



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

María José Arbulú Silva

**LIPOZYME TL IM COMO CATALISADOR NA SÍNTESE DE
ACETATO DE EUGENILA VIA ACETILAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Eugenia caryophyllata*) EM
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Florianópolis/SC

2014

**Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila
via acetilação do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Eugenia
caryophyllata*) em sistema livre de solvente**

Por

María José Arbulú Silva

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Débora de Oliveira
Co-orientador

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador

Banca Examinadora:

Dr.^a. Denise Moritz

Dr.^a. Claudia Mara Trentin Santin

Dr. Lindomar Lerin

“Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious... and curiosity keeps leading us down new paths”.

Walt Disney

“Looking out where we don't normally look, because good ideas come from anyone, anywhere”.

Consuelo Castillo Kickbusch

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sua presença viva e constante, fortalecendo-me e guiando-me em todos os momentos.

Agradeço de todo coração aos meus pais José Augusto Arbulú e Elma María Silva, e a meu querido irmão Alejandro Arbulú Silva pela imensa ajuda, conselhos e constante apoio. Graças a Deus tenho vocês na minha vida.

Agradeço a toda minha família, especialmente a minha prima Carla, tia Yini e avó Mamaelma, pelas palavras, apoio, sorrisos, lágrimas, abraços e carinhos. Vocês alegam meus dias.

Ao professor Jorge Luiz Ninow por toda a orientação e paciência.

A professora Débora de Oliveira pela valiosa co-orientação, paciência, dedicação, estímulo, orientação, amizade. Teu ser pesquisadora, professora e humano são exemplos que levarei sempre comigo em minha prática profissional e de vida.

Ao professor Rogério Dallago, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus Erechim, pela ajuda na interpretação do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H).

A professora Natália Paroul, da URI, pela ajuda na realização da atividade antimicrobiana.

Ao pós-doutorando Lindomar Lerin pelas sugestões ao longo deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, que contribuíram para a minha formação.

A Eliane Cipolatti pela grandiosa amizade, ajuda, pressão, risadas, brigas, for listening my boring non-stop talks, hehe, for always being there when I needed you the most... A Raquel Loss não somente pela grande ajuda na elaboração da dissertação, sobretudo por ser minha amiga. Passar momentos brigando e depois comendo açaí e subway com vocês, não tem preço :D

Aos meus queridos *friends*, Inessa, Ju, Mara, Manu, Denise e Ricardo, Lindomar, Flavinha, Laura, Pequena Lu, Jacque, Isadora,

Peque, Claudia, Daiane, Vanessa, Marla, prazer em conhecer vocês, obrigada pela amizade.

Aos meus amigos do Perú, é satisfatório saber que posso contar com vocês ainda estando longe. Muito obrigada Mariana, Lucía, Chio, Sandy, Francesca, Mariella, Marusella, Gisell, Rukmini e amigas todas.

Ao pessoal do INVADIDO, ENGBIO, LATESC, Central de Análise, pela convivência pacífica e ajuda durante a execução deste projeto, em especial a minha IC Gabriela Pereira pela ajuda no desenvolvimento experimental, e a Jonathan Bork pela ajuda com a química.

A secretária do curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Jeovana pela atenção e ajuda nos assuntos burocráticos.

A banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muchas Gracias!!!

Resumo da Dissertação de mestrado 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 Mestre em Engenharia de Alimentos.

Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente

María José Arbulú Silva

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luís Ninow

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Débora de Oliveira

Este trabalho objetivou o estudo das variáveis que interferem na síntese enzimática de acetato de eugenol em sistema livre de solvente. Eugenol, presente no óleo essencial de cravo-da-Índia, e anidrido acético foram empregados como substratos para a reação. Inicialmente, para a seleção do melhor biocatalisador, foram utilizadas as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, além de avaliar-se a influência da umidade das enzimas na produção de acetato de eugenila. Com o biocatalisador escolhido avaliou-se o efeito da velocidade de agitação na produção de acetato de eugenila. A partir dos planejamentos experimentais se obteve a maior conversão (83,54%) nas condições 1:5 de razão molar (mol de eugenol: mol de anidrido acético), 5% (m/m de substrato) de concentração de enzima e 70 °C de temperatura. Através do primeiro estudo cinético considerou-se a concentração de 5% com 60 min (1 h) de tempo reacional como a melhor condição (90,73% atingido); para o segundo estudo cinético escolheu-se a razão molar 1:5 mol: mol em 120 min (2 h), já que atingiu 92,86% de acetato de eugenila. O reuso enzimático com 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%. Da amostra obtida na condição experimental otimizada e purificada confirmou-se através da RMN-¹H que os espectros com seus respectivos deslocamentos dos átomos pertencem a uma molécula de acetato de eugenila. Na atividade antimicrobiana a média das bactérias Gram-negativas foi 17,55 mm, pelo qual foram mais sensíveis ao poder antimicrobiano do acetato de eugenila, em comparação das bactérias Gram-positivas, que tiveram uma média de 16,62 mm de halo de inibição. Estes resultados demonstram a importância da reação de

esterificação enzimática para melhorar as propriedades do óleo essencial de cravo-da-Índia, para que o mesmo possa ser aplicado como antimicrobiano natural em alimentos e bebidas.

Palavras-chave: acetato de eugenila, óleo essencial, acetilação enzimática, sistema livre de solvente.

Summary of Master'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 Master in Food Engineering.

Lipozyme TL IM as catalyst in the synthesis of eugenyl acetate via acetylation of essential oil of clove (*Eugenia caryophyllata*) in solvent-free system

María José Silva Arbulú

Advisor: Prof. Dr. Jorge Luis Ninow

Co-supervisor: Prof.^ª Dr.^a Débora de Oliveira

This work aimed to study the variables that interfere with the enzymatic synthesis of eugenyl acetate in a solvent free system. Eugenol, present in the essential oil of clove, and acetic anhydride were used as substrates for the reaction. Initially, for selection of the best biocatalyst were used commercial lipases as Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM, besides assessing the influence of the humidity of the enzymes in the production of eugenyl acetate. Once the biocatalyst had been chosen, the effect of the velocity of agitation in the production of eugenyl acetate was evaluated. From the experimental design, the highest conversion (83.54%) reached was in terms of molar ratio 1:5 (mol of eugenol:mol of acetic anhydride), 5% (w/w of substrate) of enzyme concentration and 70 °C of temperature. The first kinetic study permitted the selection of 5% of enzyme concentration and 60 min (1 h) of time as the best reaction condition (90.73%); from the second kinetic study was chosen as the best condition: 1:5 mol:mol of the molar ratio in 120 min, with 92.86% achievement of eugenyl acetate. Both kinetics show their specific rates, whose tendency was to decrease with the increment of the production of eugenila acetate. The enzyme Lipozyme TL IM reusability, firstly showed high conversion of 94.32%. In the second cycle the conversion dropped to 75.18%, and so for the third cycle 53.17%. The optimal experimental condition was purified and confirmed by ¹H-NMR spectra, with the respective displacements of atoms belonging to a molecule of eugenyl acetate. In the antimicrobial activity, the mean was 17.55 mm for Gram-negative bacteria, whereby they were more sensitive to the antimicrobial power of eugenila acetate, compared to the mean obtained on Gram-positive bacteria which had an average 16.62 mm of inhibition halo. These results show the importance of an esterification reaction, to improve the properties of the essential oil

of clove, so that it can be added as a natural antimicrobial agent in food and beverages.

Keywords: eugenyl acetate, essential oil, enzymatic acetylation, solvent free system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Árvore de cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.), (b) Botões secos.	26
Figura 2 - Estrutura química de eugenol.	28
Figura 3 - Estrutura química de acetato de eugenila.	30
Figura 4 - Síntese de acetato de eugenila por acetilação direta do eugenol com anidrido acético.....	37
Figura 5 - (a) Mistura reacional óleo essencial de folha de cravo-da- Índia e anidrido acético, e (b) Mistura reacional óleo essencial de folha de cravo-da-Índia, anidrido acético e enzima.....	43
Figura 6 - Shaker com agitação orbital, usando no ensaios para síntese enzimática de acetato de eugenila	43
Figura 7 - Banho termostatizado com agitação orbital, usando no ensaios para síntese enzimática de acetato de eugenila.	43
Figura 8 - Filtração do acetato de eugenila com hexano em papel filtro.....	44
Figura 9 - Rota-evaporador acoplado a bomba vácuo e banho de aquecimento.	44
Figura 10 - Efeito da velocidade de agitação sobre a conversão de acetato de eugenila usando o biocatalisador Lipozyme TL IM em sistema livre de solvente. Media (n=3), $p<0,05$	52
Figura 11 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis razão molar, temperatura e concentração de enzima, bem como as interações entre estas variáveis, na produção de acetato de eugenila ($p<0,05$).	55
Figura 12 - 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 ($p<0,05$).	57
Figura 13 - Diagrama de conversões preditas vs. conversões observadas para a produção de acetato de eugenila via síntese enzimática.	60
Figura 14 - Superfície de resposta para produção de acetato de eugenila em função da razão molar e da temperatura.	61
Figura 15 - Efeito da concentração de enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila à temperatura 70°C, razão molar de	

eugenol:anidrido acético 1:5 e velocidade de agitação 150 rpm, e na velocidade específica de consumo de substrato.	62
Figura 16 - Efeito da razão molar (mol de eugenol:mol de anidrido acético) na produção de acetato de eugenila à temperatura 70 °C, concentração de enzima 5% e velocidade de agitação 150 rpm, e na velocidade específica de consumo de substrato.	64
Figura 17 - Efeito do uso sucessivo da enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila à razão molar de 1:5 eugenol:anidrido acético, temperatura 70 °C, 5% de enzima, tempo reacional 2 h e velocidade de agitação 150 rpm.....	65
Figura 18 - Cromatograma do éster, antes da purificação em destilação a vácuo, obtido nas condições experimentais: razão molar 1:5 mol de eugenol:mol de anidrido acético, 5% (m/m substrato) de enzima Lipozyme TL IM, 70 °C, 150 rpm, em sistema de solvente.	66
Figura 19 - Cromatograma do éster, após purificação em destilação a vácuo, obtido nas condições experimentais: razão molar 1:5 eugenol:anidrido acético, 5% (m/m substrato) de enzima Lipozyme TL IM, 70 °C, 150 rpm, em sistema de solvente.....	67
Figura 20 - Espectro de RMN- ¹ H para a amostra obtida via acetilação do óleo essencial da folha do cravo-da-Índia com anidrido acético, catalisado por Lipozyme TL IM, em sistema livre de solvente (a) e o padrão comercial de acetato de eugenila (b).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações técnicas do óleo essencial de folha do cravo-da-Índia.	41
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 , para produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como biocatalisador.	46
Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como biocatalisador.	46
Tabela 4 - Efeito da concentração de enzima entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.	47
Tabela 5 - Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.	47
Tabela 6 - Seleção do melhor biocatalisador e influência da umidade inicial no suporte dos mesmos, nas condições experimentais da reação de acetilação enzimática para produção de acetato de eugenila.	51
Tabela 7 - 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 biocatalisador.....	54
Tabela 8 - 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 biocatalisador.....	56
Tabela 9 - Análise de variância para produção de acetato de eugenila.	58
Tabela 10 - Atividade antibacteriana do acetato de eugenila, pelo método de difusão em placas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando a concentração de 20 μ L de amostra por disco.	72

NOMENCLATURAS

ANOVA - Análise de variância

ATP - adenosina trifosfato

CAT - Valor codificado correspondente à concentração de catalisador

ERO - Espécies reativas do oxigênio

FDA - Food and Drug Administration

g - grama

GRAS - Generally regarded as safe

m - massa da substância convertida

mc - massa de catalisador

RM - Valor codificado correspondente à razão molar

RMN¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

h - horas

IUN - Unidade Novo de Transesterificação

rpm - rotação por minuto

t - Tempo de reação

T - Valor codificado correspondente à temperatura

v - Velocidade de consumo de substrato

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	23
3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	25
3.3 EUGENOL	27
3.4 ACETATO DE EUGENILA	30
3.5 LIPASES	31
3.6 ACILAÇÃO VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA	33
3.6.1 Acetilação enzimática	36
3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
3.8 CONSIDERAÇÃO SOBRE O ESTADO DA ARTE	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS	40
4.1.1 Enzimas	40
4.1.2 Reagentes	41
4.1.3 Equipamentos	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Aparato experimental para a síntese enzimática de acetato de eugenila em sistema livre de solvente	42
4.2.2 Influência da umidade inicial no suporte das enzimas na conversão de acetato de eugenila	44
4.2.3 Seleção do melhor biocatalisador para produção de acetato de eugenila	45

4.2.4	Determinação da velocidade de agitação do sistema reacional na produção de acetato de eugenila.....	45
4.2.5	Otimização da produção enzimática de acetato de eugenila.....	45
4.2.6	Estudo cinético da produção enzimática de acetato de eugenila.....	46
4.2.7	Estudo de sucessivos ciclos de uso da enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente.....	47
4.2.8	Determinação da velocidade específica da reação	47
4.2.9	Quantificação de acetato de eugenila.....	48
4.2.10	Purificação da amostra otimizada de acetato de eugenila.....	48
4.2.11	Identificação de acetato de eugenila.....	48
4.2.12	Atividade antimicrobiana	48
4.2.13	Análise estatística	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR E INFLUÊNCIA DA PERCENTAGEM DE UMIDADE INICIAL NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA ..	50
5.2	DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA	52
5.3	SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA.....	53
5.3.1	Cinética da produção enzimática de acetato de eugenila.....	61
5.4	ESTUDO DO USO SUCESSIVO DA ENZIMA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA.....	65
5.5	PURIFICAÇÃO DO ÉSTER DE ACETATO DE EUGENILA.....	66
5.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H).....	68
5.7	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	71

6 CONCLUSÕES	75
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
8 REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O crescente número de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas trouxe um aumento da incidência de infecções bacterianas e fúngicas, as quais são a maior causa de morbidade e/ou mortalidade (LEWIS; AUSUBEL, 2006). Apesar das constantes melhorias nas técnicas de higiene, visando eliminação de patógenos na produção de alimentos, a segurança alimentar continua sendo de grande importância para a saúde pública.

Outro fator que chama a atenção é a alta incidência de doenças cardiovasculares, hipertensão e derrames, sendo estas associadas ao elevado consumo de sódio (WHO, 2012). Considerando que em alguns alimentos processados, o sódio também atua como conservante, inibindo o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, a redução da concentração de sódio nestes alimentos requer a adição de conservantes para garantir a qualidade microbiológica dos mesmos (BURT, 2004). Assim, as indústrias estão constantemente à procura de novos conservantes que mantenham a qualidade e sabor dos alimentos, que sejam ao mesmo tempo de baixo impacto ao meio ambiente e atendam à nova tendência por produtos naturais. As plantas utilizadas pela medicina popular são recursos promissores, para o tratamento de patologias causadas pela ingestão de alimentos contaminados, aliada às pesquisas que confirmem estas propriedades terapêuticas.

Desde tempos antigos as civilizações focaram-se na atividade antimicrobiana presente nas essências de óleos de várias plantas, tendo componentes benéficos e terapêuticos nos campos da medicina. Neste sentido, óleos essenciais derivados de plantas aromáticas medicinais têm excepcionalmente bons efeitos antimicrobianos, antimicóticos e antitoxigênicos, contra bactérias, leveduras, fungos filamentosos e vírus (DEVI et al., 2010), fato que faz com que estes compostos tenham recebido grande atenção na aplicação em alimentos como aditivos antimicrobianos, por suas propriedades hidrofóbicas que limitam sua dispersão ajudando à estabilização em sistemas aquosos dentro dos alimentos (BRENES; ROURA, 2010).

Especiarias como cravo, orégano, menta, tomilho e canela têm sido utilizadas como conservantes de alimentos há vários anos. O cravo em particular atraiu mais atenção uma vez que apresentou maior potencial antioxidante e antimicrobiano destacando-se entre as outras especiarias (SHAN et al., 2005). O óleo essencial de cravo-da-índia é

um efetivo agente antimicrobiano e antioxidante (grupo hidroxila), sendo estas características atribuídas às de seu composto majoritário, o eugenol (AYOOLA et al., 2008). Porém, a aplicação direta deste composto fenólico volátil, o eugenol apresenta algumas desvantagens, principalmente por apresentar baixa estabilidade por possuir 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. Uma alternativa seria a substituição do eugenol, sendo que, além de apresentar muitas vantagens em relação às propriedades biológicas, surge a possibilidade de que seus derivados acilados, esterificados, acetilados, entre outros, apresentem propriedades ainda melhores (KARMAKAR et al., 2012; HUANG et al., 2002; CARRASCO et al., 2008).

Desta forma, modificações moleculares, como a adição de grupos funcionais à estrutura da molécula do eugenol, através de reações de acetilação, surgem como uma alternativa para minimizar os problemas de estabilidade. Processos que incluem catálise química são altamente questionados em relação à contaminação não somente do produto como também dos resíduos altamente tóxicos gerados no processo. Uma alternativa sustentável, promissora e efetiva é a aplicação de biocatalisadores enzimáticos para produção de compostos específicos ou complexos requeridos pelas indústrias. Em geral, métodos biocatalíticos de síntese de ésteres são preferíveis quando comparados com métodos químicos convencionais. O uso de reações catalisadas por enzimas contornam muitos destes problemas, devido à especificidade do substrato, região e enantio seletividade destes biocatalisadores, que podem ser utilizados em condições reacionais brandas. Outra vantagem interessante da modificação enzimática, do ponto de vista comercial, é que realizada em sistema livre de solvente, forma-se um composto catalogado como natural com valor agregado, sem gerar resíduos tóxicos ao ambiente que precisem de gastos extras em tratamentos complexos de purificação entre outros.

Dentro deste contexto, este trabalho objetiva a produção de acetato de eugenila através de uma reação de acetilação enzimática em sistema livre de solvente, usando como substrato eugenol, presente no óleo essencial de cravo-da-Índia e anidrido acético, além da avaliação do potencial antimicrobiano da molécula produzida: acetato de eugenila.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo biotecnológico para produção de acetato de eugenila via acetilação enzimática, em sistema livre de solvente orgânico e avaliar o potencial antimicrobiano do éster obtido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar o melhor catalisador assim como a velocidade de agitação para sintetizar acetato de eugenila utilizando o eugenol presente no óleo essencial de folha de cravo-da-Índia como reagente de partida.

Avaliar o efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura) empregando técnicas de planejamento experimental visando determinar otimizar o processo, que maximizem a conversão do acetato de eugenila.

Avaliar a cinética reacional dos sistemas estudados nas condições experimentais maximizadas determinadas na etapa anterior.

Determinar a estrutura do éster obtido.

Avaliar a atividade antimicrobiana do acetato de eugenila pelo método de difusão de placas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis aromáticos, provenientes das flores, brotos, sementes, cascas, folhas, ervas, madeiras, frutas e raízes de origem botânica. São industrialmente extraídos por destilação com vapor de água, mas na atualidade o método mais utilizado é por extração supercrítica com dióxido de carbono, operando a baixas temperaturas, garantindo a preservação dos compostos termolábeis essenciais presentes, sendo os mesmos armazenados em recipientes escuros e herméticos para evitar mudanças na sua composição (BURT, 2004; ZIZOVIC et al., 2007; GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011).

Sabe-se que os óleos essenciais são misturas complexas e simples ao mesmo tempo, complexas porque podem conter dezenas ou até mesmo centenas de compostos diferentes, sendo que o composto majoritário presente dependerá da espécie ou variedade, e são misturas simples porque seus componentes apresentam natureza principalmente terpênica, com estruturas químicas inter-relacionadas. A quantidade dos compostos presentes nos óleos essenciais, como monoterpenos hidrocarbonados, derivados oxigenados (alcoóis, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos), sesquiterpenos, terpenos de alto peso molecular, ceras, parafinas e pigmentos, são diretamente proporcionais ao estado das propriedades genéticas da planta, idade e ambiente onde elas estão crescendo (CONSENTINO et al., 1999; GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011).

Burt (2004) resume os principais compostos presentes em alguns óleos essenciais, como por exemplo no coentro (*Coriandrum sativum*) o linalol e *E*-2-decanal, na canela (*Cinnamomum zeylandicum*) o trans-cinamaldeído, no orégano (*Origanum vulgare*) o carvacrol, timol e γ -terpineno, no alecrim (*Rosmarinus officinalis*) o γ -terpineno, acetato de bornilo e cânfora, na sálvia (*Salvia officinalis* L.) a cânfora, α -pineno e β -pineno, no cravo (*Syzygium aromaticum*) o eugenol e acetato de eugenila, e no tomilho (*Thymus vulgaris*) o timol, carvacrol, γ -terpineno e *p*-cimeno.

Na natureza os óleos essenciais de origem botânica além de serem flavorizantes, são substâncias criadas como mecanismo de defesa, com propriedades inibidoras ou biocidas de micro-organismos

patógenos, evitando doenças ou infecções nas mesmas plantas. Devido à estas funções de proteção à planta, diversos estudos apontam propriedades benéficas aos óleos essenciais, como característica antisséptica, antimicrobiana e antioxidante, além da já conhecida utilização na culinária (PORRES-MARTÍNEZ et al., 2013; BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014).

A atividade antioxidante é uma das características dos óleos essenciais que merecem destaque. Biologicamente, os antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir os processos de oxidação. Bagheri, Manap e Solati (2014) investigaram a ação antioxidante do óleo essencial da pimenta preta (*Piper nigrum* L.), cujos compostos majoritários β -cariofileno, limoneno, sabineno, 3-careno, β -pineno e α -pineno, confirmam ter atividade antioxidante, sendo que esta atividade não foi atribuída aos compostos principais já que devido à mistura e à sinergia deles com os compostos minoritários, se consegue maior atividade antioxidante do óleo essencial como um todo. Porres-Martínez et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante e cito-protetora do óleo essencial de sálvia (*Salvia lavandulifolia*), onde o principal composto monoterpênico 1,8-cineol apresentou potencial antioxidante. Em relação ao efeito cito-protetor, o óleo de sálvia protegeu contra o estresse oxidativo que exercem as espécies reativas do oxigênio (ERO) as quais são potencialmente prejudiciais, uma vez que podem produzir enfermidades crônicas como diabetes, arteriosclerose, problemas cardiovasculares, câncer, entre outros.

Outra propriedade dos óleos essenciais é sua ação biocida pelos agentes antimicrobianos, os quais são definidos como substâncias ativas que contêm uma ou mais substâncias destinadas a destruir, inibir o crescimento, prevenir a ação destrutiva e exercer um efeito controlador em micro-organismos patógenos através de tratamentos químicos ou biológicos, sendo que os biológicos podem ser considerados ecologicamente corretos (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011). Nos óleos essenciais, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela propriedade antimicrobiana (CONSENTINO et al., 1999), sendo possível encontrar trabalhos envolvendo o uso de óleos essenciais como agente antimicrobiano contra bactérias patogênicas. Hitokoto et al. (1980) estudaram o poder de inibição do anetol extraído do óleo essencial de sementes de anis estrela em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus versicolor* (concentração inibitória mínima 2000 $\mu\text{g/mL}$), de timol extraído do óleo essencial de tomilho em *A. flavus* (400 $\mu\text{g/mL}$) e em *A. ochraceus* (200 $\mu\text{g/mL}$), e do eugenol extraído do óleo essencial de cravo em *A. flavus* (250 $\mu\text{g/mL}$) e em *A. versicolor* (250 $\mu\text{g/mL}$). Cosentino et al.

(1999) avaliaram o poder antimicrobiano dos compostos α -pineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, linalol, α -terpineol, timol e carvacrol, presentes no óleo de tomilho, contra o crescimento de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os antimicrobianos mais efetivos foram timol e carvacrol, e os que não apresentaram características antimicrobianas foram α -pineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, confirmando que os hidrocarbonetos são os componentes menos eficientes nos óleos essenciais. Estudo semelhante, avaliando o potencial antimicrobiano do eugenol, cinamaldeído, timol e carvacrol, extraídos de óleos essenciais de cravo, canela, orégano e tomilho, respectivamente, foi realizada por Pei et al. (2009), onde as concentrações mínimas para reduzir a viabilidade da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* foram de 1600, 400, 400 e 400 x 10³ µg/L, respectivamente.

A atividade antimicrobiana é diretamente relacionada com a defesa contra patógenos ou bactérias que deterioram os alimentos, ressaltando sua importância como conservante na indústria de alimentos. Uma desvantagem na aplicação direta destes óleos essenciais, é que adicionados em altas quantidades podem modificar notavelmente a textura, sabor e aroma dos alimentos (SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2014), sendo esta a principal razão para extrair compostos e modificar eles para potencializar suas propriedades biológicas.

3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

O cravo da Índia pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) é um botão seco obtido das flores verdes-amareladas da árvore *Syzygium aromaticum* L. (Figura-1a), nativa das ilhas Molucas na Indonésia, com altura média de 8 - 10 metros (SOTO; BURHANUDDIN, 1995; AFFONSO et al., 2012).

O botão seco do cravo-da-Índia (Figura-1b) vem sendo usado popularmente na culinária como tempero para melhorar ou proporcionar um sabor típico nas comidas, é também utilizado em aplicações terapêuticas; sobretudo processado em forma de óleo, é adicionado em produtos alimentícios, cosméticos, medicamentos, para tratamento de doenças, entre outros, sendo que suas propriedades biológicas ainda estão sendo investigadas (SRIVASTAVA; MALHOTRA, 1991; SRIVASTAVA, 1993; AFFONSO et al., 2012).

No Brasil, a Bahia é considerada a grande produtora de cravo-da-Índia, principalmente na região do baixo sul, em cidades como Valença, Itubrá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha (AFFONSO et al., 2012).

Figura 1 - (a) Árvore de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* L.), (b) Botões secos.



Fonte: Armazém das especiarias (2014) (<http://armazemdasespeciarias.com.br>).

O óleo de cravo é um líquido amarelo claro, oleoso, imiscível em água, obtido pela destilação das flores, caules e folhas de *Syzygium aromaticum* L. (SOTO; BURHANUDDIN, 1995; ANDERSON; McKINLEY; COLAVECCHIA, 1997). Reineccius (1994) classifica o óleo de cravo como um composto aromático fenólico de impacto sensorial médio. Este óleo é considerado seguro pela FDA (*Food and Drug Administration*), e certificado como GRAS “*Generally Regarded As Safe*”, quando o conteúdo não excede os 1500 ppm em todas as categorias dos alimentos (ANDERSON; McKINLEY; COLAVECCHIA, 1997; GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012). A ingestão diária de óleo de cravo, estabelecida pela Organização Mundial da Saúde, em aditivos alimentares é de 2,5 mg/kg peso do corpo humano (NAGABABU; LAKSHMAIAH, 1992).

É utilizado mundialmente como agente flavorizante nos alimentos, como agente antimicrobiano em carnes cozidas (HAO; BRACKETT; DOYLE, 1998), conservante de iogurte (BAYOUMI, 1992) e também em aromaterapia, uma vez que é efetivo, seguro e de custo relativamente baixo (SOTO; BURHANUDDIN, 1995; ANDERSON; McKINLEY; COLAVECCHIA, 1997).

O óleo de cravo apresenta propriedades biológicas como: atividade antioxidante (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012), atividade antimicrobiana (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998), poder anestésico para dores de dente (ALQAREER; ALYAHYA; ANDERSSON, 2006), e também como anestésico na

aquicultura para adormecer ou tranquilizar aos peixes no momento depois da captura para o transporte (KENNEDY; GALE; OSTRAND, 2007), como substrato para formação de ácido ferúlico (potente antioxidante) e ácido vanílico (agente flavorizante) (RABENHORT, 1996), entre outras aplicações.

O óleo de cravo, como todo óleo essencial, é uma mistura de compostos, sendo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) o componente majoritário, em concentrações de 76,8 - 95% (BRIOZZO et al., 1989; SRIVASTAVA; MALHOTRA, 1991; MOON; KIM; CHA, 2011). Também apresenta outros compostos fenólicos, em menor quantidade, como o β -cariofileno (17,4%), α -humuleno (2,1%), e acetato de eugenila (1,2%) (CHAIIEB et al., 2007).

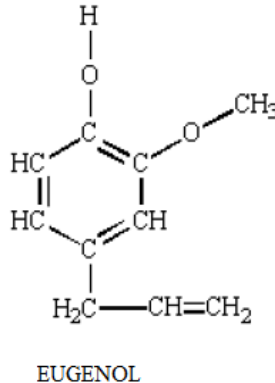
3.3 EUGENOL

O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$; 4-alil-2-metoxifenol), é um líquido oleoso de cor amarelo claro à luz, quase pálido com odor característico a cravo (ITO; MURAKAMI; YOSHINO, 2005), cuja estrutura química apresenta-se na Figura 2. O eugenol é um componente natural ativo do óleo de cravo-da-Índia, isolado e caracterizado como um fenilpropeno de cadeia curta de hidrocarbonetos, sendo que o mesmo pode ser produzido sinteticamente pela alilação do guaiacol com cloreto de alila. A separação do eugenol do óleo essencial é realizada através da mistura do mesmo com soluções salinas, em excesso de sódio aquoso (3%) ou em solução de hidróxido de potássio, levando à formação de um sal alcalino fenólico, onde a porção não dissolvida é removida, e a solução alcalina acidificada a baixas temperaturas liberando o eugenol, que é purificado por destilação (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). Segundo a *European Food Safety Authority* - EFSA (2011) o eugenol é ligeiramente solúvel em água, sendo miscível em água em temperaturas menores que 16 °C (SOTO; BURHANUDDIN, 1995). 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).

Dentre as características do eugenol, destacam-se as de aditivo natural aromatizante e intensificador de sabor, sendo amplamente utilizado em bebidas alcoólicas, como *whisky*, em produtos alimentícios como agente flavorizante em sorvetes, produtos de padaria, doces, assim como em cosméticos, perfumes, farmacêuticos, em químicos como detergentes e sabonetes. O eugenol é a fonte na produção industrial de

iso-eugenol e metil-eugenol. Também é utilizado na formulação de cimento dental e como ingrediente de antisséptico bucal (ROJO et al., 2008; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Figura 2 - Estrutura química de eugenol.



Fonte: Ayoola et.al., 2008.

Pelas propriedades biológicas do eugenol, pode ser usado como antisséptico e antimicrobiano por seu efeito bactericida, rompendo as membranas celulares dos micro-organismos (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994; MOON; KIM; CHA, 2011), bacteriostático (BRIOZZO et al., 1989), antifúngico devido ao fato que pode modificar morfológicamente a estrutura da envoltura do fungo interferindo com sua adesividade evitando a colonização no tecido do hospedeiro (RANA; RANA; RAJAK, 2011), como agente larvicida (PANDEY et al., 2013), antioxidante por possuir um grupo fenólico (ITO; MURAKAMI; YOSHINO, 2005), cito-protetor (KUMARAVELU et al., 1996), anti-genotóxico e anti-cancerígeno (MURAKAMI et al., 2003), anti-inflamatório e anticoncepcional (DANIEL et al., 2009), analgésico (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012), anti-depressivo (TAO et al., 2005), anti-mutagênico (ROMPELBERG et al., 1995), como inibidor da agregação plaquetária sanguínea e da formação de tromboxanos (SRIVASTAVA; MALHOTRA, 1991; CHEN; WNAG; CHEN, 1996), também em aquicultura como agente sedativo por ter efeito anestésico (ANDERSON; MCKINLEY; COLAVECCHIA, 1997; ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005).

Devido ao fato de que o eugenol apresenta muitas vantagens quanto a suas propriedades biológicas, surge a possibilidade de que seus derivados acilados, esterificados, acetilados, entre outros, apresentem propriedades ainda melhores. Algumas investigações confirmam esta hipótese. Karmakar et al. (2012) estudaram o eugenol e seus derivados (precursores de flavonas, isoflavonas, flavonoides, sesquiterpenos e outros), onde obtiveram resultados positivos na eficácia da preservação de ossos contra a osteoporose, nos resultados de densidade óssea, conteúdo mineral ósseo e força de tensão dos ossos. Huang et al. (2002) estudaram a toxicidade do eugenol, isoeugenol e metileugenol em insetos que deterioram os cultivos de milho, obtiveram uma maior efetividade com o isoeugenol. O eugenol, assim como o carvacrol e o timol, é lipofílico e pode facilmente dispersar-se entre as cadeias do graxo acila que compõem as camadas duplas de membranas celulares. Além de modificar o fluxo e a permeabilidade das membranas celulares, perturba o crescimento celular e a morfogênese da superfície celular, atuando como agente antimicrobiano (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Carrasco et al. (2008) estudaram as propriedades antioxidante e anticancerígena do eugenol e de seus análogos obtidos por reações de acetilação e nitração, onde os resultados obtidos demonstram 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. A produção deste composto melhorado tem como finalidade ser mais efetivo no tratamento contra câncer de mama e de fígado, entre outros.

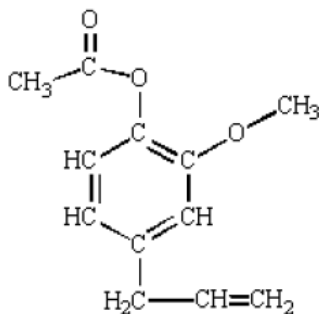
Horchani et al. (2010b) utilizaram a lipase produzida por *Staphylococcus aureus* como catalisador para a reação de esterificação do eugenol com o ácido benzóico, formando um éster benzoato de eugenila, o qual apresentou maior atividade antioxidante e caráter lipofílico em comparação ao eugenol puro.

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, surgindo como alternativa neste trabalho a modificação da molécula de eugenol, reação chamada acetilação, para obtenção de acetato de eugenila, que por ter um grupo acetil provavelmente seja mais lipofílico e estável na sua aplicação.

3.4 ACETATO DE EUGENILA

O composto acetato de eugenila ($C_{12}H_{14}O_3$; 4-*alil*-2-metoxifenol acetato), representado na Figura 3, pode ser produzido via síntese química ou através da síntese enzimática (via biológica natural) pela acetilação do eugenol com anidrido acético, resultando em um líquido de cor amarelo pálido (PANDEY et al., 2013). Segundo a *European Food Safety Authority* - EFSA (2011), para propósitos de aplicação nos alimentos, é considerado seguro para consumo um nível de acetato de eugenila entre 1 - 5 mg/kg.

Figura 3 - Estrutura química de acetato de eugenila.



ACETATO DE EUGENILA

Fonte: Ayoola et.al., 2008.

O acetato de eugenila é usado nos alimentos como agente flavorizante, é insolúvel em água, tem vida de prateleira de pelo menos um ano em embalagens fechadas, e em condições favoráveis de temperatura e umidade. Uma característica em particular deste composto, é que é rapidamente absorvido no trato intestinal passando através do fígado, onde é metabolizado gerando produtos polares que logo passam a conjugar-se e a ser eliminados na urina. Enquanto o eugenol é excretado sem nenhuma modificação estrutural alguma, o acetato de eugenila é hidrolisado para eugenol e ácido carboxílico (EFSA, 2011). Por ser um éster do eugenol, não produz descoloração, a diferença dos detergentes feitos com eugenol, e ao mesmo tempo é uma molécula mais estável, porém, este éster não é muito usado em perfumes

devido a seu fraco poder aromático já que não tem mais o composto fenólico livre (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O acetato de eugenila foi descrito por Kwang-Geun e Takayuki (2001) como um agente antioxidante, sendo que este composto inibiu em 99% a oxidação do hexanal por 30 dias, em concentrações de 200 mg.mL⁻¹, já em concentrações de 50 mg.mL⁻¹ e 100 mg.mL⁻¹, a inibição foi de 76 e 85%, respectivamente, por 15 dias. A formação de malonaldeído foi inibida em 79% em concentração de 160 mg.mL⁻¹ de acetato de eugenila, podendo ser comparado aos antioxidantes α -tocoferol e BHT, os quais apresentaram, na mesma concentração, inibição de 96 e 97%, respectivamente.

Radhiah, Suhaila e Noordin (2010) observaram que o acetato de eugenila reduziu significativamente o aumento de açúcar no sangue e peroxidação dos lipídios. Além disso, este composto reduziu lesões nos tecidos dos olhos, músculos cardíacos e fígado de ratos. Já no estudo desenvolvido por Carrasco et al. (2008) foi observado que o acetato de eugenila apresentou atividade anticancerígena em células de câncer de próstata e câncer escamoso oral.

A atividade acaricida do acetato de eugenila foi relatada por Pasay et al. (2010), uma vez que o acetato de eugenila apresentou alta toxicidade, quando testado em ácaros de sarna humana. Além de acaricida, o acetato de eugenila também foi descrito como um potente antimicrobiano em um estudo desenvolvido por Chiaradia et al. (2012), onde foi observado que o acetato de eugenila apresentou maior potencial antimicrobiano, 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. Além disso, o acetato de eugenila evitou a descalcificação e promoveu a remineralização causada por erosão dentária. O efeito desse composto se mostrou distinto quando comparado com tratamentos convencionais, e apresenta menor toxicidade que os compostos fluorados (CHARU et al., 2012).

3.5 LIPASES

As enzimas são proteínas com propriedades catalíticas específicas, seletivas e atuam eficientemente em condições brandas (temperatura e pressão ambiente) transformando moléculas complexas. Entre o grande grupo das enzimas, destacam-se as lipases porque apresentam ampla especificidade, reconhecendo diversos substratos.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases), fisiologicamente, são um grupo especial das esterases, pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3 sendo designadas como uma sub-subclasse 3.1.1 devido a sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos, tendo como função biológica a conversão catalítica de gliceróis em di- ou monogliceróis, ácidos graxos e glicerol (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011; STERGIOU et al., 2013).

As lipases particularmente atuam na interfase água-óleo ou óleo água, ocorrendo uma ativação interfacial da enzima, fazendo com que sua atividade catalítica dependa do estado de agregação e estrutura do substrato, das propriedades moleculares da enzima e dos fatores que afetam as ligações enzima-substrato. Esta ativação envolve um rearranjo da estrutura, deixando livre o sítio ativo da enzima para que aconteça uma mudança conformacional na presença de gotas de óleo em água (PANDEY et al., 1999).

Devido à versatilidade das lipases em reações, de hidrólise e de síntese, porque são quimio-seletivas, régio-seletivas e enantio-seletivas (SETH et.al. 2014), podem atuar como catalisadores heterogêneos quebrando totalmente a molécula de triglicerídeos, assim como régio-especificamente liberar ácidos graxos das posições 1 e 3 dos acilglicerídeos, ou também para resolução de racematos. A estéreo-especificidade é difícil de realizar por síntese química, no entanto as lipases conseguem atuar efetivamente obtendo, além de compostos puros, boas quantidades de ésteres alifáticos e aromáticos, alcoóis, ácidos e lactonas, dependendo dos atributos desejados dos isômeros requeridos (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011).

As lipases podem ser produzidas e isoladas de fontes como bactérias, fungos, leveduras, tecidos animais, plantas e algas, apresentando cada uma, características próprias de especificidade, por exemplo, algumas lipases possuem afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (acético, butírico, ácido cáprico, etc.) enquanto outras têm preferência pelos ácidos graxos insaturados (oleico, ácido linoleico, etc.), e muitas outras são não-específicas mas atuam aleatoriamente separando os ácidos graxos dos triglicerídeos (PANDEY et al., 1999; PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011), dependendo das condições ou tipos de sistemas reacionais como, por exemplo, modificação de óleos e gorduras, esterificação, transesterificação, interesterificação, hidrólise, glicerólise, acidólise e aminólise (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; ROBLES-MEDINA, 2009; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), tendo um elevado potencial nas áreas de tecnologia de alimentos (margarinas, modificação de açúcares, leite enriquecido,

emulsificantes, agentes flavorizantes, sucos de frutas e produtos de pastelaria), ciência biomédica (remédios e fármacos) e indústrias químicas (biodiesel, pesticidas e outros ésteres com diversas aplicações) (PANDEY et al. 1999).

As lipases, como toda enzima, estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso, resultando em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a recuperação e reuso das mesmas, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual. Essas dificuldades podem ser superadas para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, pelo uso de enzimas na sua forma imobilizada. A técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (VILLENEUVE et al., 2000; DABDOUB et al., 2009; CIPOLATTI et al., 2014).

Entre as lipases mais estudadas estão as produzidas intracelular ou extracelularmente por micro-organismos, como *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. Sendo importante neste trabalho enfatizar a biocatálise enzimática desenvolvida especialmente pelas lipases comerciais Novozym 435 (lipase B produzida por *Candida antarctica* (CALB), imobilizada em resina acrílica macroporosa polar de carga positiva), Lipozyme RM IM (produzida por *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica) e Lipozyme TL IM (produzida por *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em resina fenólica granulada).

3.6 ACILAÇÃO VIA SÍNTESE ENZIMÁTICA

Muitas enzimas têm a capacidade de catalisar uma reação de acilação, sendo as mais efetivas as lipases (EC 3.1.1.3), elas catalisam a acilação de ambos grupos hidroxil (*O*-acilação) e amina (*N*-acilação) (FERRARI et al., 2014). As lipases em particular apresentam um elevado potencial por serem vantajosas quando são utilizadas em meios orgânicos anidrido, isto inclui o deslocamento do equilíbrio termodinâmico, favorecendo a síntese ao invés da reação de hidrólise, incrementando a solubilidade com os substratos não polares, eliminando reações adversas, facilitando a recuperação da mesma e incrementando a termoestabilidade (ALISSANDRATOS; HALLING, 2012). A seguir,

são descritos alguns estudos sobre a atuação das lipases em reações de acilação.

Salem et al. (2010) estudaram o uso da lipase Novozym 435 na acilação de flavonóides isoquercitrina com ésteres doadores do grupo acila (caprilato de etila, butirato de etila, palmitato de etila, etc.) formando ésteres flavonoides lipofílicos (isoquercitrina de caprilato, isoquercitrina de laurato, isoquercitrina de palmitato, etc.) via derivatização dos grupos hidroxila por substituintes lipofílicos, sendo uma vantagem na aplicação de alimentos e cosméticos porque eles demonstraram propriedades antioxidantes e antiproliferativas. Estudo semelhante foi desenvolvido por Stevenson et al. (2006), onde estudaram a biossíntese com a lipase Novozym 435 na acilação de glicosídeos flavonoides: naringina, isoquercetina, extrato de maçã e extrato de “blueberry”, usando ácidos carboxílicos como doadores do grupo acila: ácido palmítico, ácido cinâmico, ácido fenil propanoico (PPA), 2-hidroxiPPA, 4-hidroxiPPA e 3,4-hidroxiPPA, usando como solvente *t*-butanol (2-metil-2-propanol), na formação de compostos como éster de quercetina pentosido 4-hidroxiPPA, etc., tendo maior hidrofobicidade, solubilidade lipídica e maior atividade antioxidante em emulsões alimentícias.

Le Joubioux et al. (2013) partiram do fato de que amino-alcoóis acilados têm aplicação em indústrias farmacêuticas e cosméticas pelas propriedades antivirais, antioxidantes, antitumorais entre outras, onde usando Novozym 435 como catalisador, em 3 amino-alcoóis (alaninol, 4-amino-1-pentanol e 6-amino-1-hexanol) utilizando ácido mirfístico como doador do grupo acila, além de solventes orgânicos para facilitar a mistura dos reagentes. Observaram maior *N*-acilação em amino-alcoóis de cadeia curta e maior *O*-acilação em amino-álcool de cadeia longa.

Gao, Li e Zong (2013) estudaram a reação de acilação de glucosídeos pirimidina catalisada por lipase de *Penicillium expansum* imobilizada, usando ácido undecilênico como doador, 2-metiltetrahidrofuran (MeTHF) como bio-solvente. A lipase apresentou elevada atividade catalítica e boa estabilidade na formação dos 5'-*O*-ésteres lipofílicos, aos quais se atribui que possuem propriedade antiviral e antitumoral.

Li, Zong e Ma (2009) acilaram floxuridina com grupos acila de ésteres vinílicos (butirato de vinilo, cinamato de vinila, pivalato de vinila, etc.) para formar ésteres derivados 5'-hidroxila preferencialmente, via biocatálise enzimática com Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), sendo que o reconhecimento das enzimas

pelos grupos acila está diretamente relacionado com a estrutura do sítio ativo, tamanho, forma e propriedades físico-químicas da lipase.

Horchani et al. (2010a) modificaram os grupos OH do amido para formar ésteres amido de ácidos graxos, usando uma lipase não comercial produzida por *Staphylococcus aureus* e imobilizada em CaCO₃, em um meio reacional amido/ácido oleico, empregando micro-ondas como fonte de calor.

Yang et al. (2010a) imobilizaram uma lipase produzida por *Penicillium expansum* para ser utilizada na acilação de arbutina (hidroquinona glicosilada) com butirato de vinilo, reação chamada butanoilação. Os derivados acilados de arbutina obtidos foram ésteres de 6'-regioseletividade (> 99% de conversão) os quais se atribui maior poder antioxidante e regulador da melanogênese (pigmentação da pele). Assim também, Yang et al. (2010b), exitosamente acilaram (usando a mesma lipase) arbutina com ésteres vinílicos de ácidos graxos (propiónico, butírico e valérico) na formação de 6'-*O*-ésteres arbutina.

Santos et al. (2007) compararam a afinidade catalítica de duas lipases de *Candida rugosa* imobilizadas experimentalmente, uma em copolímeros de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB) e outra em sílica de poros controlados (CPS), com uma terceira lipase comercial, Novozym 435, na produção de ésteres de butila, a partir de *n*-butanol e ácidos orgânicos (butírico, caprílico e láurico) como doadores do grupo acila, em sistema livre de solvente. Os autores determinaram que a enzima imobilizada em STY-DVB teve maiores conversões com o ácido graxo láurico (C12), a outra enzima imobilizada em CPS teve maior afinidade por o ácido graxo caprílico (C8) e a Novozym 435 conduziu a maiores conversões com ácido graxo de cadeia curta, ácido butírico (C4).

Visando à ampla aplicação das lipases em reações de acilação na formação de ésteres, pode-se afirmar que a biocatálise é uma alternativa interessante para a preparação de compostos sintetizados porque oferece uma via limpa no desenvolvimento de processos químicos em condições brandas, com elevado grau de seletividade (ALISSANDRATOS; HALLING, 2012). Isto é, no caso da conversão via acetilação enzimática posicionar as cadeias acila dos grupos acetil em posições específicas, devido às características de régio-especificidade e estereo-especificidade das lipases, que conduz à formação de ésteres de maior pureza (HORCHANI et al., 2010a).

3.6.1 Acetilação enzimática

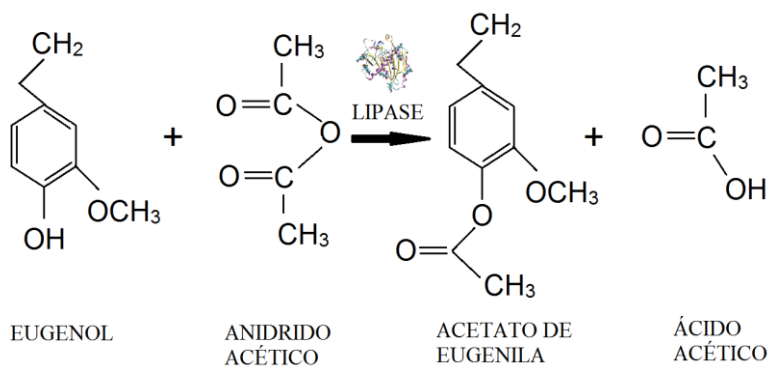
O uso de solventes facilita muito as reações químicas heterogêneas, sobretudo em presença de uma substância tampão, porém, estas reações apresentam desvantagens tais como a toxicidade dos solventes, assim como formação de produtos secundários indesejados (devido a baixa seletividade da síntese química), o que requer etapas subsequentes de purificação, tendo risco de manter ainda resíduos tóxicos no produto final, são tratamentos que elevam os custos de produção. Além disso, produtos obtidos via síntese química não podem ser rotulados como naturais, mesmo que obtidos a partir de substratos naturais.

Já os produtos obtidos via síntese enzimática podem ser rotulados como naturais, desde que sejam obtidos a partir de substratos naturais, em sistema livre de solvente, e que o produto obtido seja de estrutura conhecida (LONGO; SANROMÁN, 2006). A crescente demanda por produtos naturais faz que muitas investigações tenham sido direcionadas na busca de novas estratégias para a produção de compostos naturais. Como por exemplo, Palocci et al. (2007) mostraram que a lipase livre produzida por *Candida rugosa* foi capaz de catalisar régio-seletivamente o metil 6-*O*-tritol β -D-glucopiranosido com acetato de vinila como doador do grupo acetil em um sistema de CO₂ supercrítico, atuando como solvente não tóxico, obtendo uma conversão de 91,4% em éster metil 3-*O*-acetil 6-*O*-tritol β -D-glucopiranosido. Assim também, Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu (2002) estudaram a produção enzimática de isoamil acetato em sistema livre de solvente. Utilizando a Novozym 435, em 6 horas de reação, razão molar ácido acético/álcool isoamil de 1:2, 30 °C, 150 rpm, com adição de 5% de enzima (g/g substratos), obtiveram 80% de conversão.

Pode-se notar que o uso de lipases como biocatalisadores proporciona uma série de vantagens porque além de ser uma tecnologia limpa, elas são seletivas e reagem onde os catalisadores químicos não conseguem, são altamente específicas e reduzem as reações colaterais. Além disso, tanto o produto quanto o biocatalisador podem ser facilmente recuperados. O custo da biocatálise pode ser considerado equivalente aos custos dos processos químicos, uma vez que deve-se considerar os custos de processamento (altas temperaturas, consumo de energia, purificação entre outros) e de tratamento dos resíduos tóxicos gerados (PANDEY et al. 1999; LIAQUAT; APENTEN, 2000). Aliado a estas vantagens, é importante o uso de sistemas livres de solventes orgânicos na síntese de ésteres aromáticos, por ser em sistemas

compactos, apresentam produtividade volumétrica mais elevada e exigem menores concentrações de catalisadores em relação aos reagentes (CHATTERJEE; BHATTACHARYYA, 1998). Além disso, com o uso de sistema livre de solvente é possível reduzir os custos e problemas de toxicidade, associados à recuperação do solvente. A eliminação de solventes dos meios reacionais contribui para a redução do impacto ambiental, já que a maioria dos solventes orgânicos são agentes poluidores (GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002; SANTOS et al., 2007).

Figura 4 - Síntese de acetato de eugenila por acetilação direta do eugenol com anidrido acético.



3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Um novo interesse na adição de especiarias como antimicrobianos em alimentos é evidente por muitas razões. Primeiramente, porque o uso de aditivos sintéticos ultimamente está sendo questionado por sua seguridade nos alimentos, enquanto as substâncias naturais originárias de plantas são melhor recebidas pelos consumidores. A redução de sal e de açúcar nos alimentos devido às dietas induz ao uso de especiarias que possuam baixos teores de sódio e que ajudem com uma quantidade quase insignificante de calorias nas quantidades comumente adicionadas. Misturas de especiarias são ótimas substituintes de sal nos alimentos. Tem-se sugerido que o incremento no consumo das especiarias pode produzir bactérias responsáveis da

digestão no trato intestinal as quais podem reduzir a incidência de câncer (SHELEF, 1983).

Além de conferir aroma e sabor, as especiarias e as ervas aromáticas têm ação antimicrobiana. Os óleos essenciais derivados das especiarias e plantas aromáticas possuem atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Desta forma, como apresentado nos tópicos anteriores, os compostos presentes no óleo essencial, tais como terpenos oxigenados e hidrocarbonetos (por exemplo, eugenol, humuleno, eucaliptol, torreyol, e γ -cadineno) apresentam características antimicrobianas porque podem acumular-se na membrana microbiana causando uma perda da integridade da membrana, ocorrendo o vazamento do conteúdo citoplasmático, a dissipação da força motriz de prótons e consequentemente lise celular (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Acredita-se que o eugenol, um fenólico encontrado como composto principal no óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* L.), apresenta propriedade antibacteriana pela inibição da síntese de enzimas extracelulares e ruptura da estrutura da parede celular, resultando em falta de citoplasma, granulação do citoplasma, hiperacidez citoplasmática, e esgotamento de ATP intracelular (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

3.8 CONSIDERAÇÃO SOBRE O ESTADO DA ARTE

A demanda atual por alimentos naturais é cada vez maior. A substituição de aditivos sintéticos nos alimentos gera uma procura de aditivos alternativos naturais, benéficos para a saúde. A produção de ésteres antimicrobianos a partir de plantas ou frutos torna-se uma alternativa efetiva, uma vez que atuam como conservantes nos alimentos, graças às propriedades biológicas que apresentam na sua composição botânica. Os óleos essenciais, presentes nas plantas, são os precursores das propriedades biológicas. Em particular, o óleo de cravo-da-índia destaca-se entre óleos como de tomilho, canela e menta, por possuir elevada atividade antioxidante, antimicrobiana entre outras, sendo estas propriedades atribuídas ao seu composto majoritário: eugenol. Na literatura demonstrou-se que derivados de compostos fenólicos pela adição de grupos funcionais na molécula, apresentam melhores propriedades biológicas. Por isso, surge como alternativa

modificar a molécula de eugenol com a visão de produzir um éster acetato de eugenila.

Seguindo a tendência de produzir compostos naturais, surge a proposta de produzir acetato de eugenila em um sistema *eco-friendly*, livre de solvente, que seria neste caso, uma reação de acetilação através de biocatalisadores enzimáticos, uma vez que oferecem enantio- e régio-especificidade atuando em condições brandas, reduzindo a formação de compostos indesejados, e facilitando a purificação do composto produzido. Este fato, aliado à fundamentação teórica apresentada neste capítulo, permite justificar a realização deste trabalho, cujo maior objetivo reside no estudo da produção enzimática de éster acetato de eugenila em sistema livre de solvente, no que diz respeito à otimização das condições operacionais do processo fazendo uso da ferramenta do planejamento de experimentos, da avaliação de cinéticas, do reuso do catalisador na condição otimizada do processo, e da avaliação da atividade antimicrobiana do éster obtido: acetato de eugenila.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à otimização da conversão da reação de acetilação enzimática para obtenção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) e na central de análise, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Enzimas

- Novozym 435 - lipase comercial de origem microbiana, produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina macroporosa polar de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária - PR. A enzima atua randomicamente nas posições 3 do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 - 2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40 - 70 °C, atividade específica 10,000 U/g (DAMSTRUP et al., 2005; WANG et al., 2014).
- Lipozyme RM IM - lipase comercial produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária - PR. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicerídeo. O tamanho de partícula entre 0,2 - 0,6 mm, densidade entre 350 - 450 Kg/m³ e conteúdo de água entre 2 - 3%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30 - 70 °C.
- Lipozyme TL IM - lipase produzida por fermentação submersa de *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em resina fenólica e adequada para aplicação em reatores de leito fixo, pelo fato de ser granulada, pela Novozymes Brasil/ Araucária - PR. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicerídeo. É

recomendável o uso em solventes orgânicos, uma vez que em meio aquoso, o suporte pode sofrer solvatação. Atividade catalítica: 75 IUN.g⁻¹; densidade 0,42 g.mL⁻¹; diâmetro de partícula: 0,3 - 1,0 mm; conteúdo de água: 5%.

4.1.2 Reagentes

- Óleo essencial de folha de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllus*), cujas especificações fornecidas por laudo do fornecedor encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações técnicas do óleo essencial de folha do cravo-da-Índia.

Características	Especificações
Aparência	Líquido
Cor	Amarelo Palha a Castanho
Impurezas	Isento
Odor	Típico tempero
Densidade (20 °C)	1,030 - 1,050
Índice de Refração (20 °C)	1,520 - 1,540
Principais componentes (aprox.)	Eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂) = 85%

Fonte: Fornecedor FERQUIMA.

- Anidrido acético (Ac₂O) ou C₄H₆O₃ (Sigma-Aldrich, ≥ 98% pureza);
- Hexano C₆H₁₄ (Sigma-Aldrich, ≥ 98,5% pureza);
- Para as análises cromatográficas foi utilizado o padrão de acetato de eugenila C₁₂H₁₄O₃, ≥ 98% pureza, de procedência Sigma-Aldrich. Para o preparo das soluções foi utilizado como solvente Diclorometano - CH₂Cl₂ (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza).

4.1.3 Equipamentos

Dentre os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, pode-se citar:

- Balança Eletrônica de Precisão GEHAKA BG 200;
- Balança Analítica DIGIMED KN 500;

- Estufa de cultura 502 ORION[®], marca FANEM[®] São Paulo - Brasil;
- pHmetro digital 827 pH lab, marca METROHM Swissmade;
- Dessecador;
- Shaker Bew Brunswick (da Eppendorf Company), modelo EXCELLA E25R, 120 volts, 60 hertz, 1500 VA.
- Incubadora shaker com agitação orbital MA 410/CFT, marca MARCONI, 220 volts, 700 watts.
- Banho termostatizado com shaker marca DUBNOFF;
- Rota-evaporador acoplado com bomba a vácuo e banho termostatizado;
- Freezer modelo Electrolux RE28, 220 volts;
- CG/FID Shimadzu modelo 2010, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida INOWAX.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Aparato experimental para a síntese enzimática de acetato de eugenila em sistema livre de solvente.

Os ensaios para sintetizar acetato de eugenila foram realizados em mistura reacional contendo óleo essencial de folha de cravo-da-Índia como fonte de eugenol e anidrido acético. Após dissolução completa dos substratos (Figura 5a), a enzima foi adicionada (Figura 5b), sendo o tempo reacional contado a partir da adição da mesma. Todos os ensaios realizados com temperaturas até 60 °C foram conduzidos em shaker com agitação orbital (Figura 6). Os ensaios com temperaturas superiores a 60 °C foram realizados em banho termostatizado com agitação orbital (Figura 7). Após o término do tempo de reação, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro e solvente orgânico para uma maior remoção do acetato de eugenila aderido ao suporte da enzima e nas paredes dos frascos (Figura 9). As amostras foram evaporadas a vácuo por 10 min a 40 °C (Figura 10). Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração, para posterior análise.

Figura 5 - (a) Mistura reacional óleo essencial de folha de cravo-da-Índia e anidrido acético, e (b) Mistura reacional óleo essencial de folha de cravo-da-Índia, anidrido acético e enzima.

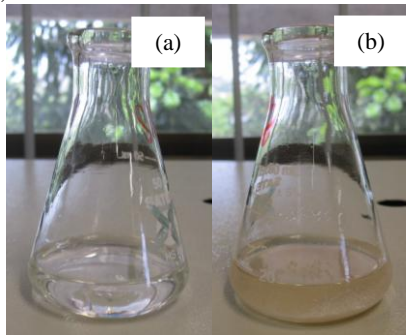


Figura 6 - Shaker com agitação orbital, usando no ensaios para síntese enzimática de acetato de eugenila



Figura 7 - Banho termostatizado com agitação orbital, usando no ensaios para síntese enzimática de acetato de eugenila.

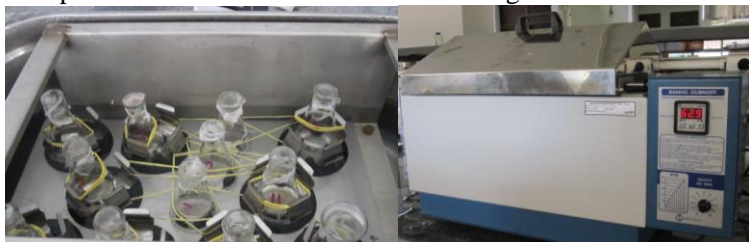


Figura 8 - Filtração do acetato de eugenila com hexano em papel filtro.



Figura 9 - Rota-evaporador acoplado a bomba vácuo e banho de aquecimento.



4.2.2 Influência da umidade inicial no suporte das enzimas na conversão de acetato de eugenila

A fim de avaliar se a umidade presente no suporte das enzimas interferia na conversão em ésteres de acetato de eugenila, as enzimas foram submetidas a uma secagem em estufa a 40 °C por 1 h antes de serem adicionadas ao sistema reacional. Também foram realizados ensaios sem prévia secagem dos catalisadores. Os catalisadores empregados foram as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Todos os ensaios foram realizados em shaker com agitação orbital nas seguintes condições experimentais: concentração de enzima 5,5% (m/m) em relação à massa total de substratos, razão molar eugenol:anidrido acético 1:3, temperatura 50 °C, velocidade de agitação 150 rpm, tempo 2 h.

4.2.3 Seleção do melhor biocatalisador para produção de acetato de eugenila

Foram realizados três experimentos para determinar qual enzima é a mais efetiva para a produção de acetato de eugenila. As enzimas testadas foram as lipases comerciais: Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Foram empregadas as mesmas condições experimentais otimizadas por Chiaradia et al. (2012), na produção de acetato de eugenila, via síntese catalisada por Novozym 435, onde as melhores condições para uma elevada conversão em acetato de eugenila foram: concentração de enzima 5,5% (m/m em relação à massa total de substratos), razão molar eugenol:anidrido acético 1:3, temperatura 50 °C, velocidade de agitação 150 rpm e tempo de reação de 2 h.

4.2.4 Determinação da velocidade de agitação do sistema reacional na produção de acetato de eugenila

Uma vez determinado o catalisador a ser empregado bem como sua prévia preparação, ensaios posteriores foram realizados, a fim de determinar a melhor velocidade de agitação no sistema reacional para a produção de acetato de eugenila. A faixa de agitação avaliada foi de 100 a 200 rpm, nas seguintes condições experimentais: concentração de enzima 5,5% (m/m) em relação à massa total de substratos, razão molar eugenol:anidrido acético 1:3, temperatura 50 °C e tempo de reação de 2 h.

4.2.5 Otimização da produção enzimática de acetato de eugenila

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a síntese do éster acetato de eugenila, resultante da reação de acetilação, foi realizada uma estratégia sequencial de planejamentos fatoriais.

Inicialmente optou-se por um planejamento experimental completo 2^3 com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. O tempo da reação foi fixado em 2 horas com 150 rpm de agitação. As faixas de temperatura (T), razão molar (RM) e concentração de enzima [E] avaliadas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 , para produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como biocatalisador.

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

^a eugenol:anidrido acético

Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^2 e com triplicata do ponto central, totalizando 7 experimentos, apresentados na Tabela 3. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da razão molar e da temperatura, mantendo-se fixos, além do tempo de reação (2 h), a concentração de enzima (5% m/m) e a velocidade de agitação (150 rpm).

Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção de acetato de eugenila empregando Lipozyme TL IM como biocatalisador.

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

^a eugenol:anidrido acético

4.2.6 Estudo cinético da produção enzimática de acetato de eugenila

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas no processo enzimático, os efeitos da razão molar (RM) e da concentração da enzima [E] na cinética da reação foram avaliados para cada sistema reacional. Os tempos avaliados foram 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 minutos. As razões molares e concentrações da enzima [E] (%m/m substratos) utilizadas no estudo são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Efeito da concentração de enzima entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.

Temperatura (°C)	Razão molar (mol/mol) ^a	[E] (% m/m)
70	1:9	1, 5, 10

^aeugenol:anidrido cético**Tabela 5** - Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de acetato de eugenila.

Temperatura (°C)	Razão molar (mol/mol) ^a	[E] (% m/m)
70	1:1; 1:5; 1:9; 1:12	5

^aeugenol:anidrido cético

4.2.7 Estudo de sucessivos ciclos de uso da enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente

Partindo da condição otimizada, para o teste de reuso da enzima foram consideradas as seguintes condições: razão molar de 1:5 eugenol:anidrido acético, temperatura 70 °C, 5% (m/m) de enzima em relação à massa total de substratos, tempo reacional 2 h e agitação 150 rpm. A enzima recuperada foi filtrada e lavada com 30 mL de hexano para retirar os resíduos remanescentes da reação. Após secagem em estufa a 40 °C por 4 h, a enzima foi colocada no dessecador por 18 h. A enzima recuperada foi novamente utilizada em um meio reacional, nas condições experimentais do primeiro uso. Assim, sucessivamente a enzima foi testada até observar um declínio na conversão em acetato de eugenila.

4.2.8 Determinação da velocidade específica da reação

A velocidade específica de reação é calculada através da Equação 1 (HAGENS, 2006).

$$v = m / (mc.t) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

v: velocidade específica da reação ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$);

m: massa da substância convertida (g);

mc: massa de catalisador (g);

t: tempo (h)

4.2.9 Quantificação de acetato de eugenila

A quantificação dos ésteres de acetato de eugenila foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida RT x-WAX (30 m x 0,25 mm i.d.), 0,25 μm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40 - 150 °C (10 °C/min), 150 - 220 °C (10 °C/min), 220 °C (5 min), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste N_2 (56 kPa), volume injetado 1,0 μL de amostra diluída em diclorometano (2:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante eugenol.

4.2.10 Purificação da amostra otimizada de acetato de eugenila

Para as análises de RMN- ^1H e atividade antimicrobiana, os ésteres foram purificados em rota-evaporador a vácuo a 40 °C durante 8 h. Confirmou-se a purificação de acetato de eugenila por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC/FID, nas mesmas condições empregadas na quantificação dos ésteres.

4.2.11 Identificação de acetato de eugenila

Os espectros da Ressonância Magnética Nuclear RMN- ^1H foram obtidos no laboratório da 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 como padrão interno e clorofórmio- d_1 (CDCl_3) como solvente.

4.2.12 Atividade antimicrobiana

Para a realização dos testes antimicrobianos, foi utilizada a metodologia de difusão em placas, sendo que doze micro-organismos foram selecionados, entre eles Bactérias 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 Lúria Bentani (10 g/L de tripton, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) durante 24 horas a 36 ± 1 °C.

Os referidos testes foram realizados pelo método de difusão em discos de papel Whatmann n° 3 com 9 mm de diâmetro, em placas de Petri com meio de cultura Ágar Müeller-Hinton. As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril nas placas num volume de 100 µL. Em cada placa foi depositado um disco de controle negativo (branco), na avaliação do potencial antimicrobiano do acetato de eugenila os discos continham 20 µL de volume. Após a incubação das placas a 36 ± 1 °C durante 24 horas, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com o auxílio de uma régua.

Os resultados foram expressos em mm pela média aritmética dos valores 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).

4.2.13 Análise estatística

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 Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, relacionados à acetilação enzimática do eugenol em sistema livre de solvente, assim com a verificação do efeito das variáveis do processo, temperatura, razão molar entre os substratos, concentração de enzima e agitação na produção de acetato de eugenila utilizando a técnica de planejamento experimental. Também serão expostos estudos cinéticos, análise Ressonância Magnética Nuclear - RMN e análise da atividade antimicrobiana do acetato de eugenila obtido.

Inicialmente, avaliou-se a produção de acetato de eugenila empregando três biocatalisadores, além da influência da umidade inicial dos mesmos na produção de acetato de eugenila.

5.1 SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR E INFLUÊNCIA DA PERCENTAGEM DE UMIDADE INICIAL NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA

Nesta etapa foram utilizadas as condições otimizadas obtidas por Chiaradia et al. (2012), para uma elevada conversão em acetato de eugenila, as quais foram: concentração de enzima 5,5% (m/m) 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. Na Tabela 6 é apresentada a influência dos biocatalisadores, assim como a umidade inicial dos mesmos nas condições experimentais da reação de acetilação enzimática para obtenção de acetato de eugenila.

Tabela 6 - Seleção do melhor biocatalisador e influência da umidade inicial no suporte dos mesmos, nas condições experimentais da reação de acetilação enzimática para produção de acetato de eugenila.

Tratamento	Acetato de eugenila (%)		
	Novozym 435	Lipozyme TL IM	Lipozyme RM IM
Sem secagem prévia	41,37 ± 2,02	87,21 ± 7,64	67,11 ± 8,41
Com secagem 40 °C/1 h	65,36 ± 4,52	85,86 ± 5,75	53,06 ± 3,65

Pode-se 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. Assim, a Lipozyme TL IM foi considerada como o biocatalisador mais específico para o sistema reacional formado por eugenol e anidrido acético.

A fim de avaliar se a umidade inicial, presente nos suportes de imobilização dos biocatalisadores, influenciava na produção de acetato de eugenila, ensaios foram realizados empregando uma secagem prévia das enzimas imobilizadas em estufa a 40 °C por uma hora, comparando com os biocatalisadores usados na reação de acetilação sem secagem prévia. Pode-se notar influência da umidade inicial dos suportes dos biocatalisadores na produção de acetato de eugenila. Com a Novozym 435 se teve um aumento da produção de acetato de eugenila, de 41,37 para 65,32%, no caso da Lipozyme TL IM diminuiu de 87,21 para 85,86%, da mesma forma que Lipozyme RM IM de 67,11 para 53,06%.

Em quanto ao poder catalítico das lipases pode-se observar que é influenciado pelas características dos suportes usados na imobilização de cada tipo de lipases, sendo a Novozym 435 (lipase de *C. antarctica* fração B) imobilizada em resina, a Lipozyme TL IM (lipase de *T. lanuginosus*) imobilizada em resina acrílica, e a Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei*) imobilizada em resina por intercâmbio iônico (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008), os que dependendo de suas características de transferência de massa, facilitam ou não à catálise enzimática.

Além disso, o uso da Lipozyme TL IM como biocatalisador apresenta uma vantagem de importância econômica industrial, já que comparada com os elevados custos das enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM, este catalisador apresenta um custo reduzido, fato

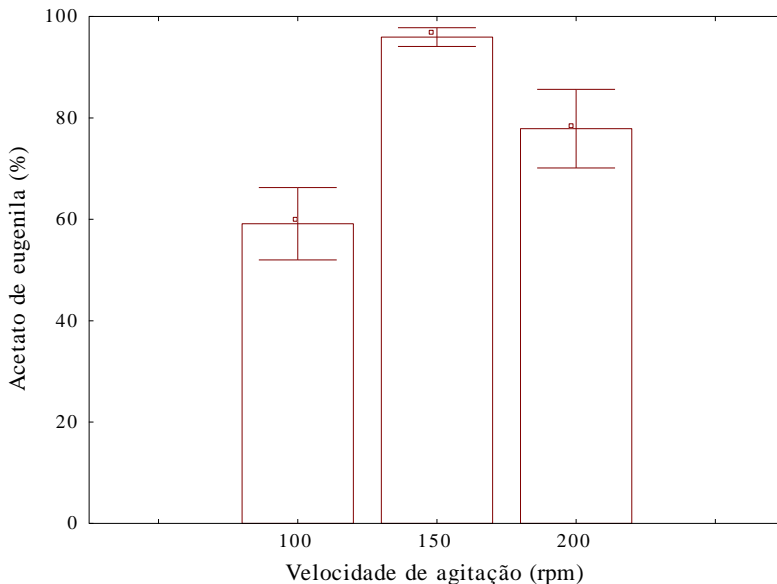
que pode vir a viabilizar economicamente o processo de produção enzimática de acetato de eugenila em sistema livre de solvente.

Assim, a enzima Lipozyme TL IM foi selecionada como biocatalisador mais adequado para a reação de acetilação no sistema reacional formado por eugenol e anidrido acético, porque demonstrou maiores conversões de acetato de eugenila, sendo que a diferença entre as conversões sem secagem ou com secagem prévia foi pequena, então optou-se por utilizar a enzimas sem secagem prévia nos ensaios futuros.

5.2 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA

A influência da velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm) no sistema reacional para produção de acetato de eugenila, foi avaliada nas condições: concentração de enzima Lipozyme TL IM 5,5% (m/m de substrato), razão molar 1:3 mol de eugenol:mol de anidrido acético, temperatura 50 °C e tempo reacional 2 h; como demonstra a Figura 10.

Figura 10 - Efeito da velocidade de agitação sobre a conversão de acetato de eugenila usando o biocatalisador Lipozyme TL IM em sistema livre de solvente. Média (n=3), $p < 0,05$.



Pode-se observar que com 100, 150 e 200 rpm de velocidade de agitação obteve-se conversões de 59,12, 96,63 e 77,89% de acetato de eugenila, respectivamente. Desta forma, 150 rpm foi empregado como velocidade de agitação para a reação de acetilação de eugenol com anidrido acético via síntese enzimática com Lipozyme TL IM em sistema livre de solvente. O mesmo resultado foi obtido por Chiaradia et al. (2012), na qual concluíram que 150 rpm de velocidade de agitação foi a melhor para produção de acetato de eugenila, em sistema reacional contendo eugenol e anidrido acético, catalisado por Novozym 435.

5.3 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA

O planejamento experimental é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência em um determinado processo, assim como avaliar possíveis interações entre elas. Além disto, esta ferramenta permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de minimizar os problemas e maximizar a informação, precisão e exatidão nos resultados. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (HAALAND, 1989).

Visando as vantagens que proporcionam os planejamentos experimentais decidiu-se estudar neste trabalho, primeiramente, um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, num total de 11 ensaios, os quais avaliaram o efeito da razão molar (1:1, 1:3 e 1:5 mol eugenol:mol anidrido acético), temperatura (40, 50 e 60 °C) e concentração de enzima (5, 10 e 15% m/m em relação aos substratos), na procura da melhor condição para a produção de acetato de eugenila.

A Tabela 7 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 biocatalisador, em 2 horas de reação e 150 rpm de velocidade de agitação.

Tabela 7 - 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 biocatalisador.

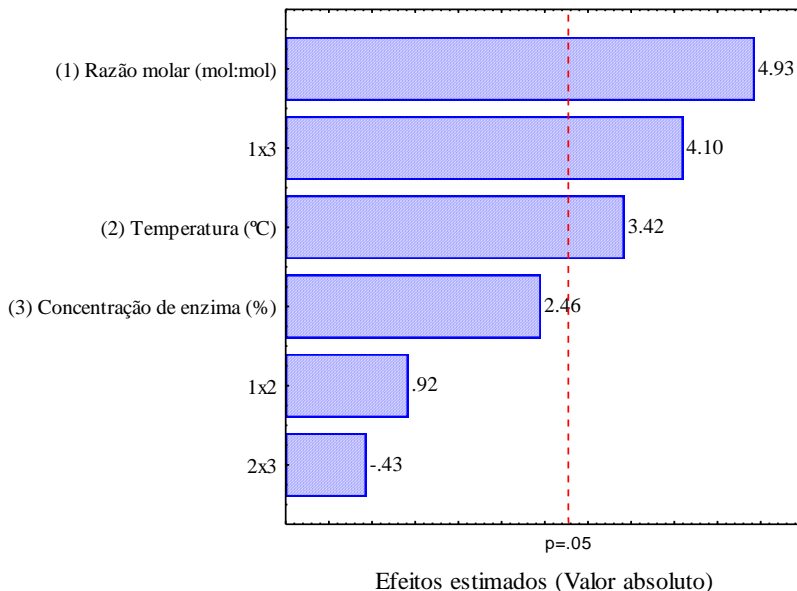
Ensaio	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Concentração de enzima (% m/m)	Conversão (%)
1	1:1 (-1)	40 (-1)	5 (-1)	30,06
2	1:5 (1)	40 (-1)	5 (-1)	38,89
3	1:1 (-1)	60 (1)	5 (-1)	53,58
4	1:5 (1)	60 (1)	5 (-1)	52,76
5	1:1 (-1)	40 (-1)	15 (1)	33,45
6	1:5 (1)	40 (-1)	15 (1)	63,53
7	1:1 (-1)	60 (1)	15 (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

^aeugenol:anidrido acético

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:mol anidrido acético, a 60 °C de temperatura e 15% de enzima. Os outros ensaios apresentaram conversões menores a 50% com exceção do ensaio 6 que teve 63,53% de conversão de acetato de eugenila, também com razão molar 1:5 e 15% de enzima, porém, com 40 °C de temperatura.

Os resultados de conversão em acetato de eugenila apresentados na Tabela 7 foram tratados estatisticamente onde os efeitos absolutos estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito entre as variáveis razão molar, temperatura e concentração de enzima, bem como as interações entre estas variáveis, na produção de acetato de eugenila ($p < 0,05$).



O princípio do diagrama de Pareto é demonstrar a relação dos fatores que têm pouco ou grande efeito na reação, ou seja, alguns fatores são "ativos" e os restantes são "inertes", o que pressupõe que, dos efeitos calculados sobre os fatores e suas interações, apenas alguns serão importantes (HAALAND, 1989). Com base na explicação de Haaland (1989), o diagrama de Pareto da Figura 11 demonstra que a razão molar entre os substratos e a temperatura apresentam um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão de acetato de eugenila, os quais são considerados fatores ativos, cujo aumento conduz a maiores conversões, do contrario, a concentração da enzima apresentou efeito não significativo positivo sobre a conversão em acetato de eugenila, o qual faz que seja um efeito inerte. Também pode-se observar um efeito significativo positivo na interação razão molar e concentração de enzima. Com base nestes resultados significativos do primeiro planejamento experimental, foi realizado um outro planejamento (apresentado na Tabela 8), mas neste caso somente duas variáveis tiveram seus níveis aumentados e avaliados: razão molar (mol:mol) e

temperatura (°C); mantendo constante a concentração de enzima (5% m/m de substrato), tempo de reação (2 h) e de velocidade de agitação (150 rpm).

Tabela 8 - 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 biocatalisador.

Ensaio	Razão molar (mol:mol) ^a	Temperatura (°C)	Conversão Observado (%)	Conversão Predita (%)	DPR (%)
1	1:5 (-1)	50 (-1)	25,03	23,08	7,78
2	1:9 (1)	50 (-1)	47,71	45,76	4,08
3	1:5 (-1)	70 (1)	83,54	81,60	2,32
4	1:9 (1)	70 (1)	82,58	80,64	2,35
5	1:7 (0)	60 (0)	54,76	57,77	5,50
6	1:7 (0)	60 (0)	54,30	57,77	6,40
7	1:7 (0)	60 (0)	56,51	57,77	2,24

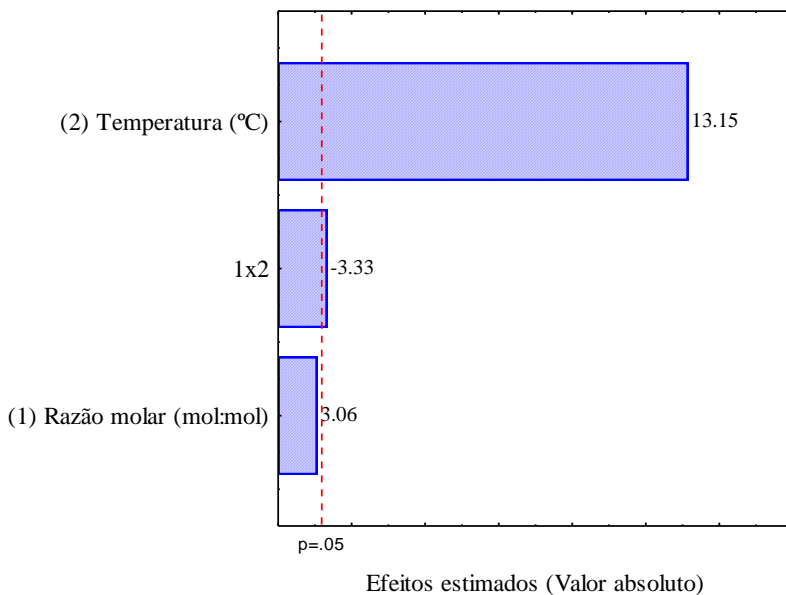
^aeugenol:anidrido acético

DPR: Desvio padrão relativo

Pode-se observar na Tabela 8 que as maiores conversões em acetato de eugenila foram obtidas nos ensaios 3 e 4, ambos a 70 °C de temperatura, com razão molar 1:5 e 1:9 mol de eugenol:mol de anidrido acético, respectivamente. Desta forma, a partir deste segundo planejamento fatorial, se considera como a melhor condição o ensaio 3, que tem menor excesso de anidrido acético em comparação do ensaio 4.

Também os resultados obtidos na Tabela 8 foram analisados estatisticamente, onde permitiram ser avaliados no diagrama de Pareto, mostrado na Figura 12.

Figura 12 - 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 ($p < 0,05$).



O diagrama de Pareto da Figura 12 demonstra que a variável razão molar teve efeito não significativo positivo, e o efeito da temperatura teve efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na produção de acetato de eugenila. Resultado semelhante foi obtido por Lerin (2010), onde maiores valores de temperatura e um excesso de ácido palmítico parecem promover um melhor sistema de reação para obtenção de ascorbil palmitato, sendo que a máxima conversão foi de 67,34% em 17 h de reação, com razão molar de ácido L-ascórbico e ácido palmítico de 1:9 e temperatura de 70 °C.

Aumentar a temperatura (> 70 °C) poderia ser de grande ajuda para obter a melhor condição otimizada, mas no caso deste trabalho, decidiu-se fixar a temperatura em 70 °C, para evitar afetar a ação do biocatalisador Lipozyme TL IM em temperaturas maiores. Richetti (2009) mencionou que as lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM, possuem temperatura ótima na faixa de 50 a 70 °C; e comprovou isto na esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila, onde as maiores conversões atingidas na faixa dos 70 °C, próxima à temperatura ótima das enzimas. Wang et al. (2014) acilaram amido de milho com ácido

palmítico via síntese enzimática (Novozym 435), em sistema livre de solvente, para formação de ésteres metila de ácido palmítico. Entre as temperaturas testadas (de 55 até 75 °C) consideram como ótima a temperatura de 60 °C, na qual conseguiram uma conversão de 76,50%, devido a que o aumento de temperatura causou menores conversões.

Em quanto à razão molar, pode-ser observar na Figura 12, que está próximo a ser significativo, sendo que maior concentração de anidrido acético na reação produz um efeito significativo positivo. Mas como produto final, acetato de eugenila, é preferível obter ele o mais puro possível, o que leva a decisão de manter a razão molar mais baixa do segundo planejamento, que seria de 1:5, evitando assim gastar mais tempo na etapa de purificação.

A análise estatística dos resultados da Tabela 8 também permitiu a construção de um modelo empírico codificado para a conversão de 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), apresentado na Tabela 9. Verifica-se que o valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9847 sugere que o modelo gerado na Tabela 9 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.

Tabela 9 - Análise de variância para produção de acetato de eugenila.

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			

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

*Termos estatisticamente significativos a 95% de confiança.

A Equação 2 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

$$AE(\%) = 57,77 + 5,43 * RM + 23,35 * T - 5,91 * RM * T \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

AE: Acetato de eugenila (%)

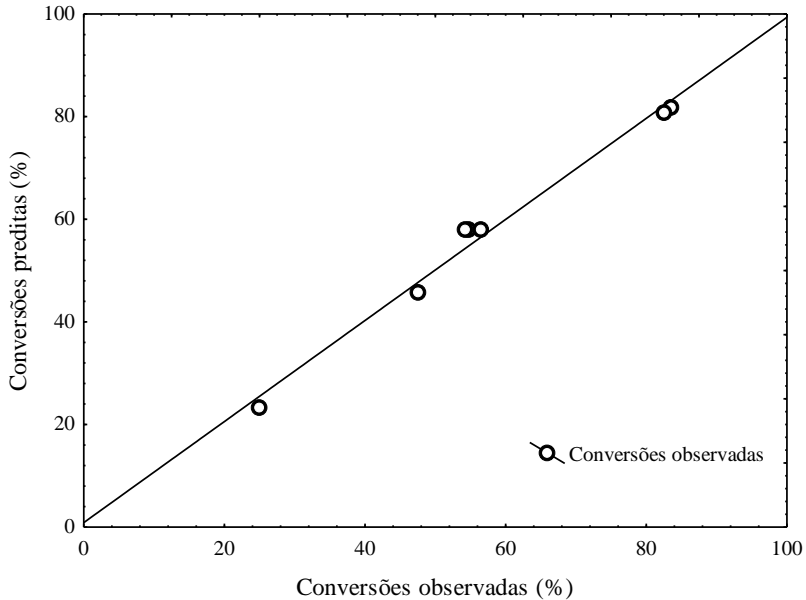
RM: Razão molar (mol de eugenol: mol de anidrido acético)

T: Temperatura (°C)

O modelo da Equação 2 mostra que as variáveis razão molar e temperatura apresentam um efeito significativo positivo ($p < 0,05$) e a interação entre estas variáveis um efeito negativo sobre a conversão de acetato de eugenila. Este modelo foi capaz de representar bem os dados experimentais de conversão de acetato de eugenila no intervalo dos fatores investigados, o qual permitiu a construção do diagrama de conversões preditas *vs.* observadas apresentado na Figura 13, e da superfície de resposta apresentada na Figura 14. Isso implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo empírico, conforme ilustrado pela conversão predita (coluna 5 da Tabela 8) e o desvio padrão relativo (DPR) (coluna 6 da Tabela 8).

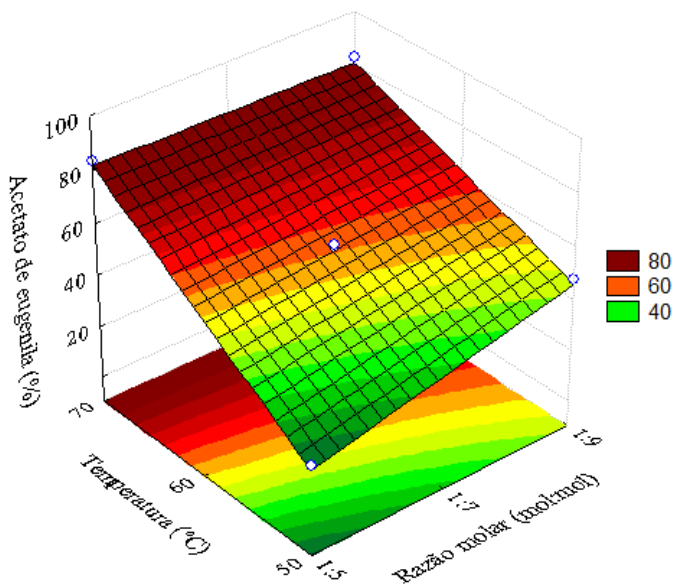
Na Figura 13 pode-se observar que os pontos dispersos (conversões observadas) estão quase próximos à linha (conversões preditas), estando em concordância com os resultados da Tabela 8, onde tem-se $2\% < 8\%$ de desvio padrão relativo - DPR.

Figura 13 - Diagrama de conversões previstas vs. conversões observadas para a produção de acetato de eugenila via síntese enzimática.



A Figura 14 mostra a superfície de resposta para produção de acetato de eugenila (%) em função da razão molar (mol de eugenol: mol de anidrido acético) e da temperatura (°C). Esta figura permite uma clara visualização dos efeitos positivos para a produção de acetato de eugenila, as quais são representadas pelas áreas vermelhas. A maior conversão em acetato de eugenila (83,54%) foi obtida com 1:5 (mol: mol) de razão molar, 70 °C de temperatura, 5% de concentração de enzima Lipozyme TL IM, 2 h de tempo de reação e 150 rpm de velocidade de agitação.

Figura 14 - Superfície de resposta para produção de acetato de eugenila em função da razão molar e da temperatura.



Assim, temos que o uso de um desenho experimental estatístico aumenta a eficiência e a produtividade dos experimentos de pesquisa. A análise estatística fornece uma poderosa estrutura dentro da qual pergunta e responde dúvidas sobre possíveis soluções, podendo acelerar o progresso ao longo da curva de aprendizagem, o qual faz que seja mais facilmente acessível para os pesquisadores de biotecnologia (HAALAND, 1989).

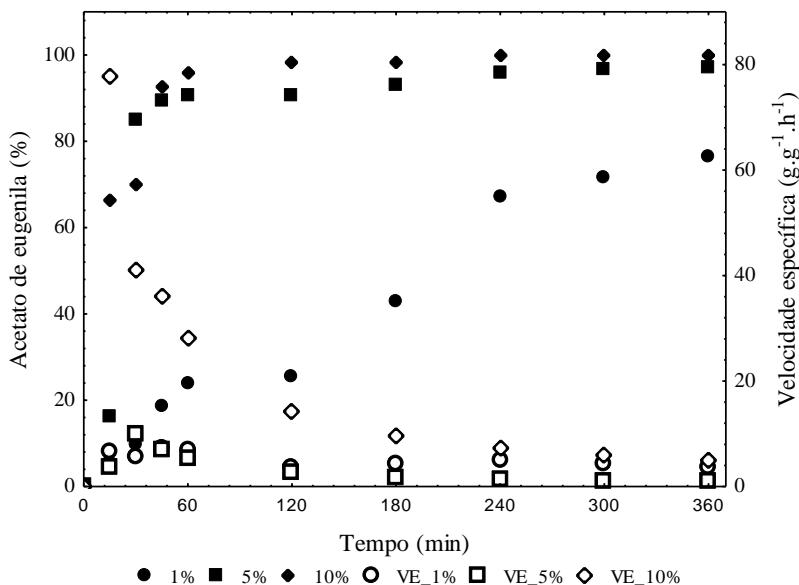
5.3.1 Cinética da produção enzimática de acetato de eugenila

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas na produção de acetato de eugenila, os efeitos da concentração de enzima [E] e da razão molar (RM) na cinética da reação de acetilação em sistema livre de solvente foram avaliados, a fim de definir um tempo reacional ideal. Ao mesmo tempo se avaliou o efeito da velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ao longo da produção de acetato de eugenila, usando a Equação 1, através das cinéticas destrutivas com intervalos de tempo de 0, 15, 30, 45, 60, 120,

180, 240, 300 e 360 minutos, em condições fixas de temperatura 70 °C e velocidade de agitação 150 rpm.

A Figura 15 mostra o efeito da concentração de enzima Lipozyme TL IM (1, 5 e 10% m/m de substrato) na cinética de produção enzimática de acetato de eugenila e na velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Figura 15 - Efeito da concentração de enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila à temperatura 70°C, razão molar de eugenol:anidrido acético 1:5 e velocidade de agitação 150 rpm, e na velocidade específica de consumo de substrato.



A partir da Figura 15 pode-se observar que com 1% de concentração de enzima atingiu-se a máxima conversão em acetato de eugenila (76,30%) em 360 min, sendo notavelmente diferente ao conseguido com 5 e 10% de enzima. Quando a enzima foi utilizada em uma concentração de 5%, uma conversão de 90,73% foi obtida em 60 min, sendo que após este tempo de reação não houve variação significativa de conversão, alcançando valores máximos de 96,90% em 360 min (6 h). Para a concentração de enzima de 10%, uma conversão de 92,81% foi obtida em 45 min, sendo que a máxima conversão de

100% obtida após 240 min de reação. Considera-se baixa a diferença entre as conversões produzidas com as concentrações de 5 e 10% de enzima, pelo que optou-se por considerar a concentração de 5% com 60 min (1 h) de tempo reacional como a melhor condição.

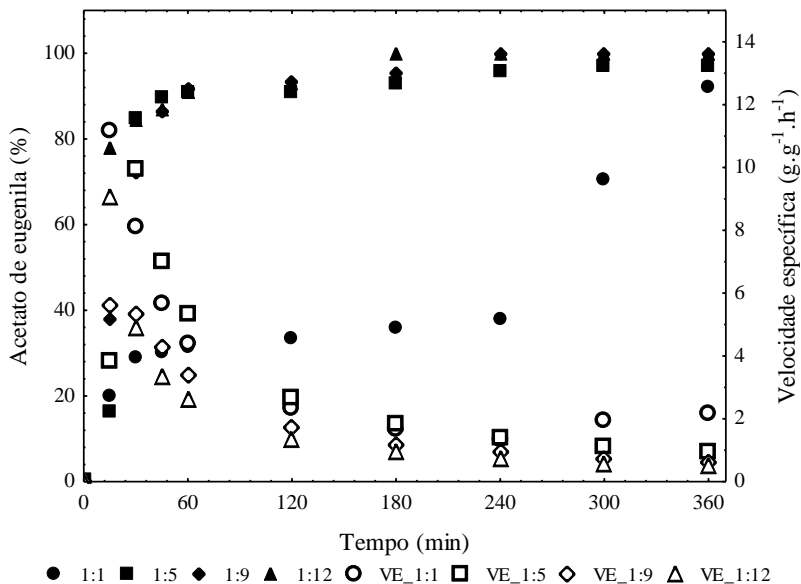
Os resultados obtidos no estudo cinético estão de acordo com os resultados obtidos na etapa de seleção de variáveis significativas na produção de acetato de eugenila, onde foi selecionada a concentração de enzima de 5% (m/m substrato) para a produção de acetato de eugenila catalisada pela Lipozyme TL IM, uma vez que nesta condição se reduz os custos de produção, devido ao fato que com menor quantidade de biocatalisador é possível obter conversões tão elevadas quanto as conversões 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 indisponível para os substratos no meio reacional, o que pode contribuir para uma diminuição da conversão da reação (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

Babicz et al. (2010) avaliaram o efeito da concentração de enzima (1 e 2%, m/m) na hidrólise de óleo de soja, observaram que quando utilizado 1% (m/m) de Lipozyme TL IM em 1,5 horas, o rendimento foi de 40%, no entanto quando utilizado 2% (m/m) da mesma enzima, o rendimento foi de 32%, em 3 horas.

A velocidade específica de consumo de substrato teve um comportamento similar ($< 10,00 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) com 1 e 5% de concentração de enzima. Pode-se ver que a velocidade específica da reação usando 10% de concentração de enzima foi rapidamente de 0 no tempo 0 para $77,70 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ no tempo de 15 min, a qual foi diminuindo até $4,88 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ no tempo de 360 min (6 h). A diminuição progressiva da velocidade específica, de ponto a ponto, é consequência da síntese enzimática na produção de acetato de eugenila, que está atingindo o equilíbrio ao longo do tempo de reação (0 até 360 min).

Os efeitos das razões molares (1:1; 1:5; 1:9 e 1:12 mol de eugenol: mol de anidrido acético) nas cinéticas de produção enzimática de acetato de eugenila e nas velocidades específicas de consumo de substrato estão representados na Figura 16.

Figura 16 - Efeito da razão molar (mol de eugenol: mol de anidrido acético) na produção de acetato de eugenila à temperatura 70 °C, concentração de enzima 5% e velocidade de agitação 150 rpm, e na velocidade específica de consumo de substrato.



A partir da Figura 16 pode-se observar que as conversões obtidas usando uma razão molar de 1:1 de substrato são baixas ao longo dos 360 min (assim como as conversões obtidas na Tabela 7, estando entre 30,06-53,58% para razão molar 1:1 em 120 min). Nas razões molares 1:5; 1:9 e 1:12, foram alcançadas conversões > 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 de acetato de eugenila, e gera um maior custo de reagente, tendo conversões similares se escolheu como a melhor condição à de razão molar 1:5 em 120 min (2 h) de tempo reacional, já que atingiu 92,86% de acetato de eugenila.

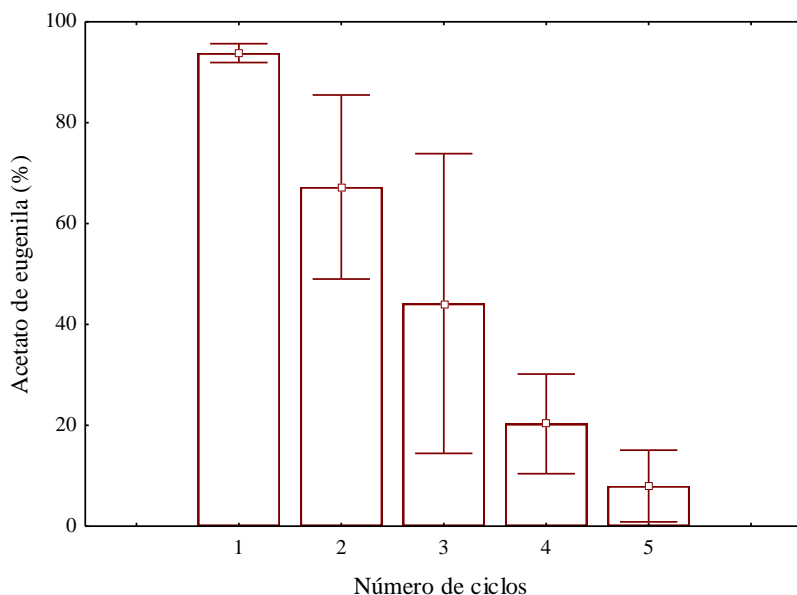
As velocidades específicas da Figura 16 apresentaram o mesmo comportamento, todas diminuem com o tempo. Começando com velocidade específica 0 no tempo 0, aumentando rapidamente a 11,16; 3,82; 5,62 e 9,05 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no tempo 15 min, e diminuindo progressivamente até valores de 0,95; 0,62 e 0,48 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no tempo 360 min, nas razões molares 1:1; 1:5; 1:9 e 1:12, respectivamente.

5.4 ESTUDO DO USO SUCESSIVO DA ENZIMA NA PRODUÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA

O uso de enzimas como catalisadores tem como vantagens o fato de ser biodegradáveis, permitem uma via limpa de obtenção do produto, sem tratamentos complexos de purificação, e o mais importante é que podem ser recuperadas e reutilizadas. Apesar das vantagens, o uso de enzimas imobilizadas como biocatalisadores, responsáveis por acelerar a reação de acetilação, no caso deste trabalho, é ainda relativamente oneroso, devido ao custo elevado da enzima, cuja reutilização seria um fator essencial também para a produção em nível industrial. Portanto, estudos de reuso das enzimas são essenciais, visando à diminuição dos custos e viabilização econômica do processo.

A Figura 17 apresenta as conversões em acetato de eugenila e os respectivos números de ciclo de reutilização da enzima Lipozyme TL IM na condição otimizada nas etapas anteriores.

Figura 17 - Efeito do uso sucessivo da enzima Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila à razão molar de 1:5 eugenol:anidrido acético, temperatura 70 °C, 5% de enzima, tempo reacional 2 h e velocidade de agitação 150 rpm.



Como se pode observar, no primeiro ciclo da enzima Lipozyme TL IM apresentou-se 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. Talvez não sejam os resultados esperados de conversão em acetato de eugenila, mas considerando uma conversão de 50%, pelo menos se pode aproveitar o uso da enzima Lipozyme TL IM até o terceiro ciclo, dependendo do sistema reacional e mais importante dos custos de operação experimental e industrial.

Ghamgui et al. (2006) avaliaram os ciclos de reuso de lipase de *Staphylococcus simulans*, imobilizada em carbonato de cálcio. Após 4 ciclos de utilização não ocorreu diferença significativa na produção de isoamil acetato (conversão 64%), em temperatura de 37 °C. Após 10 ciclos, a conversão foi de cerca de 50%.

5.5 PURIFICAÇÃO DO ÉSTER DE ACETATO DE EUGENILA

O éster obtido na condição otimizada foi previamente purificado a fim de eliminar o excesso de eugenol e anidrido acético, obtendo um produto final com um maior grau de pureza. Esta etapa foi necessária para minimizar erros nas etapas de identificação do composto, através da análise de RMN-¹H e avaliação do potencial antimicrobiano do composto produzido neste trabalho.

A Figura 18 apresenta o éster de acetato de eugenila antes de ser submetido ao processo de purificação por destilação a vácuo, e a Figura 19 apresenta o mesmo éster após o processo de purificação.

Figura 18 - Cromatograma do éster, antes da purificação em destilação a vácuo, obtido nas condições experimentais: razão molar 1:5 mol de eugenol:mol de anidrido acético, 5% (m/m substrato) de enzima Lipozyme TL IM, 70 °C, 150 rpm, em sistema de solvente.

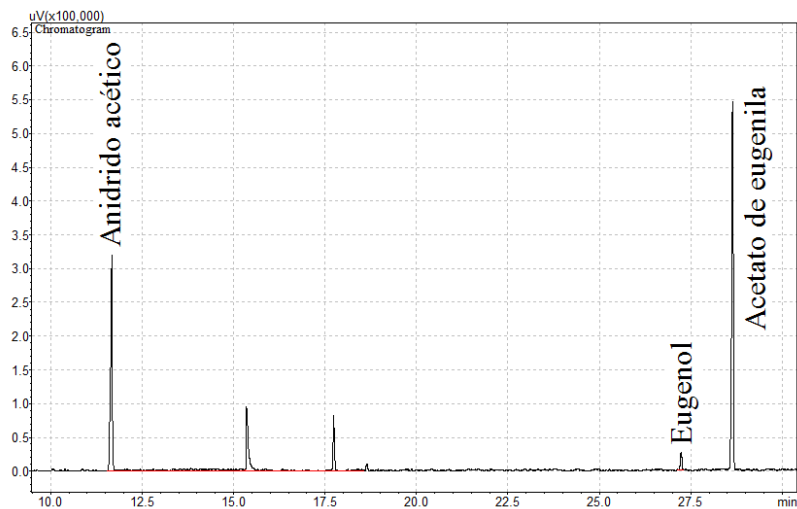
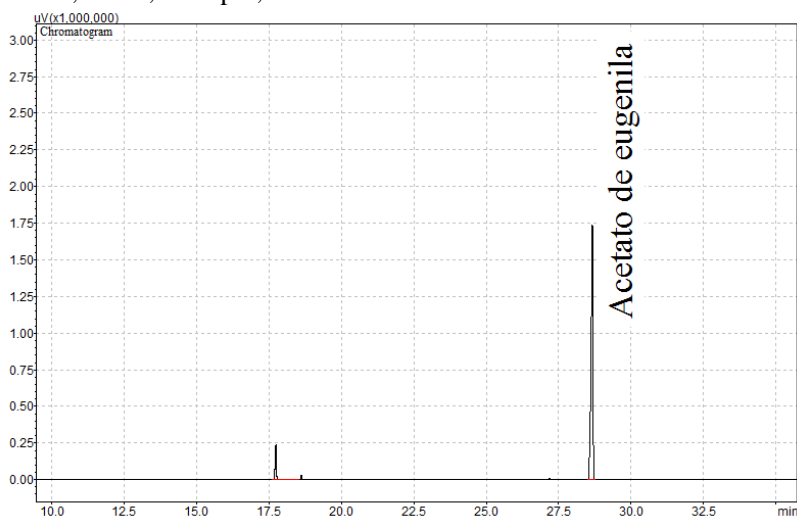


Figura 19 - Cromatograma do éster, após purificação em destilação a vácuo, obtido nas condições experimentais: razão molar 1:5 eugenol:manidrido acético, 5% (m/m substrato) de enzima Lipozyme TL IM, 70 °C, 150 rpm, em sistema de solvente.



Através destas figuras pode-se observar que ao final do processo de purificação obteve-se um éster relativamente puro, uma vez que na

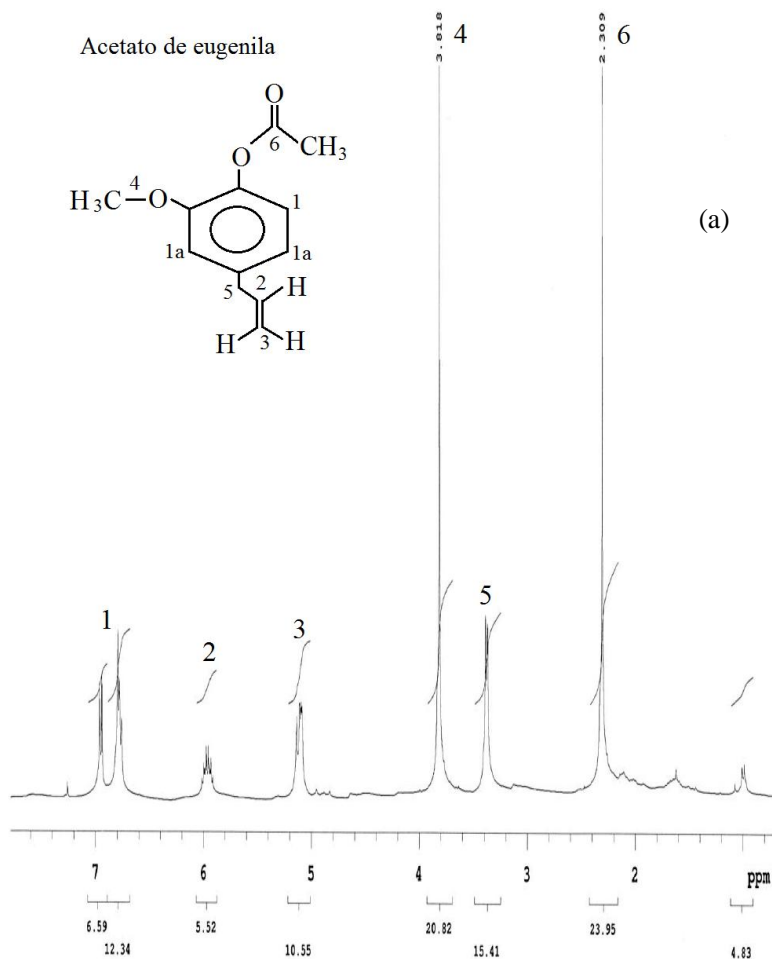
amostra analisada após a purificação (Figura 19) prevalece o pico referente ao acetato de eugenila. A purificação da amostra é um fator bem relevante nos resultados, considerando que podem ficar traços de outros compostos que, sinergicamente atuem como antimicrobianos. Além disso, a análise de RMN-¹H exige que os compostos a serem analisados apresentem um elevado grau de pureza.

5.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN¹H)

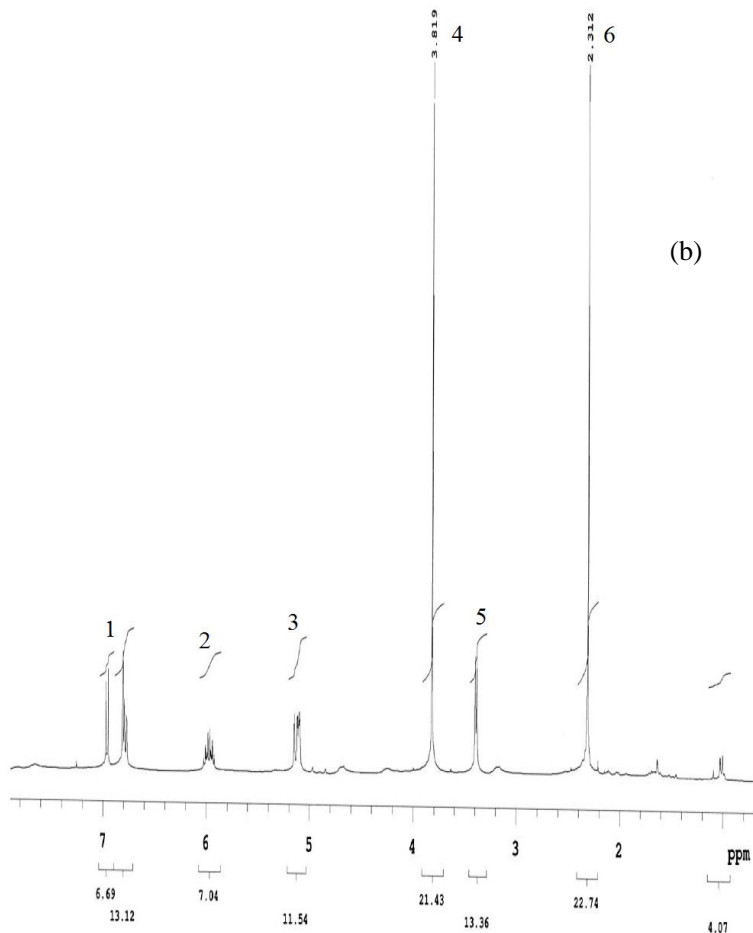
A ressonância magnética nuclear (RMN) encontra-se na região das ondas de rádio (radiofrequências). Em princípio, pode-se dizer que a RMN é outra forma de espectroscopia de absorção. Em um campo magnético, sob determinadas condições, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região da radiofrequência, absorção governada por características da amostra. Essa adsorção é função de determinados núcleos presentes na molécula, que são sensíveis à radiação aplicada. A grandeza física envolvida em RMN é o spin nuclear, propriedade apresentada em determinados núcleos com circulação de elétrons, os quais submetidos a campos magnéticos geram um campo magnético interno que pode se opor ou não ao campo magnético externo, produzindo um efeito de blindagem do átomo. Sendo que a maior densidade eletrônica dos átomos maior o grau de blindagem, e menor valor de deslocamento químico (ppm) (NASCIMENTO; BLOCH, 2001).

A Figura 20(a) mostra os espectros com seus respectivos deslocamentos dos átomos da molécula de acetato de eugenila, da amostra otimizada e purificada, através da análise de RMN-¹H, e a Figura 20(b) os espectros com seus respectivos deslocamentos dos átomos da molécula do padrão comercial de acetato de eugenila.

Figura 20 - Espectro de RMN-¹H para a amostra obtida via acetilação do óleo essencial da folha do cravo-da-Índia com anidrido acético, catalisado por Lipozyme TL IM, em sistema livre de solvente (a) e o padrão comercial de acetato de eugenila (b).



RMN¹H, Solvente; cdcl₃, T=21°C; Width 6402.0 Hz; Mercury-400.



RMN¹H, Solvente; cdcl₃, T=21°C; Width 6402.0 Hz; Mercury-400.

Pode-se observar que os acoplamentos: (1) referem-se aos 3 hidrogênios dos carbonos do anel aromático (os hidrogênios (1a) são equivalentes, portanto, os seus picos se sobrepõe); (2) e (3) refere-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, confirmando, assim, pela estrutura molecular, que é realmente o acetato de eugenila o obtido, na reação de acetilação do

eugenol com anidrido acético através da síntese enzimática com Lipozyme TL IM em sistema livre de solvente.

Santos (2010) também analisou através de RMN a molécula de eugenol e a molécula de acetato de eugenila, onde observou-se claramente nos espectros os picos do grupo acetil adicional, C-CH₃ em menor valor de deslocamento químico, e -COCH₃ em maior valor de ppm. Explicação apresentada por Nascimento e Bloch (2001): quando os átomos do grupo funcional encontram-se mais próximos ao átomo de oxigênio apresentam menor blindagem (maior valor de ppm), do que os átomos mais próximos a um átomo de carbono (menor valor de ppm).

5.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As propriedades microbiostáticas e microbicidas a partir de produtos vegetais são comprovadas através de ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade (SARTORI, 2005), sendo a técnica da difusão em placas a mais comum, porque é de fácil execução e requer pequenas quantidades de amostra (KATZUNG, 2003), assim como foi realizado no presente trabalho.

A Tabela 10 apresenta a atividade antimicrobiana do acetato de eugenila (amostra purificada) sobre as bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Proteus vulgaris*, *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Tabela 10 - 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.

Concentração de 20µL		
Bactérias Gram-positivas	ATCC	Halo de inibição (mm)
<i>Micrococcus luteus</i>	10240	16,33 ± 1,15 ^{bcd}
<i>Staphylococcus epidermis</i>	12228	17,67 ± 4,04 ^{bcd}
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	15,00 ± 0,00 ^{cd}
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	14,33 ± 0,57 ^{cd}
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	21,00 ± 1,73 ^{ab}
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	15,67 ± 1,15 ^{bcd}
Média		16,67 ± 2,41 ^{bcd}
Bactérias Gram-negativas		
<i>Proteus vulgaris</i>	13315	17,33 ± 1,52 ^{bcd}
<i>Aeromonas</i> sp.	*	17,00 ± 1,00 ^{bcd}
<i>Escherichia coli</i>	25922	12,33 ± 0,57 ^d
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	23,67 ± 4,04 ^a
<i>Salmonella choleraesius</i>	107008	19,67 ± 1,52 ^{abc}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	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 (a = maior média, b = menor média).

Primeiramente pode-se observar que o acetato de eugenila possui atividade antimicrobiana, uma vez que inibiu o desenvolvimento das bactérias avaliadas, em diferentes halos de inibição. Entre as bactérias Gram-positivas, o acetato de eugenila teve maior efeito antimicrobiano sobre o *Bacillus subtilis* (21,00 mm) e menor efeito sobre o *Streptococcus mutans* (14,33 mm); e entre as bactérias Gram-negativas o acetato de eugenila teve maior efeito sobre a *Klebsiella pneumoniae* (23,67 mm) e menor efeito na *Escherichia coli* (12,33 mm).

Estatisticamente, entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a média do halo de inibição da bactéria *Klebsiella pneumoniae* teve a maior diferença significativa em relação às outras, pelo que se pode dizer que o acetato de eugenila teve maior efeito antimicrobiano contra essa bactéria anaeróbica facultativa.

A eficácia antimicrobiana depende de fatores extrínsecos e intrínsecos, como fase de crescimento, meio de cultura, tempo de incubação, temperatura, pH, entre outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010). A ação dos agentes antimicrobianos é, sobretudo, exercida na membrana celular da bactéria, provocando danos estruturais e funcionais no protoplasma. As substâncias ativas das plantas são capazes de alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular, interrompendo o sistema enzimático, comprometendo o material genético da bactéria e formando compostos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio, podendo levar a destruição desses micro-organismos (SARTORI, 2005). Segundo Torres et al. (2000), compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais como timol, eucaliptol, mentol entre outros, apresentam atividade antimicrobiana, cujos mecanismos de ação parecem ser a alteração da parede celular das bactérias. Nas bactérias Gram-positivas, a camada de peptidoglicanos da parede celular é muito mais espessa (15% a 50% da massa seca da célula) que aquela das Gram-negativas (não ultrapassa 5%) (SARTORI, 2005). Geralmente, as bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos antimicrobianos, devido à sua membrana externa, pois contêm lipo-polissacarídeos. No entanto, isso não quer dizer que as Gram-positivas sejam mais susceptíveis aos antimicrobianos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Então, em relação a isto, pode-se observar na Tabela 10 que a média das bactérias Gram-negativas foi 17,55 mm, pelo qual foram mais sensíveis ao poder antimicrobiano do acetato de eugenila, em comparação as bactérias Gram-positivas, que tiveram uma média de 16,62 mm de halo de inibição. Resultado semelhante foi obtido por Chiaradia et al. (2012), também pela técnica da difusão em placas com 20 µL, a atividade antimicrobiana do acetato de eugenila sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde as médias obtidas foram 36,13 e 39,22 mm de halo de inibição, respectivamente. Confirma-se, novamente, que as bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis à ação antimicrobiana do acetato de eugenila.

Outro aspecto relevante é a comparação entre agentes antimicrobianos desenvolvido por Chiaradia et al. (2012) onde o acetato de eugenila, obtido via síntese enzimática, 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. Estes resultados reforçam a importância de pesquisas relacionadas à produção de antimicrobianos naturais alternativos, foco da presente pesquisa.

Hector et al. (2004) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo *Syzygium aromaticum*, onde conseguiram inibir fungos: *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* com 32 μL ; e bactérias: *E. coli* com 32 μL , *S. aureus* e *P. aeruginosa* com < 2 μL ambas. Pei et al. (2009) determinaram que a concentração mínima inibitória do eugenol contra *E. coli* é de 1600 mg/L.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a viabilidade técnica da esterificação do óleo essencial de cravo-da-índia para a síntese de acetato de eugenila via acetilação enzimática, em sistema livre de solvente.

Na seleção de biocatalisadores, a Lipozyme TL IM foi selecionada como o biocatalisador mais adequado na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de folha de cravo-da-Índia e anidrido acético, em sistema livre de solvente, sendo que com 150 rpm foram alcançadas as melhores conversões em ésteres de acetato de eugenila.

A partir dos planejamentos experimentais foi possível obter as condições otimizadas para a produção de acetato de eugenila, sendo estas: razão molar de eugenol: anidrido acético de 1:5, concentração de enzima de 5% (m/m de substratos), temperatura de 70 °C, velocidade de agitação de 150 rpm e tempo reacional de 2 h.

O acetato de eugenila mostrou-se satisfatório como agente antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas neste trabalho.

Os resultados apresentados mostraram que a Lipozyme TL IM é eficaz para a produção do éster acetato de eugenila. Desta forma, a síntese catalisada por lipase imobilizada tem como vantagem a simplicidade na etapa de separação e purificação dos produtos da reação. É possível a utilização de menor quantidade de substratos e reações na ausência de solvente, além da possibilidade de reuso e recuperação, tornando esses catalisadores ambientalmente corretos, e com potencial para aplicação em processos industriais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estabilidade do éster.
- Encapsulamento do éster.
- Aplicação do éster em alimentos.
- Reuso do biocatalisador.
- Estudo de outras propriedades biológicas do éster.

8 REFERÊNCIAS

AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo-da-Índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, p.146-161, 2012.

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

ALISSANDRATOS, A.; HALLING, P.J. Enzymatic acylation of starch. **Bioresource Technology**, v.115, p.41-47, 2012.

ALQAREER, A.; ALYAHYA, A.; ANDERSSON, L. The effect of clove and benzocaine versus placebo as topical anesthetics. **Journal of Dentistry**, v.34, p.747-750, 2006.

ANDERSON, W.G; MCKINLEY, R.S.; COLAVECCHIA, M. The use of oil as an anesthetic for Rainbow Trout and its effects on swimming performance. **American Fisheries Society**, v.17, p.301-307, 1997.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidations conditions. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.1025-1033, 2005.

AYOOLA, G.A.; LAWORE, F.M.; ADELOWOTAN, T.; AIBINU, I.E.; ADENIPEKUN, E.; COKER, H.A.B.; ODUGBEMI, T.O. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.162-166, 2008.

BABICZ, I.; LEITE, S.G.F.; DE SOUZA, R.O.M.A.; ANTUNES, O.A.C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 4-6, 2010.

BAGHERI, H.; MANAP, M.Y.B.A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v.121, p.220-228, 2014.

BAYOUMI, S.; Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yoghurt. **Chemie Mikrobiologie Technologie Der Lebensmittel**, v.14, p.21-26, 1992.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v.158, p.1-14, 2010.

BRIOZZO, J.L.; NÚÑEZ, L.; CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; D'AQUINO, M. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.69-75, 1989.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

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.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.501–506, 2007.

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, p.1-6, 2012.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K. Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system. **Biotechnology Letters**, v.20, p.865-868, 1998.

CHEN, S.J.; WANG, M.H.; CHEN, I.J. Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. **General Pharmacology**, v.27, p.629-633, 1996.

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.

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

CONSENTINO, S.; TUBEROSO, C.I.G.; PISANO, B.; SATTÀ, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p.130-135, 1999.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, 776-792, 2009.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 559-564, 2005.

DANIEL, A.N.; SARTORETTO, S.M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p.212-217, 2009.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, S.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.107-115, 2010.

DIDRY, N; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v.69, p.25-28, 1994.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific opinion on the safety and efficacy of allyhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. **EFSA Journal**, v.9, 2011.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Review: Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.69, p.197-212, 2010.

FERRARI, F.; PARIS, C.; MAIGRET, B.; BIDOUIL, C.; DELAUNAY, S.; HUMEAU, C.; CHEVALOT, I. Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida Antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.122-132, 2014.

Food Ingredients Brasil - FIB. São Paulo 2010, nº 15. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais**. UBM Brazil Feiras & Eventos Ltda.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E.A. Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO₂ - experiments and model. **Journal of Supercritical Fluids**, v.58, p.58-67, 2011.

GAO, W.L.; LI, N.; ZONG, M.H. Enzymatic regioselective acylation of nucleosides in biomass-derived 2-methyltetrahydrofuran: Kinetic study and enzyme substrate recognition. **Journal of Biotechnology**, v.164, p.91-96, 2013.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, 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.

GÜLÇİN, i.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v.5, p.489-499, 2012.

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

HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. Editora: Marcel Dekker INC. v.105, 1989.

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, 1998.

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.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym[®] 435 and Lipozyme[®] TL IM. **Bioresource Technology**, v.99, p. 277-286, 2008.

HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.818-822, 1980.

HORCHANI, H.; CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.466-474, 2010a.

HORCHANI, H.; SALEM, N.B.; ZARAI, Z.; SAYARI, A.; GARGOURI, Y.; CHAÂBOUNI, 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, 2010b.

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. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.38, p.403-412, 2002.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.461-466, 2005.

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.

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.; 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.

KENNEDY, B.M; GALE, W.L.; OSTRAND, K.G. Evaluation of clove oil concentrations for use as an anesthetic during field processing and passive integrated transponder implantation of juvenile steelhead. **Northwest Science**, v.81, p.147-154, 2007.

KUMARAVELU, P.; SUBRAMANIYAM, P.; DAKSHINAMOORTHY, D.P.; DEVARAJ, N.S. The antioxidant effect of eugenol on CCl₄-induced erythrocyte damage in rats. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p.23-28, 1996.

LE JOUBIQUX, F.; BRIDIAU, N.; BEN HENDA, Y.; ACHOUR, O.; GRABER, M.; MAUGARD, T. The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by solvents in acylation reactions of amino-alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.95, p.99-110, 2013.

LERIN, L.A. **Síntese enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica). Departamento de Bioquímica, UFRJ, Rio de Janeiro.

LEWIS, K.; AUSUBEL, F. Focus on antibacterials. **Nature Biotechnology**, v.24, p.1453-1602, 2006.

LI, N.; ZONG, M.H.; MA, D. Unexpected reversal of the regioselectivity in *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed acylation of floxuridine. **Biotechnology Letters**, v.31, p.1241-1244, 2009.

LIAQUAT, M.; APENTEN, R.K.O. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. **JFS: Food Chemistry and Toxicology**, v.65, p.295-299., 2000.

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

- MURAKAMI, Y.; SHOJI, M.; HANAZAWA, S.; TANAKA, S.; FUJISAWA, S. Preventive effect of *bis*-eugenol, a eugenol *ortho* dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1061-1066, 2003.
- MOON, S.E.; KIM, H.Y.; CHA, J.D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v.56, p.907-916, 2011.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v.43, p.2393-2400, 1992.
- NASCIMENTO, C.J.do; BLOCH, C.Jr. Ressonância magnética nuclear: Gradus Primus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.21, 52-61, 2001.
- PALOCCI, C.; FALCONI, M.; CHRONOPOULOU, L.; CERNIA, E. Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.45, p.88-93, 2007.
- 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.K.; TRIPATHI, A.K. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pesticide Management Science**, v.69, 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.
- PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase Biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v.4, p.971-982, 2011.
- PEI, R.S.; ZHOU, F.; JI, B.P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial

effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science - Food and Microbiology and Safety**, v.74, p.M379-M383, 2009.

PORRES-MARTÍNEZ, M.; GONZÁLES-BURGOS, E.; ACCAME, M.E.C.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl. **Food Research International**, v.54, p.523-531, 2013.

RABENHORT, J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.46, p.470-474, 1996.

RANA, I.S.; RANA, A.S.; RAJAK, R.C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1269-1277, 2011.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. Review: An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.99, p.3975-3981, 2008.

REINECCIUS, G. Source book of flavors. **Aspen Publishers**, 2° ed., 1994.

RICHETTI, A. **Esterificação enzimática d palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro.

ROBLES-MEDINA, A.; CONZÁLEZ-MORENO, P.A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v.27, p.398-408, 2009.

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.M.; STENHUIS, W.H.; VOGEL, N. de; OSENBRUGGEN, W.A. van; SCHOUTEN, A.; VERHAGEN, H. Antimutagenicity of eugenol in the rodent bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v.346, p. 69-75, 1995.

SALEM, J.H.; HUMEAU, C.; CHEVALOT, I.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; VANDERESSE, R.; BLANCHARD, F.; FICK, M. Effect of acyl donor chain length on isoquertirin acylation and biological activities of corresponding esters. **Process Biochemistry**, v.45, p.382-389, 2010.

SANTOS, A.L. **Preparação e caracterização de uma mistura eutética baseada em um derivado de óleo essencial extraído do *Syzygium aromaticum* L.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, São Paulo.

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

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

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

SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V.K.; PATRA, S. Review: An insight into plant lipase research – challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v.95, p.13-21, 2014.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORK, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v.6, p.29-44, 1983.

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.

SOTO, C.G.; BURHANUDDIN. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v.136, p.149-152, 1995.

SRIVASTAVA, K.C.; MALHOTRA, N. Acetyl Eugenol, a component of oil of cloves (*Syzygium aromaticum* L.) inhibits aggregation and alters arachidonic acid metabolism in human blood platelets. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.42, p.73-81, 1991.

SRIVASTAVA, K.C. Antiplatelet principles from a food spice clove (*Syzygium Aromaticum* L.). **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.48, p.363-372, 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.

STEVENSON, D.E.; WIBISONO, R.; JENSEN, D.J.; STANLEY, R.A.; COONEY, J.M. Direct acylation of flavonoid glycoside with phenolic acids catalysed by *Candida antartica* lipase B (Novozym 435®). **Enzyme and Microbiology Technology**, v.39, p.1236-1241, 2006.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v.36, p.224-229, 2014.

TAO, G.; IRIE, Y.; LI, D.J.; KEUNG, W.M. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.4777-4788, 2005.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **Pós-Graduação em Revista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, v.3, p.43-52, 2000.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.

WANG, Y.; XIN, J.; SHI, J.; WU, W.; XIA, C. A kinetic study of starch palmitate synthesis by immobilized lipase-catalyzed esterification in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.73-79, 2014.

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.

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

YANG, R.L.; LI, N.; LI, R.F.; SMITH, T.J.; ZONG, M.H. A highly regioselective route to arbutin esters by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. **Bioresource Technology**, v.101, p.1-5, 2010a.

YANG, R.L.; LI, N.; YE, M.; ZONG, M.H. Highly regioselective synthesis of novel aromatic esters of arbutin catalyzed by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.67, p.41-44, 2010b.

ZIZOVIC, I.; STAMENIĆ, M.; ORLOVIĆ, A.; SKALA, D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: mathematical modelling on the micro-scale. **Journal of Supercritical Fluids**, v.39, p.338-346, 2007.