalisador de 0,5 para 1,5 g.g⁻¹ resultou em um aumento da conversão de 38 para 75% em acetato de benzila quando a zeólita HZSM5 foi empregada como catalisador, após 1 h de reação. No presente estudo foram observadas conversões próximas a 80%, em 1 hora de reação, para os teores de catalisador de 0,2 e 0,3 g.g⁻¹, resultado semelhante ao obtido por Kirumakki, Nagaraju e Narayanan (2004), porém empregando um teor de catalisador mais elevado.

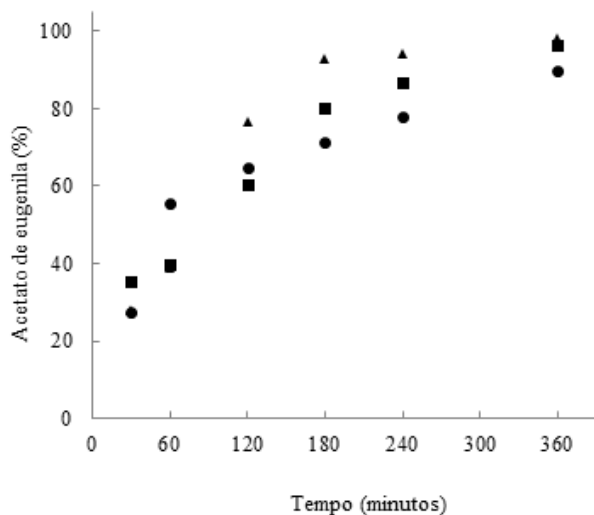
Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na produção de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 40 a 60 °C sendo que o teor de catalisador e a razão

molar de substratos foram mantidas fixas em $0,125 \text{ g.g}^{-1}$ e 1:3 (eugenol:anidrido acético), respectivamente. A Figura 20 apresenta as conversões em acetato de eugenila obtidas no estudo cinético.

O aumento na temperatura pode contribuir para a redução da viscosidade, aumentar a solubilidade e melhorar o processo de difusão dos substratos, reduzindo assim as limitações de transferência de massa e favorecendo a interação entre as partículas de catalisador e substratos, acarretando em maiores conversões. Analisando a Figura 20 é possível observar que tanto a temperatura de 50 quanto de 60 °C conduziram às maiores conversões em acetato de eugenila, sendo que na temperatura de 50 °C obteve-se 96,6% de conversão em acetato de eugenila, enquanto que a 60 °C a conversão foi de 98,2%.

Figura 20 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com peneira molecular de 4 Å variando a temperatura (● 40 °C, ■ 50 °C, ▲ 60 °C), com teor de catalisador $0,125 \text{ g.g}^{-1}$ e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).



Kirumakki, Nagaraju e Narayanan (2004) também observaram que o aumento da temperatura resultou em um aumento de conversão em acetato de benzila empregando as zeólitas H β , HY e HZSM5. Porém o aumento da temperatura também contribuiu para a redução da

seletividade das resinas H β e HY, resultando em formação de compostos que não o de interesse (éter dibenzil).

5.3.5 Avaliação do efeito das variáveis que afetam a síntese de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador

OS efeitos da razão molar dos substratos, temperatura e teor de catalisador na conversão em acetato de eugenila, via catálise heterogênea catalisada por Amberlite XAD-16 foram avaliados por um planejamento experimental fatorial 2³. As reações foram realizadas sem agitação e o tempo fixado em 30 minutos. A Tabela 22 apresenta a matriz planejamento fatorial com as variáveis reais e codificadas, sendo as respostas expressas em termos de conversão em acetato de eugenila.

Pela Tabela 22 é possível observar que os ensaios 6 e 8 obtiveram as maiores conversões com 98,3% e 100%, respectivamente. Nestes ensaios todas variáveis estudadas encontram-se no nível mais elevado. A reprodutibilidade dos dados apresentados nesta Tabela pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) que apresentaram valores próximos entre si, cuja média foi de 90,67 \pm 0,67%. Sá et al. (2007) também obtiveram uma conversão de 100% em 30 minutos empregando a resina Amberlyst 15 como catalisador para a acetilação de α -metileno- β -hidróxi ésteres.

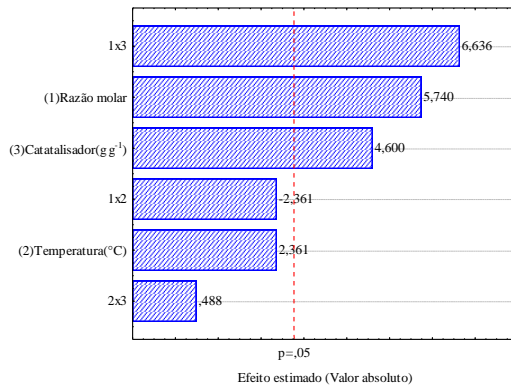
Tabela 22 - Matriz do planejamento fatorial 2³, com as variáveis reais e codificadas, com as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila, empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.

Ensaios	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Catalisador (g.g ⁻¹)	Conversão (%)
1	1:1,5 (-1)	45 (-1)	0,1 (-1)	83,3
2	1:4,5 (1)	45 (-1)	0,1 (-1)	86,2
3	1:1,5 (-1)	65 (1)	0,1 (-1)	89,6
4	1:4,5 (1)	65 (1)	0,1(-1)	84,5
5	1:1,5 (-1)	45 (-1)	0,3 (1)	81,3
6	1:4,5 (1)	45 (-1)	0,3 (1)	98,3
7	1:1,5 (-1)	65 (1)	0,3 (1)	86,6
8	1:4,5 (1)	65 (1)	0,3 (1)	100
9	1:3,0 (0)	55 (0)	0,2 (0)	90,1
10	1:3,0 (0)	55 (0)	0,2 (0)	91,4
11	1:3,0 (0)	55 (0)	0,2 (0)	90,5

Os resultados deste planejamento foram avaliados estatisticamente e são apresentados no diagrama de Pareto (Figura 21), onde observou-se que as variáveis que apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) na conversão foram a razão molar, teor de catalisador, sendo que a interação entre essas variáveis foi o que mais influenciou na conversão em ésteres, enquanto que a temperatura não apresentou efeito significativo.

A Figura 21 mostra que das variáveis avaliadas neste planejamento, a razão molar dos substratos e o teor de catalisador apresentam efeito significativo positivo, enquanto que a temperatura não apresentou efeito significativo.

Figura 21 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador, temperatura da razão molar de eugenol e anidrido acético, bem como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.



A partir destes resultados obtidos no primeiro planejamento e visando otimizar a produção de acetato de eugenila, um delineamento fatorial 2^2 completo foi realizado, utilizando as condições do ensaio 2 como ponto central (Tabela 23). Como a temperatura não apresentou efeito significativo, esta variável foi fixada em 55 °C, avaliando o efeito da razão molar entre os substratos e teor de catalisador na conversão em acetato de eugenila. Porém, o teor de catalisador não foi aumentado, visto que acima de 0,2 g.g⁻¹ o meio reacional apresenta-se como pastoso, o que dificulta a recuperação do catalisador.

Analisando a Tabela 23 é possível observar que as maiores conversões em éster foram obtidas nos ensaios 3 e 4, sendo que em ambos os ensaios o teor de catalisador foi de $0,175 \text{ g.g}^{-1}$. Porém, no ensaio 4 a razão molar de substratos foi o dobro da utilizado no ensaio 3, resultando em uma conversão levemente mais elevada. Assim, a condição otimizada para a produção de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 foi definida como a relativa à razão molar de substratos de 1:3, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e concentração de catalisador de $0,175 \text{ g.g}^{-1}$. A reprodutibilidade dos dados apresentados nesta tabela pode ser representada pelos pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) que apresentaram valores próximos entre si, cuja média foi de $79,37 \pm 0,71\%$.

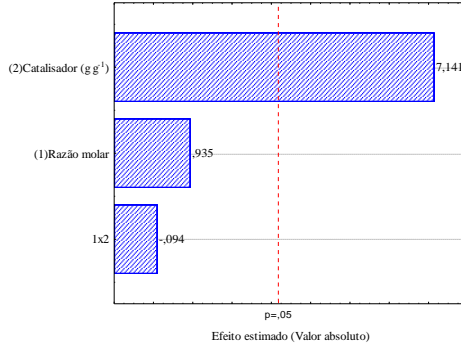
Tabela 23 - Planejamento de experimento 2² utilizando Amberlite XAD-16 como catalisador com as respostas em termos de conversão de acetato de eugenila em 30 minutos de reação e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ensaio	Razão molar ^a (mol:mol)	Catalisador (g.g^{-1})	Conversão experimental(%)	Conversão predita (%)	Erro padrão relativo (%)
1	1:3(-1)	0,025 (-1)	42,1	46,3	10,0
2	1:6 (1)	0,025 (-1)	49,2	52,8	7,3
3	1:3(-1)	0,175 (1)	92,0	95,6	3,9
4	1:6 (1)	0,175 (1)	97,8	102,0	4,3
5	1:4,5 (0)	0,1 (0)	78,6	74,2	5,6
6	1:4,5 (0)	0,1 (0)	79,5	74,2	6,7
7	1:4,5 (0)	0,1 (0)	80,0	74,2	7,3

^aeugenol:anidrido acético

O fato de o aumento da razão molar não ter contribuído de forma pronunciada na conversão em éster, pode estar relacionado com o fato que apenas o teor de catalisador foi significativo na análise estatística (Figura 22). Este planejamento permitiu a obtenção de modelo empírico codificado das variáveis estudadas, bem como a análise de variância (ANOVA) para determinar a validade do modelo.

Figura 22 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito do teor de catalisador e da razão molar de eugenol e anidrido acético, bem como das interações entre as variáveis, na produção de acetato de eugenila empregando Amberlite XAD-16 como catalisador.



A análise de variância (ANOVA) (Tabela 24), que apresentou um coeficiente de correlação (0,945) e um valor de F calculado maiores que F Tabelado, validaram estatisticamente o modelo.

Tabela 24 - ANOVA para validação do modelo matemático na síntese de acetato de eugenila catalisada por Amberlite XAD-16.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	p-valor
Regressão	2467,59	3	822,53	17,29	0,0213
Resíduos	142,71	3	47,57		
Total	2610,29	6			

$$R^2 = 0,945; F_{\text{tabelado}, 0,95; 3} = 9,28$$

5.3.6 Estudo cinético da síntese de acetato de eugenila via síntese catalisada por Amberlite XAD-16

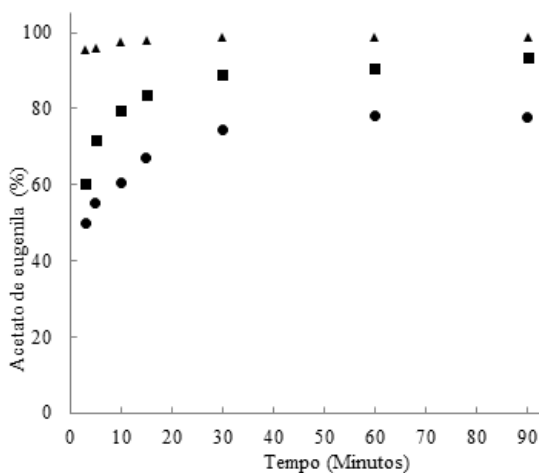
Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas na produção de acetato de eugenila através do uso de delineamentos experimentais, os efeitos do teor de catalisador, razão molar de substratos e temperatura foram avaliados na cinética da reação a fim de definir um tempo reacional ideal. Para tanto foram realizadas cinéticas destrutivas, incubadas em skaker sem agitação.

Efeito da razão molar de substratos

O efeito da razão molar de substratos na produção de acetato de eugenila foi avaliado no intervalo 1:1 a 1:3, mantendo fixo o teor de

Amberlite XAD-16 ($0,2 \text{ g.g}^{-1}$) e a temperatura ($55 \text{ }^\circ\text{C}$). Todos os ensaios foram incubados em skaker e sem agitação. A Figura 23 apresenta as curvas experimentais da evolução temporal da conversão.

Figura 23 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando a razão molar eugenol:anidrido acético (● 1:1, ■ 1:2, ▲ 1:3), com temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e teor de catalisador $0,2 \text{ g.g}^{-1}$.

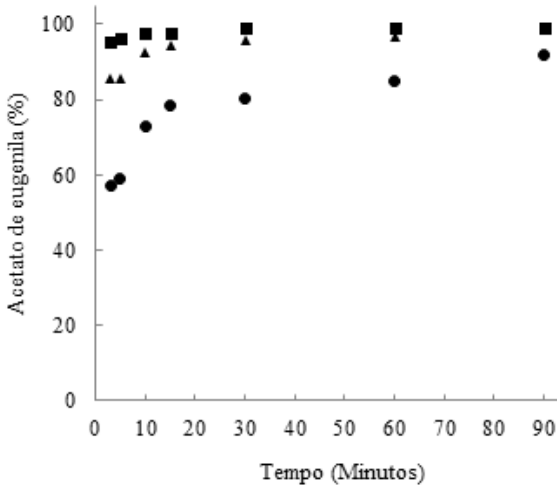


Pela Figura 23 observa-se que o aumento da razão molar dos substratos contribuiu para o aumento da conversão em acetato de eugenila, uma vez que em 3 minutos de reação foi obtido 95,4% do éster, na maior razão molar (1:3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos a partir do uso de planejamentos experimentais, onde a razão molar de substratos de 1:3 foi selecionada como condição otimizada para a síntese de acetato de eugenila.

Efeito do teor de catalisador

O efeito do teor de Amberlite XAD-16 na conversão de acetato de eugenila foi avaliado no intervalo de $0,1$ a $0,3 \text{ g.g}^{-1}$, mantendo fixos a temperatura ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) e a razão molar de substratos (1:3), sem agitação. Conversões mais elevadas foram obtidas empregando $0,2 \text{ g.g}^{-1}$ de catalisador em apenas 3 minutos de reação (Figura 24). A menor conversão na concentração de $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ de catalisador, provavelmente devido à solubilidade do meio, que pode ter dificultado a mobilidade dos substratos, reduzindo as conversões.

Figura 24 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando o teor de catalisador (\bullet 0,1, \blacksquare 0,2, \blacktriangle 0,3 g.g^{-1}), com temperatura de 55 °C e razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético).

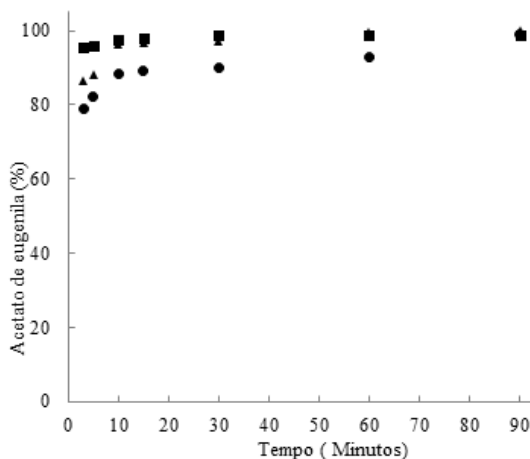


Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na conversão de acetato de eugenila foi avaliado na faixa de 45 a 65 °C, mantendo fixa a a razão molar de substratos (1:3), o teor de catalisador (0,2 g.g^{-1}) sem agitação, conforme apresentado na Figura 25.

O aumento da temperatura de 45 para 55 °C resultou no aumento da conversão em éster. Segundo Laroque (2014), temperaturas elevadas promovem o aumento de colisões entre catalisador e substrato, resultando em uma reação mais rápida. O aumento de temperatura reduz a viscosidade da mistura e melhora o processo de difusão, favorecendo a interação entre catalisador e substratos. Porém, na temperatura de 65°C, observa-se uma redução na conversão, sendo que esta redução pode ser atribuída à interação entre o soluto e a resina ser relativamente fraca, diminuindo, assim, as forças atrativas favorecendo as forças repulsivas.

Figura 25 - Cinética da síntese de acetato de eugenila com Amberlite XAD-16 variando a temperatura (● 45 °C, ■ 55 °C, ▲ 65 °C) e fixando teor de catalisador 0,2 (g.g⁻¹) e razão molar de 1:3 (eugenol:anidrido acético).



5.4 IDENTIFICAÇÃO DO ÉSTER

5.4.1 Determinação da estrutura do éster por análise de RMN ¹H

Para confirmar que a estrutura do composto produzido é o éster acetato de eugenila, foram realizadas análises de RMN ¹H. Para a realização da análise as amostras foram purificadas em evaporador rotativo por 4 horas.

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos espectros, a análise de RMN também foi realizada no padrão químico do éster acetato de eugenila, o qual está apresentado na Figura 26. Nesta figura, os acoplamentos (1) referem-se aos 3 hidrogênios dos carbonos do anel aromático (os hidrogênios (a) são equivalentes, portanto, os seus picos se sobrepõem); (2) e (3) referem-se aos acoplamentos dos hidrogênios dos carbonos da dupla ligação; hidrogênio singlete (4) refere-se a metila ligada ao oxigênio; (5) refere-se aos acoplamentos dos hidrogênios do carbono que une o anel aromático com a dupla ligação; singlete (6) refere-se a metila ligada ao carbono do éster.

As Figuras 27, 28 e 29 representam os espectros de RMN ¹H para as amostras purificadas de acetato de eugenila, catalisadas pela Lipozyme TL IM, peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16, respectivamente. Para todas estas figuras podem ser observados os

mesmos picos característicos do padrão do éster, confirmando a síntese do éster acetato de eugenila na presença dos catalisadores testados.

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H para o padrão de acetato de eugenila.

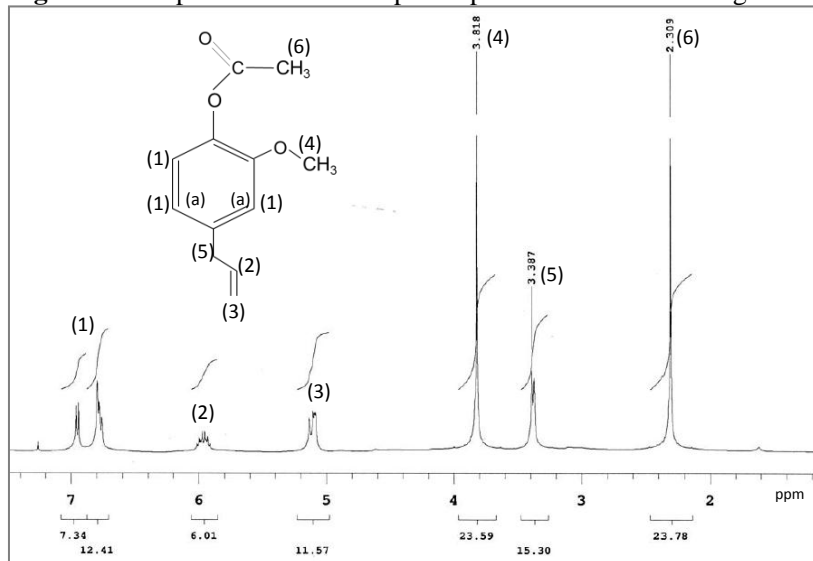


Figura 27 - Espectro de RMN ^1H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por Lipozyme TL IM.

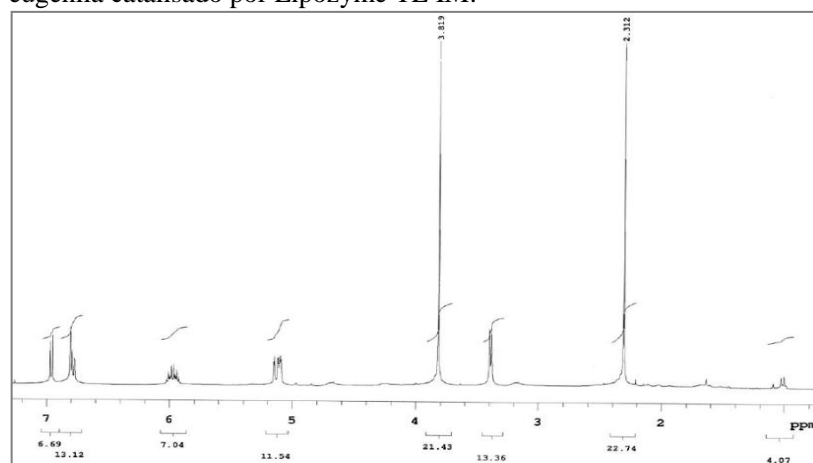


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por peneira molecular de 4 Å.

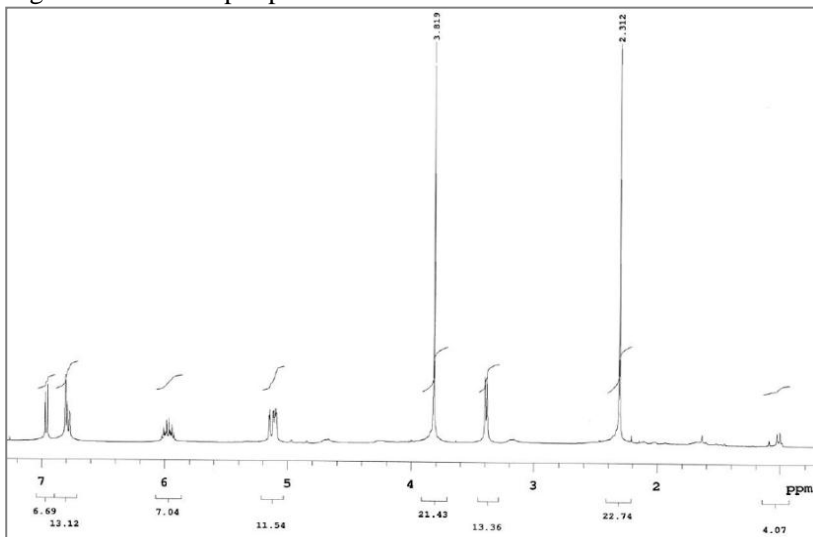
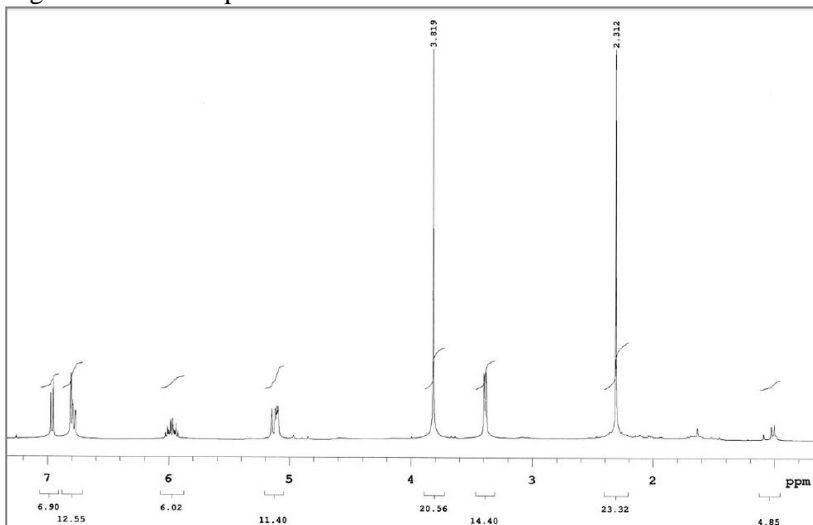


Figura 29 - Espectro de RMN ^1H para a reação purificada de acetato de eugenila catalisado por Amberlite XAD-16.

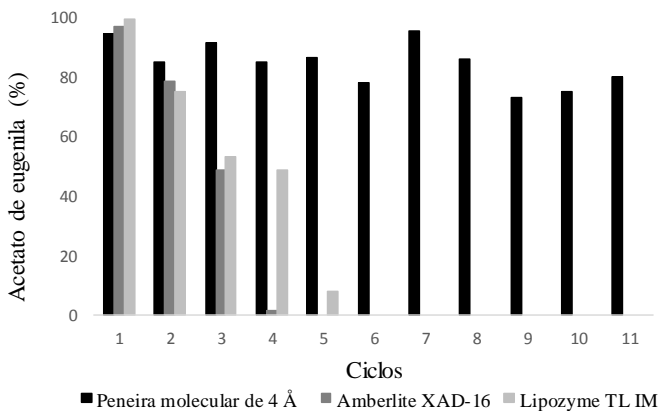


5.5 ESTUDO DE SUCESSIVOS CICLOS DE USO DOS CATALISADORES NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA

Uma das grandes vantagens da utilização de enzimas imobilizadas encontra-se na facilidade de recuperação/separação destas dos meios reacionais, o que muitas vezes torna possível a reutilização destes catalisadores em novas reações (CIPOLATTI et al., 2014). Além disso, apesar das vantagens, o uso de enzimas imobilizadas como biocatalisadores é ainda relativamente oneroso, devido ao custo elevado da enzima, cuja reutilização seria um fator essencial também para viabilizar a produção em nível industrial. Assim como as enzimas, o uso de catalisadores heterogêneos tem sido motivado por diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar a possibilidade de utilização dos mesmos em sucessivos ciclos (reúso). Portanto, estudos de reúso de catalisadores heterogêneos são essenciais, visando à diminuição dos custos e viabilização econômica do processo.

A Figura 30 apresenta as conversões em acetato de eugenila e os respectivos números de ciclos de reutilização da enzima Lipozyme TL IM, peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16, nas respectivas condições otimizadas nas etapas anteriores.

Figura 30 - Efeito do uso sucessivo da Lipozyme TL IM, peneira molecular de 4 Å e Amberlite XAD-16 na produção de acetato de eugenila.



Quando Lipozyme TL IM foi empregada como catalisador é possível observar que no primeiro ciclo a Lipozyme TL IM apresentou uma elevada conversão de 94,32%, no segundo ciclo a conversão caiu para 75,18%, e no terceiro ciclo para 53,17%, e assim diminuiu sucessivamente até o quinto ciclo. Gomes et al. (2006) explica que a elevação da temperatura geralmente corresponde a um aumento na velocidade de reação por unidade de enzima. Entretanto, o tempo prolongada de exposição da enzima em temperaturas elevadas também pode promover o aumento na velocidade de desativação térmica da enzima, minimizando a formação de produtos. Portanto, a exposição da Lipozyme TL IM por períodos seguidos a temperaturas relativamente altas (70°C) pode ter contribuído para a perda de sua atividade catalítica.

Ferraz et al. (2015) também observaram declínio gradativo na conversão de geranyl propionato empregando lipase de *Penicillium crustosum* imobilizada em alginato de sódio. Porém, a conversão manteve-se a mesma durante 3 ciclos de reuso, o que difere do presente estudo, o qual observa-se que a conversão sofreu declínio a partir do segundo reuso. Yadav e Lathi (2004) também observaram um declínio de conversão citronelil laurato após 3 ciclos de reuso, empregando Novozym 435 como catalisador. Ghamgui et al. (2005) avaliaram o reuso de lipase de *Staphylococcus simulans*, imobilizada em carbonato de cálcio e observaram que conversão em acetato de isoamila manteve-se a mesma (74%) durante 4 ciclos. Porém, após 10 ciclos, a conversão foi de 50%.

Em relação aos catalisadores químicos heterogêneos, observa-se que a peneira molecular teve sua força catalítica mantida após 10 ciclos sucessivos de utilização. Porém, para a resina teve sua atividade catalítica reduzida a partir do segundo ciclo. Pelo fato da Amberlite XAD-16 ser uma resina adsorvente, seus sítios ativos podem ter sido impregnados pelos substratos, uma vez que o catalisador apresentou massa maior ao final da reação.

Embora na atual literatura científica a resina Amberlite XAD-16 não seja estudada como catalisador de reações químicas, os resultados obtidos no presente estudo diferem dos encontrados por outros autores empregando diferentes resinas como catalisadores. Pande e Samant (2013) estudaram a reutilização da resina Amberlyst 15 como catalisador na síntese de acetato de 4-bromo fenila e não observaram perda de atividade catalítica após 4 ciclos. Yadav e Thathagar (2002) também não observaram perda de atividade catalítica para a resina Indion 170 após 3 ciclos, na síntese de maleato de dietila. O mesmo foi

observado por Yadav e Yadav (2012) na esterificação de benzoato de eugenila catalisada pela resina.

A possibilidade de reutilização, juntamente com os demais resultados obtidos, mostram que todos os catalisadores são uma alternativa atrativa para a produção do éster acetato de eugenila. Em síntese, a peneira molecular, por exemplo, não apresentou perda da atividade catalítica após 10 ciclos de utilização, já a Amberlite e a Lipozyme TL IM conduziram a uma diminuição drástica na conversão em acetato de eugenila após apenas 3 ciclos.

Apesar de todos os catalisadores empregados neste estudo terem se mostrado eficientes na conversão em acetato de eugenila, empregando óleo essencial de cravo da Índia e anidrido acético, para as etapas subsequentes (atividade antimicrobiana e encapsulamento) foram empregados os ésteres obtidos a partir da síntese enzimática devido ao fato que este catalisador é mais barato quando comparado com a peneira e a resina. O custo da Lipozyme TL IM é de R\$ 372,00 kg, enquanto que a peneira custa R\$ 518,00 e a resina R\$ 1583,00, sendo estas cotações obtidas juntos aos fornecedores em meados de Outubro/2015.

Além disso, tem sido observada uma crescente demanda por produtos naturais, o que tem direcionado muitas investigações para a busca de novas estratégias para a produção de aromas naturais (LONGO; SANROMÁN, 2006). Compostos obtidos através de síntese enzimática ou por ação microbiana podem ser considerados naturais, fato que promove grande aceitação por parte do consumidor, agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente (COSTELLI, 2005).

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A propriedade antimicrobiana de produtos vegetais é amplamente descrita na literatura através de ensaios biológicos *in vitro*, sendo que a metodologia mais empregada para esta finalidade é a difusão em placas porque é de fácil execução e requer pequenas quantidades de amostra (KATZUNG, 2003; SARTORI, 2005). A Tabela 25 apresenta a atividade antimicrobiana do acetato de eugenila (amostra purificada) sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas.

Tabela 25- Atividade antibacteriana do acetato de eugenila, pelo método de difusão em placas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando a concentração de 20 µL de amostra por disco.

Bactérias	ATCC	Halo de inibição (mm)
Gram-positivas		
<i>B. subtilis</i>	6633	16,33 ± 1,15 ^{bcd}
<i>E. faecalis</i>	29212	17,67 ± 4,04 ^{bcd}
<i>M. luteus</i>	10240	15,00 ± 0,01 ^{cd}
<i>S. mutans</i>	25175	14,33 ± 0,57 ^{cd}
<i>S. aureus</i>	25923	21,00 ± 1,73 ^{ab}
<i>S. epidermis</i>	12228	15,67 ± 1,15 ^{bcd}
Média		16,67 ± 2,41
Gram-negativas		
<i>Aeromonas</i> sp.	*	17,33 ± 1,52 ^{bcd}
<i>E. coli</i>	25922	17,00 ± 1,00 ^{bcd}
<i>K.pneumoniae</i>	10031	12,33 ± 0,57 ^d
<i>P. vulgaris</i>	13315	23,67 ± 4,04 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	27853	19,67 ± 1,52 ^{abc}
<i>S. choleraesius</i>	107008	15,33 ± 0,57 ^{bcd}
Média		17,55 ± 3,86

ATCC: American Type Culture Collection – (USA).*: Obtidas a partir do Instituto Biológico – Unicamp (Campinas, SP).

Médias na mesma coluna com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 95 % de probabilidade.

Pela Tabela 25 é possível observar que o acetato de eugenila obtido a partir de síntese enzimática foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias avaliadas, sendo que apresentou o maior halo de inibição para a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*. A média de inibição para as bactérias gram-negativas e gram-positivas não diferiram entre si.

Poucos estudos discorrem a respeito do potencial antimicrobiano do acetato de eugenila. Chiaradia et al. (2012) observaram o efeito inibitório do acetato de eugenila, obtido via síntese enzimática, no desenvolvimento de *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S.aureus*, *S.epidermis*, *Aeromonas* sp. e *E.coli*, sendo que o acetato de eugenila apresentou maior halo de inibição, para todas as bactérias avaliadas, quando comparado com o eugenol e o cloranfenicol, um antibiótico conhecido devido a sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Já no estudo de Vanin (2014) o óleo de cravo da Índia apresentou uma média do halo de inibição superior (15,73 mm) contra 13,1 mm do

acetato de eugenila, para as bactérias Gram-negativas. Porém, o mesmo autores observou que para as bactérias Gram positivas a média do halo de inibição do éster não apresentou diferença significativa, quando o comparados com o efeito exercido pelo óleo essencial de cravo da Índia. De acordo com Silva et al. (2009) estas diferenças entre os resultados podem ocorrer devido à sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado micro-organismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal, mesmo quando a metodologia utilizada seja idêntica.

Hector et al. (2004) que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo *Syzygium aromaticum*, sendo que este inibiu o crescimento de fungos, leveduras e bactérias. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *E. coli* tiveram seu crescimento inibido com 32 µL de óleo, quantidade esta superior a utilizada no presente estudo, que foi de 20 µL. Trajano et al. (2009) ao avaliar diferentes óleos essenciais contra bactérias Gram positivas e Gram negativas observaram que o óleo essencial de cravo foi o que apresentou os maiores halos de inibição, sendo que para a *P. aeruginosa* o halo de inibição foi menor (14 mm) que o encontrado no presente estudo para o acetato de eugenila, que foi de 19,67 mm.

Um outro exemplo que demonstra que o acetato de eugenila pode ser uma alternativa interessante como agente antimicrobiano é o estudo desenvolvido por Gupta et al. (2008) onde os halos de inibição para as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* foram menores que os encontrados no presente estudo, quando os óleos essenciais de pimenta malagueta, limão e mostarda foram empregados como agentes antibacterianos. O mesmo resultado foi observado por Akin, Aktumsek e Nostro (2010) empregando óleos essenciais de *Eucalyptus camaldulensis* e *Myrtus communis*.

Extratos vegetais das mais variadas matérias primas também são reportados na literatura como agentes antimicrobianos. Mau, Chen e Hsieh (2001) avaliaram extratos de cravo contra bactérias e fungos e obtiveram halos de inibição menores que os reportados no presente estudo para a *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Celikel e Kavas (2008) também obtiveram um halo de inibição para a *S. aureus* e a *E. coli* menor que o presente estudo, para os extratos de murta, laranja e louro. Já para o extrato de sálvia os halos de inibição foram iguais para as referidas bactérias.

Considerando a comparação dos halos de inibição do crescimento bacteriano nos ensaios com alguns antibióticos reportados na literatura observadas e com os resultados obtidos da pesquisa, observa-se que para

alguns casos os halos de inibição obtidos para o acetato de eugenila foi semelhante ou superior. Dos antibióticos testados no trabalho de Alvarenga et al. (2007), a cepa de *S. aureus* apresentou resistência à vancomicina, com halo médio de 7,5 mm, valor inferior ao obtido no presente estudo.

Além disso, os halos de inibição observados no presente estão dentro da faixa observada por Oliveira et al. (2006) que realizou um estudo sobre os halos de inibição dos diferentes antibióticos conhecidos: ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina. Os autores observaram que dentre as bactérias testadas a *S. aureus* é a mais sensível aos antibióticos mostrando halos de inibição entre 13 a 25 mm. Já com a bactéria *S. epidermidis* se mostrou resistente a ampicilina e nas interações com cefalotina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina apresentou halos de inibição entre 10 a 25 mm. A bactéria *E. coli* mostrou-se sensível a cefalotina, gentamicina e tetraciclina, com halos de inibição de 17 a 24 mm.

Segundo Klančnik et al. (2010), a metodologia dos discos tem como importância maior fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução. Além disso, Ostrosky et al. (2008) propõe que compostos que apresentarem halo de inibição superiores a 9 mm podem ser considerados potenciais antimicrobianos e devem ser submetidos a testes mais aprofundados. Assim, a partir dos resultados obtidos, o acetato de eugenila mostra-se como uma alternativa viável aos conservantes sintéticos, uma vez que apresenta halo de inibição compatível com a literatura e acima de 9 mm.

5.8 ENCAPSULAMENTO DO ACETATO DE EUGENILA OBTIDO VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA UTILIZANDO TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SEDS)

Para o encapsulamento do éster acetato de eugenila obtido via síntese enzimática foram estudados os seguintes intervalos de condições: pressão de 80 a 100 bar, temperatura de 35 a 40 °C, concentração de acetato de eugenila de 5 a 20 mg.mL⁻¹, mantendo fixa a concentração do PHBV em 20 mg.mL⁻¹, com base nas pesquisas realizadas pelo grupo de trabalho (FRANCESCHI et al. 2008; PRIAMO 2011; BOSCHETTO et al., 2014; MACHADO et al., 2014) para assim obter micro ou nanopartículas do éster, as quais podem ser observadas ilustrativamente na Figura 31.

Figura 31 - Partículas encapsuladas na câmara de precipitação empregando a técnica SEDS.



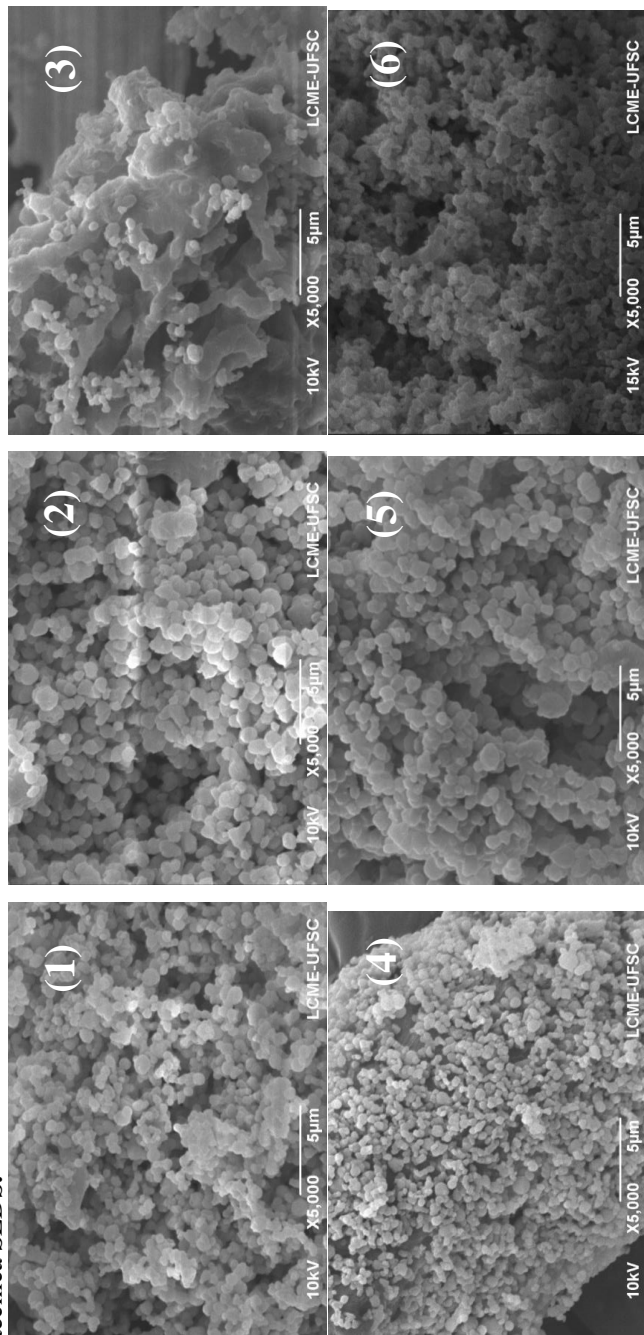
Fonte: O autor (2015)

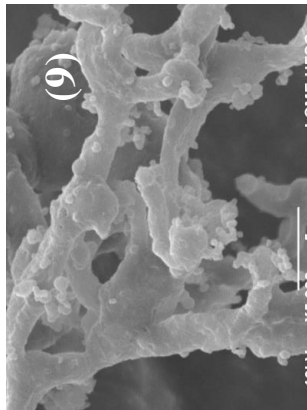
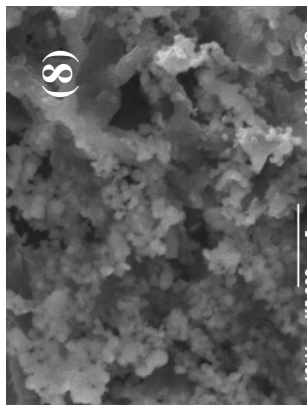
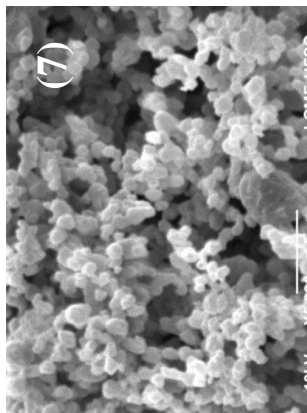
As partículas obtidas no encapsulamento de acetato de eugenila empregando técnica SEDS foram caracterizadas para verificar a morfologia destas. As micrografias são apresentadas na Figura 32.

Pelas imagens da Figura 32 pode-se observar que a morfologia das partículas de acetato de eugenila após o encapsulamento para boa parte dos ensaios foi esférica. Alguns experimentos apresentaram aglomerados e algumas partículas um tanto irregulares, porém evidenciam-se os experimentos (1), (2), (4), (5) e (7), os quais apresentaram partículas majoritariamente esféricas.

É possível observar uma certa semelhança entre a micrografia do polímero micronizado, ou seja, o polímero sem o extrato de acetato de eugenila (9) e a micrografia do ensaio 3. Esta semelhança pode ser devido a uma baixa incorporação do acetato de eugenila no biopolímero nas condições experimentais empregadas no ensaio (100 bar e 35 °C), sendo obtidas partículas praticamente puras de polímero. Este comportamento ainda pode ser evidenciado pela menor eficiência de encapsulamento obtida para este experimento, como pode ser observado na Tabela 26. A referida tabela apresenta as condições experimentais empregadas nos ensaios de encapsulamento bem como o tamanho mínimo e tamanho máximo das partículas, coeficiente de variação e eficiência de encapsulamento.

Figura 32 - Morfologia das partículas obtidas nos ensaios de encapsulamento de acetato de eugenila empregando técnica SEDS.





Ensaíos (1) e (2): 80 bar e 20 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila, nas temperaturas de 35 e 40 °C respectivamente, (3) 100 bar, 35 °C e 20 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila (4) e (5) 80 bar e 10 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila, 35 e 40 °C, respectivamente (6) e (7) 80 bar e 5 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila, nas temperatura de 35 e 40 °C, respectivamente (8) 100 bar, 35 °C e 5 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila e (9) polímero micronizado

Tabela 26 - Condições experimentais, tamanho mínimo (X_{\min}), tamanho máximo (X_{\max}), média (X), coeficiente de variância (CV) e eficiência de encapsulamento (EE) para os ensaios de (1) a (9).

Ensaio	Razão AE:PHBV (mg.mL ⁻¹)	P (bar)	T (°C)	X_{\min} (μm)	X_{\max} (μm)	X (μm)	CV (%)	EE (%)
1	20:20	80	35	0,041	0,228	0,098±0,04	37,8	28,5
2	20:20	80	40	0,021	0,292	0,145±0,05	31,3	25,3
3	20:20	100	35	0,047	0,195	0,105±0,03	29,0	16,3
4	10:20	80	35	0,015	0,173	0,061±0,02	40,3	38,8
5	10:20	80	40	0,068	0,222	0,149±0,02	19,2	38,9
6	5:20	80	35	0,070	0,291	0,170±0,08	47,0	58,0
7	5:20	80	40	0,110	0,598	0,276±0,14	53,1	46,5
8	5:20	100	35	0,070	0,188	0,107±0,02	21,9	38,0

AE: Acetato de eugenila

O tamanho das partículas foi obtido a partir das micrografias da Figura 32, sendo que o tamanho médio das partículas obtidas variou de 0,061 a 0,276 μm (Tabela 26). Segundo De Azeredo (2005) e Matté e Rosa (2013), partículas podem ser classificadas por tamanho em macro (>5000 μm), micro (0,2-5000 μm) ou nanopartículas (<0,2 μm). Assim, é possível afirmar que foi possível obter tanto nano quanto micropartículas de acetato de eugenila encapsulado em PHBV empregando técnica SEDS.

Segundo Rossa (2015), mudanças nas condições de temperatura e pressão provocam alterações na solubilidade do antissolvente supercrítico, possibilitando a obtenção de diferentes morfologias das partículas formadas. Assim, quando observados os tamanhos das partículas em relação à temperatura, pode-se afirmar que quanto maior a temperatura, maior será o tamanho da partícula para todos os ensaios à mesma concentração e pressão, apenas variando a temperatura entre 35 e 40 °C (1 e 2), (4 e 5) e (6 e 7). Estes resultados estão de acordo com o observado por Boschetto et al. (2014) na obtenção de partícula de bixina encapsuladas em PHBV, empregando a mesma técnica utilizada no presente estudo. Miguel, Martín e Cocero (2006), Cardoso et al. (2009) e Rossa (2015) explicam em seus estudos envolvendo a formação de partículas usando fluidos supercríticos como antissolvente, que o tamanho das partículas está relacionado com a supersaturação e nucleação, sendo que quanto mais rápido ocorrerem estes fenômenos, menor será o tamanho das partículas. Desta forma, o empregado de temperaturas mais elevadas não favoreceram estes fenômenos na formação de partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV pela técnica SEDS.

Já em relação à pressão, Chen et al. (2007) defendem que um aumento na pressão melhora a dispersão da solução no dióxido de carbono, diminuindo o tamanho das partículas e aumentando a transferência de massa, fato este que pode ser observado ao comparar-se os ensaios 6 e 8, os quais mantiveram-se constantes a temperatura (35 °C) e concentração (5:20 mg.mL⁻¹), apenas aumentando a pressão de 80 para 100 bar. Este caso, porém não é o mesmo que ocorre para os ensaios 1 e 3, onde constata-se que o aumento da pressão aumentou o tamanho das partículas, o que pode ser explicado por estudos de Cardoso et al. (2009) e Miguel, Martín e Cocero (2006), que relatam que um aumento na pressão de uma mistura acarreta um aumento da solubilidade do soluto na mistura, diminuindo a supersaturação e nucleação, levando a um crescimento das partículas, explicando também o caso do aumento das partículas em relação à concentração para estes mesmos ensaios, levando em conta supersaturação e aumento da pressão.

Em relação à distribuição do tamanho das partículas, pode-se perceber que o ensaio que obteve a distribuição mais estreita foi o de número 5 com 19,15%, e condições experimentais de 40 °C e 80 bar nas concentrações de 20 mg.mL⁻¹ de PHBV e 10 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila e o maior valor foi de 53,12% para o ensaio 7. A maioria dos valores de coeficiente de variação estão abaixo dos encontrados por Franceschi et al.(2008) para encapsulamento de β-caroteno, através da mesma técnica.

Em relação à eficiência de encapsulamento, vale ressaltar que as concentrações de PHBV para todos os ensaios foram mantidas constantes e iguais a 20 mg.mL⁻¹, sendo apenas as concentrações de acetato de eugenila variadas. Na Tabela 27 observa-se que a maior eficiência foi de 58% para o ensaio 6 (80 bar e 35 °C), sendo este ensaio feito com a menor concentração de acetato de eugenila (5 mg.mL⁻¹). É possível verificar também a influência da concentração do acetato se comparados os ensaios (1), (4) e (6) onde foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e pressão (35 °C e 80 bar). Quando utilizadas concentrações menores de acetato de eugenila (ensaio 6), constata-se uma maior eficiência de encapsulamento, o que se assemelha aos resultados obtidos por Boschetto et al. (2014) no encapsulamento da bixina.

Outro fator que é possível verificar é o aumento da eficiência de encapsulamento em menores condições de pressão e temperatura (35 °C e 80 bar), comportamento este também semelhante aos encontrados por Boschetto (2013) que utilizou a mesma técnica para o encapsulamento

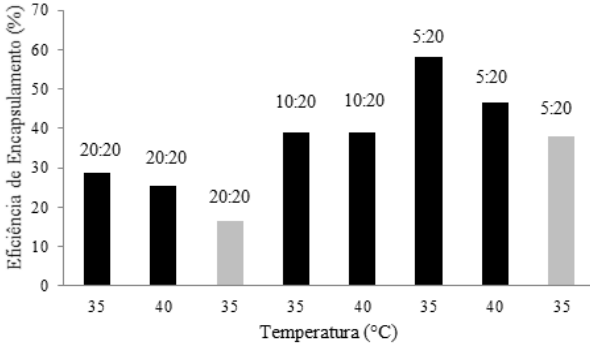
de extrato de uva, astaxantina e bixina. Além disso, os valores e eficiência de encapsulamento encontrados no presente estudo estão de acordo com os valores reportados na literatura, também empregando fluidos supercríticos como antissolvente. Priamo et al. (2010) obteve uma eficiência máxima de 55,54% no encapsulamento de β caronoteno me PHBV. Kalogiannis et al. (2006) obteve uma eficiência de 42,9% no encapsulamento de amoxicilina em poli (L-ácido láctico).

Segundo Cosijns et al.(2009) com o aumento da temperatura ocorre uma maior interação entre o solvente e o extrato, aumentando a solubilidade do extrato, neste caso acetato de eugenila, sendo este arrastado com o solvente, conseqüentemente, diminuindo a eficiência de encapsulamento. Este caso pode ser observado nos ensaios 1 e 2, 4 e 5 e 6 e 7, onde pressão e concentração foram mantidas constantes para as duplas de experimentos, avaliando-se apenas a influência da temperatura.

Já em relação à pressão verifica-se uma eficiência de encapsulamento menor para uma pressão mais alta, o que segundo Varona et al. (2010) pode ocorrer, pois em pressões acima do ponto crítico, a solubilidade do solvente aumenta, ficando miscível no dióxido de carbono, o que levou a resultados com mesmo comportamento para encapsulamento de óleo essencial de lavanda pela técnica PGSS obtidas por estes autores. Este fato pode ser observado nos ensaios 3 e 8, onde variou-se apenas a pressão em relação aos ensaios 1 e 6, respectivamente.

O efeito da pressão e temperatura no encapsulamento de acetato de eugenila pode ser melhor visualizado através da Figura 33 que mostra a relação entre a temperatura e a eficiência de encapsulamento, sendo os ensaios 3 e 8 diferenciados pela cor no gráfico para indicar a diferente pressão de 100 bar utilizada nos experimentos em relação aos demais, os quais utilizaram 80 bar, constatando-se que em menores pressões para as mesmas condições de temperatura e concentrações, obtém-se menores eficiências, comprovando o mencionado anteriormente.

Figura 33 - Efeito da temperatura e pressão no encapsulamento de acetato de eugenila empregando técnica SEDS para os experimentos ordenados de 1 a 8.



Os valores apresentados acima das barras são referentes à razão de acetato de eugenila e PHBV empregada em casa ensaio.

O fato da utilização de temperaturas e pressões menores pode ser observado de maneira bastante interessante para a indústria, pois a utilização de condições de trabalho brandas é de grande interesse e possibilita economia em relação aos custos de equipamentos, além de maior possibilidade de processar produtos termossensíveis, que proporcionariam um produto de melhor qualidade (BOSCHETTO, 2013).

Os resultados do encapsulamento mostraram que é possível obter nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnica SEDS. A utilização desta tecnologia na obtenção de nanopartículas pode atender a demanda da nanotecnologia, que busca cada vez mais tecnologias de baixo impacto ambiental. Além disso, estes resultados podem ser usados como ponto de partida em estudos adicionais que busquem condições operacionais que proporcionem uma maior eficiência de encapsulamento bem como a obtenção de partículas esféricas com menor coeficiente de variação.

5.8.1 Comportamento de liberação *in vitro* de acetato de eugenila encapsulados em PHBV

Indústrias de alimentos buscam tecnologias para proteger sabores e aromas no armazenamento e estocagem, além de possuir uma liberação rápida durante o consumo do produto final, por isso a

importância de testes de liberação, para se conhecer as formas como ocorrem, e o tempo em que o princípio ativo é liberado (AZEREDO, 2005). Como o acetato de eugenila apresenta atividade antimicrobiana, os resultados obtidos nos ensaios de liberação *in vitro* são fundamentais para estudos futuros que viabilizem a utilização deste composto encapsulado como bioconservante natural em alimentos e bebidas.

As partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV foram submetidas a ensaios de liberação *in vitro* empregando dois diferentes meios de dissolução, sendo estes, acetato de etila e isopropanol, em temperatura de 28 °C e agitação de 80 rpm, sendo que os meios de dissolução e condições empregadas forma mantidas as mesmas já empregadas em outros trabalhos pertencentes ao grupo de pesquisa de um dos orientadores da presente tese (PRIAMO, 2011). Nesta etapa foram empregadas as partículas obtidas nos ensaios que apresentaram uma maior eficiência de encapsulamento (5, 6, 7 e 8), sendo que a Figura 34 apresenta as porcentagens de liberação para estes ensaios, em acetato de etila.

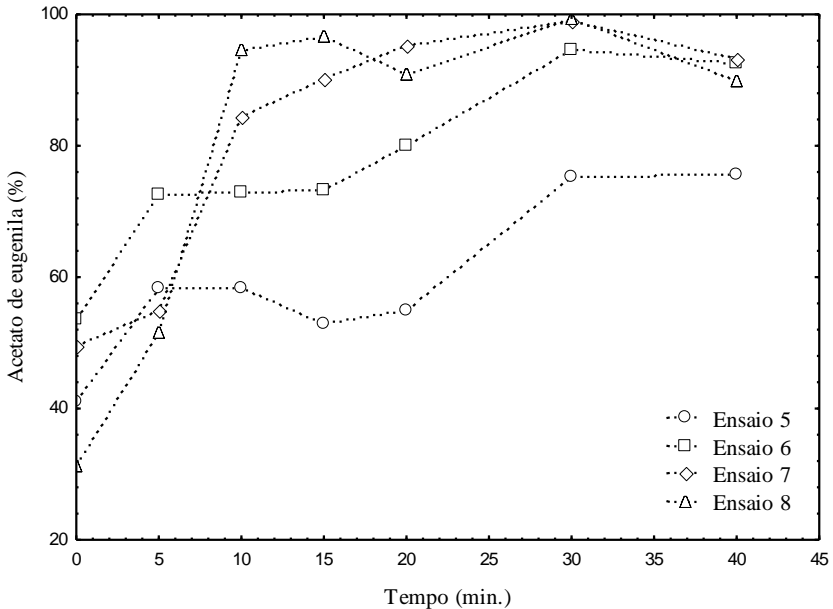
Para os ensaios de liberação *in vitro* das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila (Figura 34), é possível observar que todos os ensaios apresentaram um percentual de liberação diferentes, sendo que para os ensaios 5 e 6 a máxima liberação ocorreu em 5 minutos, com uma liberação de 58 e 70% do acetato de eugenila no meio de dissolução, respectivamente. Já nos ensaios 7 e 8 a máxima liberação de 92 e 85% ocorreu aos 10 minutos de ensaio. Isto pode ser devido a solubilização do princípio ativo (acetato de eugenila) no meio de dissolução.

Segundo Wang et al. (2009), a solubilidade dos princípios ativos no meio de dissolução é um indicativo de sua afinidade com o polímero usado no encapsulamento, ou seja, quanto maior a afinidade entre o princípio ativo e o polímero, mais forte é a tendência para que o composto se incorpore no polímero aumentando a sua eficiência de encapsulamento e melhorando tempo de liberação. Isso ocorre porque princípios ativos com alta solubilidade nos meios de dissolução tendem a localizarem-se próximos à superfície do polímero fazendo com que rapidamente sejam liberados.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos observados por Priamo (2011), que avaliou a liberação *in vitro* de β -caroteno encapsulado em PHBV para mesmo solvente, obteve liberação máxima em 10 minutos, demonstrando maior afinidade da amostra de β -caroteno encapsulado em PHBV no meio de dissolução em relação ao acetato de eugenila. Já para Boschetto et al. (2014) o tempo de liberação

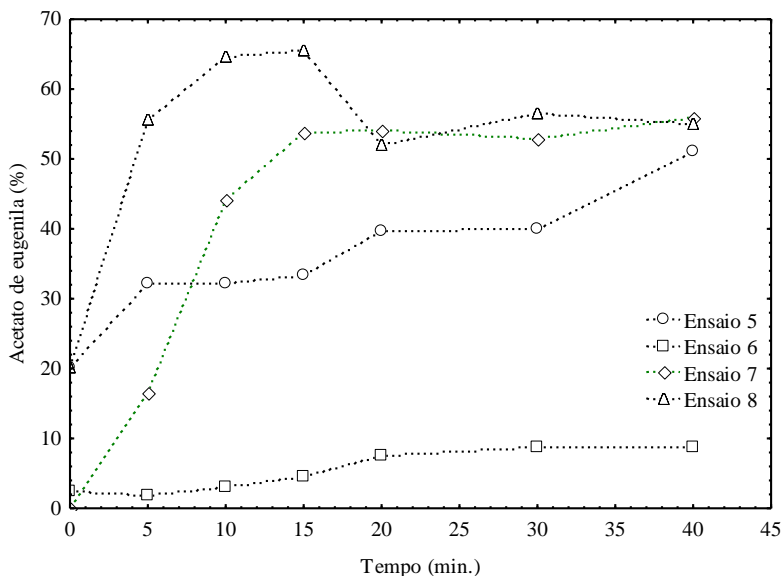
máxima para a bixina encapsulado em PHBV foi de 120 minutos, quanto acetato de etila foi usado como meio de dissolução.

Figura 34 - Comportamentos de dissolução in vitro das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 28 °C e 80 rpm.



Na Figura 35 são apresentadas as porcentagens de liberação de acetato de eugenila em isopropanol ao longo de 40 minutos. Nos ensaios de liberação constata-se que as liberações iniciais são menores quando comparadas à liberação em acetato de etila, indicando que provavelmente o acetato de eugenila apresenta uma menor solubilidade neste solvente. O pico de liberação foi menor que os obtidos pelo acetato de etila e ocorreu em tempos diferentes sendo para as amostras 5, 6 e 7 em 40 minutos e em 15 minutos para a amostra 8.

Figura 35 - Comportamentos de dissolução in vitro das partículas de acetato de eugenila encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em isopropanol na temperatura de 28 °C e 80 rpm.

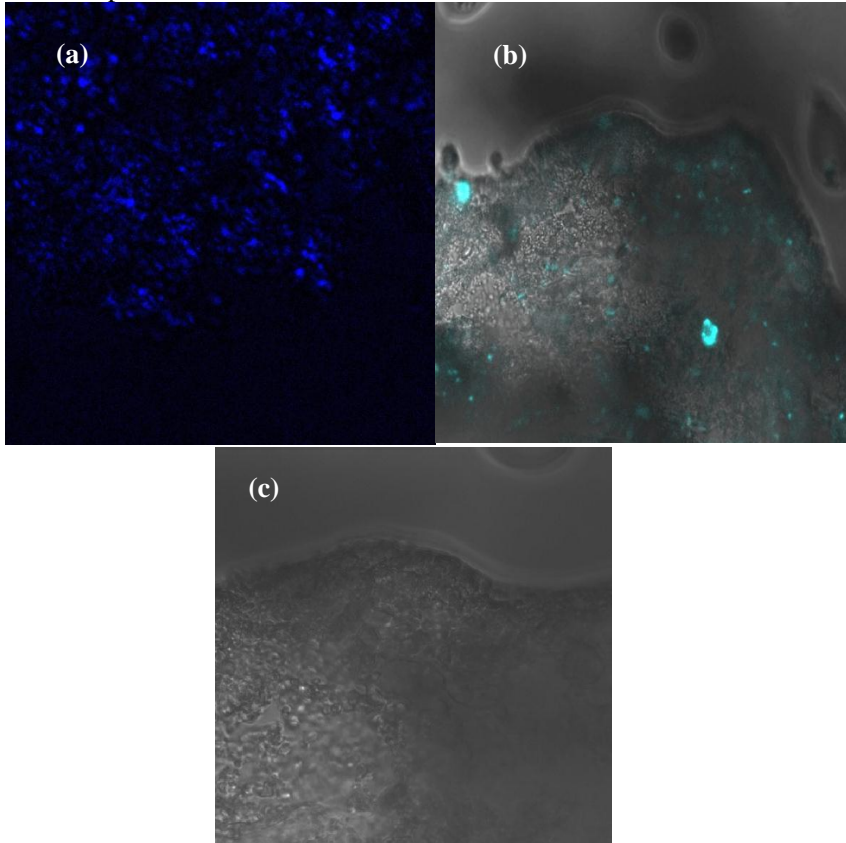


Com base nos resultados obtidos nos ensaios de liberação, o acetato de etila mostrou-se como um meio de dissolução mais apropriado para a liberação de acetato de eugenila, nas condições estudadas, sendo que estes resultados podem servir como base para o estudo de liberação em diferentes solventes como meio de dissolução.

5.8.2 Microscopia Confocal de Fluorescência

Esta técnica foi utilizada para detectar a presença e a forma como o acetato de eugenila encontra-se encapsulado. A observação das imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência (Figura 36) mostra o encapsulamento do acetato de eugenila. As imagens foram obtidas em campo claro e também em campo escuro, apenas mostrando a fluorescência do próprio composto (Figura 36 a e b), uma vez que o PHBV não possui fluorescência (Figura 36 c). Para a obtenção das imagens utilizaram-se filtros na coloração azul, sendo que as análises deviam ser feitas rapidamente, pois o acetato de eugenila excitava luz rapidamente e logo cessava.

Figura 36 - Imagens do acetato de eugenila encapsulado em PHBV (a) em campo escuro (b) campo claro e (c) PHBV puro obtidas por microscópio confocal de fluorescência



Esta técnica também foi empregada por Carvalho (2009), que observou pela microscopia confocal a presença de óleo de orégano encapsulado pela técnica de spray dryer, porém constatando que o óleo não se encontrava no interior das cápsulas, mas sim ligado à matriz devido à afinidade do óleo pelo agente encapsulante (gelatina).

Outro aspecto de extrema importância nesta análise foi a comprovação de que o acetato de eugenila possui fluorescência, algo não encontrado na literatura. Segundo Rangel e Merçon (2012), há dificuldade em se prever a fotoluminescência por parte de uma molécula, mas é possível através de determinadas características gerais

da estrutura, verificar o favorecimento de desativação radioativa eficiente. A maioria dos compostos que fluorescem são aromáticos, sendo que alguns alifáticos, alicíclicos carbonilados ou estruturas com ligações duplas altamente conjugadas podem mostrar fluorescência. Isso pode ser explicado pelo fato de que compostos aromáticos têm níveis de transição ($\pi \rightarrow \pi$) de baixa energia.

Capítulo 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES

Como parte do que se propôs, investigou-se as condições ótimas de produção do éster acetato de eugenila empregando diferentes catalisadores enzimáticos e químicos heterogêneos. Nesta etapa também foi avaliada a possibilidade de utilização de energia ultrassônica como ferramenta para aumentar a transferência de massa da reação. Após a conclusão desta etapa foi selecionado o catalisador que apresentou condições mais favoráveis em relação ao binômio conversão e impacto ambiental e este foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana. Para finalizar o estudo da tese foram realizados ensaios para avaliar a possibilidade de encapsulamento do éster pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) empregando CO₂ como fluido supercrítico e PHBV como agente encapsulante.

Assim, este trabalho atendeu o objetivo geral proposto uma vez que foi possível sintetizar o éster acetato de eugenila, obtendo elevadas conversões tanto para o catalisador enzimático quanto pelos catalisadores químicos heterogêneos, ambos em sistema livre de solvente. Além disso, foi possível obter micro e/ou nanopartículas de acetato de eugenila em PHBV empregando técnica SEDS.

Nos objetivos específicos, a partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A aplicação de energia ultrassônica não contribuiu para o aumento da conversão da reação, de esterificação porém a mesma contribuiu para o aumento da velocidade inicial da reação.
- Na seleção de catalisador enzimático, a Lipozyme TL IM foi selecionada como o biocatalisador mais adequado na síntese de acetato de eugenila via síntese enzimática. Em relação aos catalisadores heterogêneos tanto a peneira molecular 4 Å quanto a resina Amberlite XAD-16 apresentaram elevadas conversões na conversão em acetato de eugenila.
- As condições otimizadas para a produção de acetato de eugenila catalisada por Lipozyme TL IM foram: razão molar de substratos 1:5, concentração de enzima de 5%, temperatura de 70 °C, velocidade de agitação de 150 rpm e tempo reacional de

2 h. Para ambos os catalisadores heterogêneos as condições otimizadas foram as mesmas: razão molar de substratos de 1:5, teor de catalisador de $0,125 \text{ g.g}^{-1}$, temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, sem agitação. Porém, o tempo reacional da peneira molecular 4 Å foi de 2 h enquanto que para a Amberlite XAD-16 foi de apenas 30 minutos.

- Os estudos cinéticos confirmaram os resultados obtidos na otimização das condições reacionais através do uso de planejamentos experimentais, para todos os catalisadores avaliados.
- O acetato de eugenila obtido via síntese enzimática mostrou-se satisfatório como agente antimicrobiano contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas neste trabalho.
- Foi possível obter micro e nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnica SEDS, obtendo partículas esféricas na maioria dos ensaios. O tamanho das partículas variou de $0,061$ a $0,276 \text{ }\mu\text{m}$.
- Nos ensaios de liberação do acetato de eugenila encapsulado percebeu-se maior afinidade do éster pelo acetato de etila do que em isopropanol.
- Na microscopia confocal de fluorescência constatou-se que o acetato de eugenila é um éster que possui fluorescência, além de comprovar o encapsulamento.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Produção de acetato de eugenila (AE) via síntese enzimática e catálise química heterogênea

- Avaliar a produção de acetato de eugenila em reator contínuo;
- Investigar novos métodos de recuperação do catalisador enzimático, no intuito de aumentar o número de ciclos de reuso;
- Investigar métodos de regeneração dos catalisadores químicos heterogêneos.

Avaliação da atividade antimicrobiana do éster

- Determinar a concentração mínima inibitória dos organismos avaliados.

Encapsulamento do éster empregando técnica SEDS

- Investigar condições operacionais que levem a maiores eficiências de encapsulamento bem como a formação de nanopartículas esféricas e com menor coeficiente de variação;
- Investigar a liberação in vitro em outros solventes.

CAPÍTULO 7 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS

A seguir são descritas as publicações relacionadas ao desenvolvimento desta tese, incluindo artigos completos publicados em periódicos, bem como resumos publicados em congressos envolvendo parte do assunto da tese.

Colaboração na orientação de Trabalhos de Conclusão de Curso

Karolina Mandella. Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM como catalisadores da síntese enzimática para a obtenção de acetato de eugenol em sistema de ultrassom. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Gabriela Nayana Pereira. Encapsulamento de acetato de eugenila utilizando técnica SEDS. 2015. Trabalho de Conclusão (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

Artigos completos publicados em periódicos

LERIN, LINDOMAR A. ; LOSS, RAQUEL A. ; REMONATTO, DANIELA ; ZENEVICZ, MARA CRISTINA ; BALEN, MANUELA ; NETTO, VENDELINO OENNING ; NINOW, JORGE L. ; TRENTIN, CLÁUDIA M. ; OLIVEIRA, J. VLADIMIR ; DE OLIVEIRA, DÉBORA. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering (Internet)**, v. 37, p. 2381-2394, 2014.

SILVA, M. J. A. ; LOSS, RAQUEL A. ; LAROQUE, D. A. ; LERIN, L. A. ; PEREIRA, G.N. ; THON, E. ; OLIVEIRA, J. V. ; NINOW, J.L. ; HENSE, H. ; DE OLIVEIRA, DÉBORA . Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent free acetylation. **Applied Biochemistry and Biotechnology (Online)**. v. 176 p. 782-795, 2015.

Artigos submetidos para periódicos

LAROQUE, D. A; LOSS, RAQUEL A. ; SILVA, M. J. A. ; LERIN, L. A. ; PEREIRA, G.N. ; OLIVEIRA, J. V. ; NINOW, J.L. ; HENSE, H. ; DE OLIVEIRA, DÉBORA Molecular sieve 4Å and Amberlite XAD-16 as catalysts for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation: process optimization and kinetic evaluation. Journal of Molecular Catalysis A:Chemical.

GABRIELA NAYANA PEREIRA, RAQUEL A. LOSS^A, DAIANE L. BOSCHETTO, GEAN PABLO AGUIAR, JULIANA R. MACHADO, LORENZO MATEO P. C. CHAVES, MARIA JOSÉ A. SILVA, HAIKO HENSE, J. VLADIMIR OLIVEIRA, DÉBORA OLIVEIRA Encapsulation of eugenil acetate in PHBV using seds technique and in vitro release evaluation. Industrial Crops and Products.

Resumos completos e expandidos publicados em congressos

LERIN, L. A. ; LOSS, R. A. ; CHIARADIA, V. ; PAROUL, N. ; HENSE, H. ; OLIVEIRA, J. V. ; OLIVEIRA, D. . Estudo das variáveis que interferem na síntese enzimática de acetato de eugenol, usando banho de ultrassom. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012, Blumenau. X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012.

LOSS, R. A. ; SILVA, M. J. A. ; LAROQUE, D. A. ; LERIN, L. A. ; NINOW, J. L. ; HENSE, H. ; OLIVEIRA, J. V. ; OLIVEIRA, D. . avaliação da atividade antioxidante de ésteres obtidos a partir de modificação enzimática do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*). In: Novos Horizontes para a Ciência e Tecnologia de Óleos e Gorduras, 2013, Florianópolis. Novos Horizontes para a Ciência e Tecnologia de Óleos e Gorduras, 2013.

LOSS, R. A. ; ARBULÚ, S. M. J. ; LAROQUE, D. A. ; LERIN, L. A. ; NINOW, J. L. ; HENSE, H. ; OLIVEIRA, J. V. ; OLIVEIRA, D. . Avaliação da Atividade Antioxidante de Ésteres Obtidos a partir de Modificação Enzimática do Óleo Essencial de Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*). In: SBOG, 2013, Florianópolis.

DENISE. A. LAROQUE , RAQUEL A. LOSS, JOSÉ V. OLIVEIRA E DÉBORA DE OLIVEIRA, HAIKO HENSE. Seleção de catalisadores e sistema reacional para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014, Florianópolis.

RAQUEL A. LOSS, DENISE. A. LAROQUE, JOSÉ V. OLIVEIRA E DÉBORA DE OLIVEIRA, HAIKO HENSE. Determinação da energia de ativação na produção de acetato de eugenila via catálise heterogênea. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014, Florianópolis.

MARIA J. A. SILVA, DENISE. A. LAROQUE, RAQUEL A. LOSS, LINDOMAR A. LERIN, GABRIELA N. PEREIRA, JORGE L. NINOW, HAIKO HENSE, JOSÉ V. OLIVEIRA E DÉBORA DE OLIVEIRA. Efeito da concentração de enzima e razão molar de substratos na acetilação enzimática de óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophylluCos*). In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014, Florianópolis.

MARÍA J. A. SILVA, RAQUEL A. LOSS, MANUELA BALEN, LINDOMAR A. LERIN, GABRIELA N. PEREIRA, JORGE L. NINOW, HAIKO HENSE, JOSÉ V. OLIVEIRA E DÉBORA DE OLIVEIRA. Seleção de biocatalisadores para a síntese enzimática de acetato de eugenila em sistema livre de solvente orgânico. In: XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2014, Rio de Janeiro.

JULIANA MACHADO, RAQUEL APARECIDA LOSS, DAIANA LÚCIA BOSCHETTO, GEAN P. AGUIAR, HAIKO HENSE, JOSÉ VLADIMIR DE OLIVEIRA, HAIKO HENSE. Emprego de fluído supercrítico no encapsulamento de acetato de eugenila obtido por síntese enzimática. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de hidrólise Enzimática de Biomassa , 2015, Fortaleza.

Capítulo 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI,R.; REVERCHON, E.; JÄRVENPÄÄ, E. Supercritical antisolvent micronization of nalmefene HCl on laboratory and pilot scale. **Powder Technology**, v. 179, p.163-170, 2007.

AKIN, M.; AKTUMSEK, A.; A. NOSTRO, A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 531-535, 2010.

ALIMUDDIN, A.H.; MARDJAN, M.I.D.; MATSJEH, S.; ANWAR, C.; MUSTOFA; SHOLIKHAH, E.N. Synthesis 7-hydroxy-3',4'-dimetoxisoflavon from eugenol. **Indonesian Journal of Chemistry**, v.11, p.163-168, 2011.

ALTIOKKA,M.R.; CITAK, A. Kinetics study of esterification of acetic acid with isobutanol in the presence of amberlite catalyst. **Applied Catalysis a: General**, v.239, p.141–148, 2003.

ALVARENGA, A. L; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.86-91, 2007.

AKYALÇIN, S.; ALTIOKKA, M.R. Kinetics of esterification of acetic acid with 1-octanol in the presence of Amberlyst 36. **Applied Catalysis, A: General**, v. 429-430, p. 70-84, 2012.

AWASTHI,P.K.,DIXIT,S.C.;DIXIT,N.;SINHA,A.K.Eugenol derivative as future potential drugs.**Journal of Pharmacology Research**,v.1, p. 215-220. 2008.

AYRES-BARROS, M.R. **Biocatálise em solventes orgânicos**. Boletim de Biotecnologia, Lisboa, n.72, p. 2-13, 2002.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

- BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S. Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 263-283, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-475, 2008.
- BALLINI, R.; BOSIEN, G.; CARLONI, S.; CIARALLI, L.; MAGGI, R.; SARTORI, G. **Tetrahedron Letter**, v.39, p.6049-6052, 1998.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297-1303, 2014.
- BARBOSA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom: Influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v.15, p.302-316,1992.
- BARBOSA, J. D.; SILVA, V.B.; ALVES, P.B.; GUMINA, G.; SANTOS, R.L.C.; SOUZA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1478-1483, 2012.
- BASRI, M.; KASSIMA, M.A.; MOHAMADC, R.; ARIFF, A.B. Optimization and kinetic study on the synthesis of palm oil ester using Lipozyme TL IM. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 214-219, 2013.
- BATISTELLA, L.; LERIN, L.A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A.J.; TRENTIN, C.M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 452-458, 2012a.
- BATISTELLA, L.; USTRA, M.K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S.B.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 351-358, 2012b.

BECK, J. S. Method for Synthesizing Mesoporous Crystalline Material, **US Pat. 5057296**, 1991.

BERTOLINI, M.C.; SCHRAG, J.D.; CYGLER, M.; ZIOMEK, E.; THOMAS, D.Y.; VERNET, T., Expression and Characterization of *Geotrichum Candidum* Lipase I GENE: Comparison of Specificity Profile with Lipase II. **European Journal of Biochemistry**. v.228, p.863-869, 1995.

BIASSI, A. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Ed Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.546-552, 1992.

BOSCHETO, D.L. Encapsulamento de extrato de semente de uva, astaxantina e bixina utilizando a técnica SEDS. Doutorado em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC, 2013.

BOSCHETTO, D. L.; ARANHA, E.M.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U.; FERREIRA, S.R.S.; PRIAMO, W.L.; OLIVEIRA, J.V.; Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 22-29, 2014.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, v.42, p.1107-1109, 1977.

BURKERT J. F. M., MAUGERI F., RODRIGUES M. I.; **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design**. *Bioresource Technology*, v. 91, 77-84, 2004.

BU, X.; FENG, P.; YANG, P. **The chemistry of crystalline microporous and open framework materials**. USA: World Scientific, 2003.

- BURT, S. A. Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BRAGA, A.A.C.; MORGON, N.H. Descrições estruturais cristalinas de zeólitos. **Química Nova**, v.30, p. 178-188, 2007.
- BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1984.
- BROWN, S.H. In: **Handbook of Green Chemistry**, vol. 2: Heterogeneous Catalysis, 2009.
- BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) *Kosterm.* (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421, 2003.
- CARDOSO, M.A.T.; ANTUNES, S.; VAN KEULEN, F.; FERREIRA, B.S.; GERALDES, A.; CABRAL, J.M.S.; PALAVRA, A.M.S. Supercritical antisolvent micronisation of synthetic all-trans- β -carotene with tetrahydrofuran as solvent and carbon dioxide as antisolvent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 815-822, 2009.
- CARLSON, L.H.C.; BOLZAN, A. Size Meter, Versão 1.1. Laboratório de Controle de Processos (LCP). Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- CARRASCO, H.A.; ESPINOZA, L.C.; CARDILE, V.; GALLARDO, C.; CARDONA, W.; LOMBARDO, L.; CATALÁN K.M.; CUELLAR, M.F.; RUSSOD, A. Eugenol and its Synthetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 543-548, 2008.
- CARVALHO, J.S.R. **Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose**. Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. A. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.197-205, 1997.

CASTRO H. F., MENDES A. A., SANTOS J. C.; **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, v. 27, 146-156, 2004.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, A.; MARIN-INIESTA, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2757-2763, 2007.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'A.; SILVA, P. R. DA; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, Article ID 618692, 8 doi:10.4061/2011/618692. Volume 2011.

CELIKEL, N.; KAVAS. G. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. **Czech Journal of Food Sciences** v. 26, p. 174-181, 2008.

CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M.; ANUAR, S.H.M.; RAHMAN, M.B.A.; REZAYEE, M. Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 226-231, 2012.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; KSOURI, R.; HAJLAOUI, H.; MAHDOUANI, K.; ABDELLY, C.; BAKHROUF, A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403-406, 2007.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing, **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.975-983, 2012.

CHARU, M.M.; SATIJA, G.; AVINASH, J.; NAGPAL, R.; KAPOOR, R.; AHMAD, A. In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice.

International Journal of Dentistry, v. 2012, 2012.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K. (1998). Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system.

Biotechnology Letters, v.20, p. 865-868, 1998.

CHAVAN, S.P.; ANAND, R.; PASUPATHY, K.; RAO, B.S. **Green Chemistry**, v.31, p. 320, 2001.

CHEN, A.Z.; PU, X.M.; KANG, Y.Q.; LIAO, L.; YAO, Y.D.; YIN, G.F. study of poly(L-lactide) Microparticles based on supercritical CO₂.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 18, p. 2339-2345, 2007.

CHEN, H-C.; KUO, C-H.; TWU, Y-K.; CHEN, J-H.; CHANG, C-M.J.; LIU, Y-C.; SHIEH, C-J. A continuous ultrasound-assisted packed-bed bioreactor for the lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.86, p. 1289-1294, 2011.

CHIARADIA, V.; DETOFOL, M.R; CANSIAN, R.L.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA,D.; PAROUL, N. Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livre de solvente. **Perspectiva**, v. 35, p.35-42, 2011.

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L.; JÚNIOR, C.V.; DETOFOL, M.R.; LERIN, L.A.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, D. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1-10, 2012.

CHOI, M. J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S-G.; TUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 148-156, 2009.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J.S.; COMBES,D. Geranyl Acetate Synthesis by Lipase-Catalyzed Transesterification in

Supercritical Carbon Dioxide. **Enzyme Microbial Technology**, v.15, p. 691-698, 1993.

CINTAS, P.; LUCHE, J. The sonochemical approach. **Green Chemistry**. v.1, p. 115-125, 1999.

CIPOLATTI, E.P.; SILVA, M.J.A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M.M.C.; OLIVEIRA, J.V.; JORGE L. NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56- 67, 2014.

CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Effect of reaction parameters on SP 435 lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.835-838, 1994.

COCERO, M. J.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Review: Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal Food Science**, v. 49, p. 429-434, 1984.

CORMA, A. State of the art and future challenges of zeolites as catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 216, p. 298-312, 2003.

CORNILS, B.; HERRMANN, A.W.; MUHLER, M.; WONG, C.H. **Catalysis from A To Z: A concise encyclopedia**, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 127, p. 34-42, 2014.

COSIJNS, A.; NIZET, D.; NIKOLAKAKIS, I.; VERVAET, C.; DE BEER, T.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; EVRARD, B.; REMON, J.P. Porous pellets as drug delivery system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 655-662, 2009.

- COSTELLI, M.C. **Cultivo de *Bacillus polymyxa* para produção de acetoina: Influência do pH e do tempo de cultivo do inóculo.** Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC, 2005.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p. 623-630, 2004.
- DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. **Drug Development Research**, v.64, p. 114-128, 2005.
- DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 2745-2749, 2006.
- DIRKSEN, J.A.; RING, T.A. Fundamentals of crystallization: kinetic effects on particle size distributions and morphology. **Chemical Engineering Science**, v. 10, p. 2389-2427, 1991.
- DORMAN, H.J.D.; DEAN, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, 308-316, 2000.
- DÖRMO, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U. GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fuel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, p. 229-234, 2004.
- ESCANDELL, J.; WURM, D.J.; BELLEVILLE, M.P.; SANCHEZ, J.; HARASEK, M.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D. Enzymatic synthesis of butyl acetate in a packed bed reactor under liquid and supercritical conditions. **Catalysis Today**, v. 255, p. 3-9, 2015.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. **EFSA Journal**, v.9, 2011.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J.J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E., Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219 -226, 2004.

FAVARO TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food of Technology**, v.11, p. 103-112, 2008.

FERRAZ, L.I.R.; POSSEBOM, G.; ALVEZ, E.V.; CANSIAN, R.L.; PAROUL, N.; DÉBORA DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p.44-48, 2014.

FERREIRA, F.A. **Estudos da modificação da resina não iônica Amberlite XAd- com monoetanolamina (MEA) para retenção de espécies de S (IV)**. Mestrado em Química Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo SP, 2007.

FIAMETTI, K.G.; USTRA, M.K.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M.L.; FURIGO, A. JR.; OLIVEIRA, J.V. Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.19, p. 440-451, 2012.

FIorentini, A. M. et al. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008.

FREITAS, L., **Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicérides empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. Mestrado em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – Lorena SP, 2006.

FREITAS, L.; PAULA, A.A.; SANTOS, J.C.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, v. 54, p. 87-90, 2010.

GIANETTO, G.P. **Zeolitas: Características, Propriedades y Aplicaciones Industriales**. 2ª ed., Ediciones Innovación Tecnológica, Caracas, 2000.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHÂABOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 788-794, 2006.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influências no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p.374-381, 2007.

GOLDBERG, M.; PARVARESH, F.; THOMAS, D.; LEGOY, M-D. WATER activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic G(liquid/solid) media **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p. 976-981, 1990.

GOMES, F, M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidzol. **Química Nova**, v. 29, p. 710-718, 2006

GRYGLEWICZ, S.; JADOWNICKA, E.; CZERNIAK, A. Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by

alcoholysis in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1379-13982, 2000.

GUNEY-ALTAY, O.; LEVIT, N.; PESTOV, D.; TEPPER, G. Precipitation of nano composite particles from a multi-component, rapidly expanding supercritical solution. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 229-241, 2006.

GUO, P.; ZHENG, C.; HUANG, F.; ZHENG, M.; DENG, Q.; LI, W. Ultrasonic pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of 4-methoxy cinnamoyl glycerol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 73-78, 2013.

GUPTA, C.; GARG ,A.P.; UNIYAL, R.C.; KUMARI, A. Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p. 258-261,2008.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R.Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194-198, 1998.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 379- 386, 2002.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, 985-990, 1999.

HAMGUI, H. et al. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 788-794, 2005.

HAO, Y. Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. **Food Microbiology**, v.15, p. 367-378, 1998a.

HAO, Y. Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in

refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 307-312, 1998b.

HASAN F., SHAH A. A., HAMEE A.; Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.235-251, 2006.

HE, W.; SUO, Q.; HONG, H.; SHAN, A; LI, C.; HUANG, Y.; LI, Y.; ZHU, M. Production of natural carotene-dispersed polymer microparticles by SEDS-PA co-precipitation. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 3495 – 3501, 2007.

HECTOR, J.R.; SIMON, J.E.; RAMBOATIANA, M.M.R.; BEHRA, O.; GARVEY, A.S.; RASKIN, I. Malagasy aromatic plants: essential oils, antioxidant and antimicrobial activities. **Proc. XXVI IHC - Future for Medicinal and Aromatic Plants - Eds. L.E. Craker et al.**, p.77-81, 2004.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A.. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HONG, H.L.; SUO, Q.L.; HE, W.Z.; LI, C.P. Formation of carotene/proanthocyanidin composite microparticles via the solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS) process through prefilming atomization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6630 - 6634, 2007.

HORCHANI, H.; SALEM, N.B.; ZARAI, Z.; SAYARI, A.; GARGOURI, Y.; CHAËBOUNI, M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2809 - 2817, 2010.

HONG, H.L.; SUO, Q.L.; HE, W.Z.; LI, C.P. Formation of carotene/proanthocyanidin composite microparticles via the solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS) process through prefilming atomization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6630-6634, 2007.

HSIEH, H.J.; NAIR, G.R.; WU, W. T. Production of ascorbyl palmitate by surfactant-coated lipase in organic media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5777-5781, 2006.

HUANG, H.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.38, p.403-412, 2002.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M.D. Inhibition of Growth and Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by Essential Oil of Spices. **Journal of Food Science**, v. 55, n.6, p. 1676-1678,1990.

ISO M., CHEN, B., EGUCHI M., KUDO T., SHRESTHA S.; Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001.

JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. 5^a ed., New York: Longman Scientific & Technical, p. 712, 1989.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6303-6307, 2006.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 179-219, 2001.

KADAROHMAN, A.; HERNANI; ROHMAN, I.; KUSRINI, R.; ASTUTI, R.M. Combustion characteristics of diesel fuel on one cylinder diesel engine using clove oil, eugenol, and eugenyl acetate as fuel bio-additives. **Fuel**, v. 98, p. 73- 79, 2012.

KAMIYA, N.; GOTO, M.; NAKASHIO, F. Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalist in Organic Media. **Biotechnology Processes**. v.11, p.270-275, 1995.

KAMATOU, G.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M. Eugenol – From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v.17, p.6953-6981, 2012.

KANG, Y.; PREPYIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X.; CHEN, A.; PU, X. Preparation of PLLA / PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). v. 322, p. 87-94, 2008.

KARMAKAR, S.; CHOUDHURY, M.; DAS, A.S.; MAITI, A.; MAJUMDAR, S.; MITRA, C. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. **Natural Product Research**, v.26, p.500-509, 2012.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 1083-1088, 1996.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v.41, p.1692-1698, 2006.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro - Guanabara: Koogan, 2003.

KHOR, G.K.; SIM J.H.; KAMARUDDIN A.H.; UZIR M.H. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification **Bioresource Technology** v.101, p.6558-6561, 2010.

KIM, M. S.; LEE, S.; PARK, J. S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: effect of process parameters. **Powder Technology**, v. 177 , p. 64-70, 2007.

KIRUMAKKI, S.R.; NAGARAJU, N.; NARAYANAN, S. A comparative esterification of benzyl alcohol with acetic acid over zeolites H β , HY and HZSM5. **Applied Catalysis A: General**, v. 273, p. 1-9, 2004.

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal Microbiol Methods**, v. 81, p.121–126, 2010.

KOBLITZ, M.G.B. **Purificação e caracterização de lipase de *Rhizopus* sp. e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas SP, 2003.

KOLLMANNSBERGER, H.; NITZ, S. The flavour-composition of supercritical gas extracts: 2. Allpice (*Pimenta dioica*). **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**; p.116-126, 1993.

KRESGE, C. T.; LEONOWICZ, M. E.; MICHAEL, E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J.C. Synthetic Mesoporous Crystalline Material , **US Pat. 5098684**, 1992.

KUO, C. H.; HSIAO, F-W.; CHEN, J-H.; HSIEH, C-W.; LIU, Y.C.; SHIEH, C-J. Kinetic aspects of ultrasound-accelerated lipase catalyzed acetylation and optimal synthesis of 4'-acetoxysesveratrol. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 546-552, 2013.

LAI, F.; WISSING, S.A.; MULLER, R.H.; FADDA, A.M. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, p. 1-9, 2006.

LAROQUE, D .A. Óleo de cravo-da-índia (*eugenia caryophyllata*) como substrato para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453- 462, 2001.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. **Food Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 443-448, 2001.

LERIN, L. A.; FEITEN, M.C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.; OLIVEIRA, J.V.; OESTREICHER, E.; OLIVEIRA, D. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 988-996, 2011.

LERIN, L. A.; LOSS, R.A.; REMONATTO, D.; DANIELA ; ZENEVICZ, M.C.; BALEN M.; NETTO, V.O.; NINOW, J. L. ; TRENTIN, C.M. ; OLIVEIRA, J.V. ; OLIVEIRA, D. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 2381-2394, 2014.

LILJA, J.; MURZINA, D.Y.; SALMIA, T.; AUMOA, J.; MÄKI-ARVELA, P.; SUNDELL, M. Esterification of different acids over heterogeneous and homogeneous catalysts and correlation with the Taft equation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 182-183, p. 555-563, 2002.

LIONZO, M.I.Z.; RÉ, M.I.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) blends to control the release of a drug model. **Journal of microencapsulation**, v. 24, p. 175-186, 2007.

LIU, K.J.; HUANG, Y.R. Lipase-catalyzed production of a bioactive terpene esters in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, v.146 p. 215-220, 2010.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335- 353, 2006.

LORIMER, J. P.; MASON, T. J. Sonochemistry parte 1: The Physical Aspects. **Chemical Society Reviews**, v.16, p.239-274, 1987.

LUNA, F. J.; SCHUCHARDT, U. Modificação de zeólitas para uso em catálise. **Química Nova**, v. 24, p. 885-892, 2001.

MACHADO, F.R.S.; REIS, D.F.; BOSCHETTO, D.L.; BURKERT, J.F.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V.; BURKERT, A.V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV

by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p.17- 21, 2014.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Reviews**, 3, Intercept Ltd., 1985.

MAJERIK, V.; CHARBIT, G.; BADENS, E.; HORVÁTH, G.; SZOKONYA, L.; BOSCH, N.; TEILLAUD, E. Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 101-110, 2007.

MAIA, J.L.; SANTANA, M.H.A.; RÉ, M.I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n.1, p.1-12, 2004.

MAIA, A. A. B.; SALDANHA, E.; ANGÉLICA, R. S.; SOUZA, C. A. G.; NEVES, R.F. Utilização de rejeito de caulim da Amazônia na síntese da zeólita A. **Cerâmica**, v. 53, p. 319-324, 2007.

MANAWWER, A.; ATEEQ, R.; NASER, M.A.; MOHAMMED, R.S. Ni/Silica catalyzed acetylation of phenols and naphthols: An eco-friendly approach. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 53-56, 2014.

MARGOLIN, A.L. Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. **Enzyme and Microbiology Technology**. v.7,p.113-119, 1996.

MARTÍN, A.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M.J. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 31-41, 2010.

MARTINS, A.B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI1A, A.S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311-2316, 2011.

MARTINS, A. B.; SCHEIN, M.F.; FRIEDRICH, J.L.R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435:

Enhanced activity and operational stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1155-1160, 2013.

MATTÉ, G.M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.14, p.206-218, 2013.

MAU, J-L.; CHEN, C-P.; HSIEH, P-C. Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinnamon, and Corni Fructus, **Journal of Agriculture Food Chemistry** v.49, p. 183-188, 2001.

McCUSKER, L.B.; BAERLOCHER, C. **Studies in Surface Science and Catalysis**. Editado por: VAN BEKKUM, H.; FLANIGEN, E.M.; JACOBS P.A.; JANSEN, J.C., Zurich: Elsevier Science B.V., p. 37, 2001.

MEIER, L.; PERGHER, S.B.C.; SÁ M.M. Desenvolvimento de uma metodologia para acetilação de nucleosídeos empregando catalisadores heterogêneos. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, **Anais... Águas de Lindóia**, 2006.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal Supercritical Fluids**, v. 36, p. 225-235, 2006.

MOON, S-E.; KIM, H.Y.; CHA, J-D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Arquives of Oral Biology**. v. 56, p. 907-916, 2011.

MOUCHREK FILHO, V.E. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP - Brasil, 2000.

NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p. 19-43, 2006.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p. 182-186, 2012.

OLIVEIRA, P.G.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F.; MEI, L.H.I. Síntese de butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, p. 632-636, 2000.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 373-382, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; BEATRIZ R. FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n. 2, 2008.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Protection**, v. 69, p. 1046-1055, 2006.

OZTURK, A.; OZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia Caryophyllata* essential oils: an animal model of anti-inflammatory activity. **European Journal of General Medicine**, v.2, p.159-63, 2005.

PALANI, A.; PANDURANGAN, A Esterification of acetic acid over mesoporous Al-MCM-41 molecular sieves **Journal of Molecular Catalysis. A, Chemical**, v. 226, p. 129-134, 2005.

PANDE, M.A.; SAMANT, S.D. Amberlyst-15 catalyzed acetylation of phenols and alcohols under solvent free conditions. **Recyclable Catalysis**, v.1, p. 13-16, 2013.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. Review: The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.29, p.119-131,1999.

- PANDEY, S. K.; TANDON, S.; AHMAD, A.; SINGH, A.L.; TRIPATHI, A.K. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235-1238, 2013
- PASAY, C.; MOUNSEY, K.; STEVENSON, G.; DAVIS, R.; ARLIAN, L.; MORGAN, M.; VYSZENSKI-MOHER, D.; ANDREWS, K.; MCCARTHY, J. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. **Plos one**, v.5, p.1-9, 2010.
- PARAOUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CASIAN, R.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1636-1641, 2010.
- PARAOUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CASIAN, R.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 166, p. 13-21, 2012.
- PARVEEN, M.; HASAN, M.K.; TAKAHASHI, J.; MURATA, Y.; KITAGAWA, E.; KODAMA, O.; IWAHASHI, H. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 46-55, 2004.
- PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 887-893, 2008.
- PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454-1462, 2009.

POUTON, C.W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133-162, 1996.

PRIAMO, W.L. **Encapsulamento de β -caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação in vitro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

RADHIAH, S.; SUHAILA, M.; NOORDIN, M.M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1116-1121, 2010.

RANGEL, H.A.; MERÇON, F. Estudo da emissão por fluorescência de ultravioleta na quantificação de um inibidor de corrosão do tipo sal de amônio quaternário em água. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p.1287-1293, 2012.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R., Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**. V.147, p.237-250, 2009.

REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G. Particle design using supercritical fluids, **Chemical Engineering & Technology**, v. 26, p. 840-845, 2003.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 70–84, 2008.

RICHETTI, A. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro RJ, 2009.

RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. dos S.; GELLI, D. S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *salmonella rubislaw*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 131-133, 2002.

RODRÍGUEZ-NÚÑES, J.R.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; WONG, B.R.; CHAVEZ, P.T.; ROCHA, M.O.C.

International Journal of Food Science and Technology, v. 47, p. 2127, 2012.

ROJO, L.; VÁZQUEZ, B.; SAN ROMÁN, J.; DEB, S. Eugenol functionalized poly(acrylic acid) derivatives in the formation of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v.24, p.1709-1716, 2008.

ROMPELBERG, C.J.; EVERTZ, S.J.;VEHHAGEN, H.; HAUVEL, P.D. Effect of eugenol on the genotoxicity of established mutagens in the liver **Food chemistry**, v. 34, p. 33-42, 1996.

ROSSA, G.E. **Desenvolvimento e Implantação de Unidade Piloto de Precipitação de partículas usando antissolvente supercrítico (SAS)**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2015.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F.C.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 5-9, 2010.

SÁ M.M., MEIER L., FERNANDES L., PERGHER S.B.C. Acetylation of α -methylene- β -hydroxy esters under heterogeneous catalysis: A regioselective preparation of Morita-Baylis-Hillman acetates. **Catalysis Communications**, v. 8, n.º. 11, p. 1625-1629, 2007.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.;MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, v.91, p.621-632, 2005.

SACRAMENTO, C.K.; CASALI, B.L.; PEREIRA, E.C. 2001. Growing spices in Brazil. . **International Pepper News Bulletin**, Jakarta, p.60-70, 2001.

SANSEVERINO, A. M. Síntese Orgânica Limpa. **Química Nova**, v.23, p. 102-107, 2000.

SANTOS, J.C.; BUENO, T.; ROS, P.C.M.; CASTRO, H.F. Lipase-catalysed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p. 956-961, 2007.

SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; ALEXANDER, K.; RIGA, A. Crystal structure determination for eugenyl acetate. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 39, p. 655-661, 2009.

SARTORI, G.; BALLINI, R.; BIGI, F.; BOSICA, G.; MAGGI, R.; RIGHI, P. Protection (and deprotection) of functional groups in organic synthesis by heterogeneous catalysis. **Chemical reviews**, v. 104, p. 199-250, 2004.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. Mestrado e Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí SC, 2005.

SAYDMOHAMMED, M.; PAL, A.K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.298, p.162-167, 2009.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B.; SALEEMI, Z.O. Stabilization of meat lipids with ground spices. **Journal of Food Lipids**, v. 2, p. 145-153, 1995.

SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.7, n.4-5, p.371-383, 2003.

SHARMA, R.; RAY, A.R.J.S.M. **Reviews in Macromolecular Chemistry & Physics**, v. 35(2), p. 327-359, 1995.

SHARMA R., CHISTI Y., BANERJEE U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Latest developments on application of heterogenous basic catalysts for an efficient and eco friendly synthesis of biodiesel: a review. **Fuel**, v. 90, n. 4, p. 1309-1324, 2011.

SHELDON, R. A.; VAN BEKKUM, H. **Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis**; Wiley: Weinheim, 2001.

SHELDON, R.; I. ARENDS, I.; U. HANEFELD, U. **Green chemistry and catalysis**, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

SHIMODA, K.; KONDO, Y.; NISHIDA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N.; HAMADA, H. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 20, p. 2256–2261, 2006.

SHU, Z.Y.; JIANG, H.; LIN, R.F., JIANG, Y.M.; LIN, L.; HUANG, J.Z., Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.62, p.1-8, 2010.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 39, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRS/UFSC, p. 467-475, 2007.

SINGH N.; SINGH R.K.; BHUNIA A.K.; STROSHINE R.L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel- Wissenschaft und -Technologie**, v. 35, p.720-729, 2002.

SKORONSKI, E.; BONETTI, T.M.; JOÃO, J.J.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Estudo cinético da obtenção de ésteres utilizando enzima lipozyme TL IM como catalisador. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 897-902, 2010.

- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.
- SOUZA, S.M.C.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p. 685-690, 2004.
- STECCHINI, M. L.; SARAIS, I.; GIAVEDONI, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, v.56, p.406-409, 1993.
- STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1846-1859, 2013.
- SUAVE J.; DALL'ANGOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, p. 12-20, 2006.
- SUBRA, P.; LAUDANI, C.G.; GONZÁLEZ, A.V.; REVERCHON, E. Precipitation and phase behavior of theophylline in solvent-supercritical CO₂ mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, 35, 95-105, 2005.
- SUHR, K.I.; NIELSEN, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 665-674, 2003.
- TABERNERO, A.; MARTÍN, E. M.; GALÁN, M. A. Precipitation of tretinoin and acetaminophen with solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). Role of phase equilibria to optimize particle diameter. **Powder Technology**, v. 217, p. 177-188, 2012.
- TEPE, B.; DONNEY, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLU, G.V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S.*

- cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, v. 84, p. 519-525, 2004.
- TEWARI, P.K.; SINGH, A.K. Preconcentration of lead with Amberlite XAD-2 and Amberlite XD-7 based chelating resins for its determination by flame atomic spectrometry. **Talanta**, v.56, p. 735-744, 2002.
- TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542–545, 2009.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V., A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**. v. 3, p.182-196, 2010.
- TUFVESSON, P. et al. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 200-205, 2011.
- USHIMARU, P.I.; SILVA, M.T.N.; DI STACI, L.C.; BARBOSA, L.; FERNADES JÚNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, 717-719, 2007.
- UTAMA, J. M. S. et al. *In vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, 2002.
- VANIN, A.B. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*)**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim 2014.
- VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. J. Formulation of lavender essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369-377, 2010.
- VIEIRA, S. Análise de variância: (ANOVA). São Paulo: Atlas, 2006.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308-317, 2003.

VOLPÉ, G.; MALLET, V.N. Recovery of fenitrothion from water using Amberlite XAD-7. **Journal of Chromatography**, v. 177, p. 385-389, 1979.

VRINDA MENON, K.; GARG, S.R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, v.18, p.647-650, 2001.

WANNISSORN, B.; MANEESIN, P.; TUBTIMTED, S.; WANGCHANACHAI, G. Antimicrobial activity of essential oils extracted from Thai herbs and spices. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v.2, p.677-689, 2009.

WANG, X., WANG, Y., WEI, K., ZHAO, N., ZHANG, S., Chen, J. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. **Journal of Materials Processing Technology**, 209, 348-354, 2009.

WANG, J.; WANG, S.; LI, Z.; GU, S.; WU, X.; WU, F. Ultrasound irradiation accelerates the lipase-catalyzed synthesis of methyl caffeate in an ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 111, p. 21-28, 2015.

WORANUCHA, S.; YOKSANA, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 578-585, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva, 2012.

XIAO, Y. M.; WU, Q.; CAI, Y.; LIN, X. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2097-2103, 2005.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E.J.; LAMBERT, A.H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton. **Ultrasonics**, v.42, p.87-91, 2004.

YADAV, G.D.; THATHAGAR, M.B. Esterification of maleic acid with ethanol over cation-exchange resin catalysts. **Reactive & Functional Polymers**, v. 52, p. 99-110, 2002.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 2-3, p. 113-119, 2004.

YADAV, G. D.; YADAV, A. R. Insight into esterification of eugenol to eugenol benzoate using a solid super acidic modified zirconia catalyst UDCaT-5. **Chemical Engineering Journal**, v. 192, p. 146-155, 2012.

YEO, S.D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 287-308, 2005.

YU, X.-W.; LI, Y.-Q. Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with n-butanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.32, p.107-113, 2005.

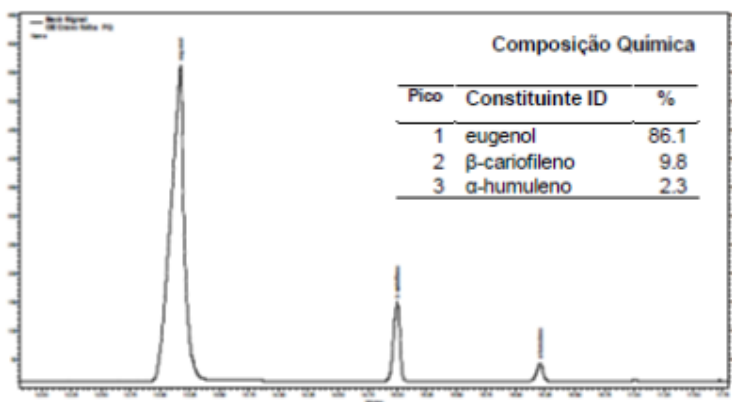
YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v.45, p.519-525, 2010.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZHENG, M. M. et al. Ultrasonic pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of phytosterol esters with different acyl donors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 1015-1020, 2012.

ANEXO I

Cromatograma do óleo essencial de cravo folha cedido pelo fornecedor (FERQUIMA). O método utilizado foi cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AGILENT 1820A), coluna HP-5 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (AGILENT), a temperatura da coluna foi: 70 $^{\circ}\text{C}$ (0 min.), 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 240 $^{\circ}\text{C}$. Split 1/50. Detector FID (250 $^{\circ}\text{C}$), volume de injeção 1 μL (concentração de 1 % diluído em clorofórmio). As análises foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulhas, Belo Horizonte, MG.



ANEXO II

Cromatogramas dos ésteres obtidos empregando Lipozyme TL IM ,
Amberlite XAD-16 e peneira molecular de 4 Å, respectivamente.

