

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS

LEANDRO SANTOLIN

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ACETATO DE EUGENILA A PARTIR DO
ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)**

DISSERTAÇÃO

TOLEDO
2019

LEANDRO SANTOLIN

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ACETATO DE EUGENILA A PARTIR DO
ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos-PPGQB - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Toledo, como requisito para obtenção do título de “Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos” – Área de Concentração: Engenharia Biotecnológica.

Orientadora: Prof. Dr.^a Karina Graziella Fiametti Colombo

Coorientadora: Prof. Dr.^a Viviane da Silva Lobo

TOLEDO
2019

S237s Santolin, Leandro.

Síntese enzimática do acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). / Leandro Santolin – Toledo, 2019.

81f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Graziella Fiametti Colombo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane da Silva Lobo.

Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. Toledo, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Cravo-da-índia. 3. Óleos e gorduras. 4. Processos químicos - Dissertações. I. Colombo, Karina Graziella Fiametti, orient. II. Lobo, Viviane da Silva, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.6

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO ACETATO DE EUGENILA A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

LEANDRO SANTOLIN

Esta dissertação foi apresentada às 14 (quatorze) horas do dia 28/05/19 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS, com área de concentração em Engenharia Biotecnológica, linha de pesquisa em Processos Biotecnológicos, Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof. Dra. Maria Luiza Fernandes
Rodrigues (UNIOESTE – Campus Toledo)

Prof. Dr. Renato Eising
(UTFPR – Campus Toledo)

Prof. Dra. Karina Graziella Fiametti
Colombo (UTFPR) – *Orientadora*

Prof. Dra. Viviane da Silva Lobo
(UTFPR) – *Coorientadora*

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
(UTFPR) – Coordenador do
PPGPQB

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR – CAMPUS TOLEDO

Dedico este trabalho:

De maneira especial aos meus pais Nilso e Sueli, pelo exemplo de pessoas que são para mim, por me ajudarem a formar o meu caráter e por sempre me ajudarem a decidir qual caminho tomar, com muito amor, discernimento, motivação, compreensão e paciência. À minha esposa Fabiola, pela alegria, paciência, incentivo nos momentos mais difíceis e por cuidar de modo especial do nosso filho Joaquim, uma benção de Deus, nos momentos em que estive realizando este trabalho, sem vocês, nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus e a Nossa Senhora pela saúde, pela vida, por estarem me amparando, iluminando cada passo, me dando proteção e força para não desistir em cada dificuldade encontrada para finalizar este trabalho.

Aos meus pais Nilso e Sueli, por todos os conselhos, todo amor, carinho pelo dom da vida que me concederam. Tenham a certeza que apesar da distância vocês estão todos os dias em meus pensamentos e minhas orações e que muitos ensinamentos são lembrados diariamente.

Às minhas orientadoras Karina Graziella Fiametti Colombo e Viviane da Silva Lobo, pelo tempo dedicado, ensinamentos, conselhos e compreensão que depositaram em mim. Por todas as palavras de motivação e aprendizado, que foram muito importantes para a conclusão dessa dissertação.

Aos meus amigos do mestrado pela parceria e amizade. A minha colega de trabalho Andressa por se disponibilizar em ajudar a interpretar as análises realizadas.

Aos técnicos dos Laboratórios de Processos Químicos do campus de Toledo que sempre estiveram disponíveis para fornecerem ajuda e informações importantes para o desenvolvimento das análises.

A minha esposa Fabiola por auxiliar durante esse período que precisei me dedicar bastante a essa pesquisa. Pela paciência e tempo que sozinha por muitas vezes cuidou do nosso querido filho Joaquim.

Ao Programa de Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos e ao CNPq pelo suporte financeiro para a pesquisa.

A todos, que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um....”

Albert Einstein

RESUMO

SANTOLIN, Leandro. Síntese enzimática do acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). 2019. 81 f. Dissertação (Engenharia Biotecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2019.

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) tem potencial para síntese de um éster, conhecido como acetato de eugenila, que possui propriedades flavorizantes, antioxidantes e antimicrobianas, mas está presente em pequenas quantidades (1 a 10%) no óleo essencial. Neste contexto, o principal objetivo do trabalho, é a síntese de acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia, extraído via arraste de vapor d'água de botões florais secos, com o qual, realizou-se a síntese enzimática com o uso de diferentes enzimas lipases, diferentes temperaturas de reação, teor das enzimas e razão molar anidrido acético:eugenol. As extrações do óleo essencial de cravo-da-índia foram realizadas em destilador Clevenger e forneceram um rendimento médio de 5,83%, sendo este satisfatório para a técnica de extração. Os parâmetros físico-químicos (densidade, índice de refração, solubilidade, cor, odor, aparência e água), testados com óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) obtido das extrações, apresentaram resultados satisfatórios e o óleo apresentou quantidade de eugenol, de aproximadamente 87%, tendo um bom potencial para ser utilizado na produção de acetato de eugenila. Considerando os catalisadores enzimáticos testados, as enzimas Home-Made, Lipozyme TL 100 L e CALB L, o que apresentou maior potencial na conversão, foi a enzima Lipozyme TL 100 L, com a qual, obteve-se um valor de conversão de 88,12%. Obteve-se a condição otimizada para a produção de acetato de eugenila com os parâmetros de 55°C, razão molar de substratos de 1:1, teor da enzima de 10% e o tempo de 120 minutos de reação, pois o valor de conversão foi de 91,80%, sendo que as variáveis que tiveram influência significativa na síntese do acetato de eugenila, foram a temperatura e o teor de catalisador utilizado na reação. O estudo cinético demonstrou que a conversão máxima obtida com valores superiores a 90%, foi próxima ao tempo de 5 horas de reação. O éster obtido da síntese, foi purificado e não observou-se pelos testes, resíduos de ácido acético da reação, confirmando que o processo de purificação foi eficiente e os testes de Espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) utilizados para caracterização do éster sintetizado, confirmaram que o composto é o acetato de eugenila, pela presença de um grupo metoxilo e um grupo acetóxi na molécula. Dessa forma, os resultados demonstram a importância da reação de acetilação e catálise enzimática para conversão do eugenol em acetato de eugenila, tornando este um composto mais estável para uso.

Palavras-chave: Cravo-da-Índia, Eugenol, Acetato de Eugenila, Lipases, Acetilação Enzimática.

ABSTRACT

SANTOLIN, Leandro. Enzymatic synthesis of eugenyl acetate from clove essential oil (*Syzygium aromaticum*). 2019. 81 f. Dissertação (Engenharia Biotecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2019.

Clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) has potential for the synthesis of an ester, known as eugenyl acetate, which has flavoring, antioxidant and antimicrobial properties, but is present in small quantities (1 to 10%) in the oil essential. In this context, the main objective of this work, is the synthesis of eugenyl acetate from the oil of clove, extracted by water vapor drag from dry flower buds, with which the enzymatic synthesis was performed using different lipase enzymes, different reaction temperatures, enzyme content and acetic anhydride:eugenol molar ratio. Extractions of clove essential oil were performed in Clevenger distillers and yielded an average yield of 5.83%, which is satisfactory for the extraction technique. The physicochemical parameters (density, refractive index, solubility, color, odor, appearance and water), tested with clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) obtained from the extractions, presented satisfactory results and the oil presented a quantity of eugenol, approximately 87%, having a good potential for use in the production of eugenyl acetate. Considering the enzymatic catalysts tested, the Home-Made enzymes, Lipozyme TL 100 L and CALB L, which presented the greatest potential for conversion, was the enzyme Lipozyme TL 100 L with a conversion value of 88.12%. The optimized condition was obtained for the production of eugenyl acetate with parameters of 55 ° C, 1:1 substrate molar ratio, 10% enzyme content and 120 minutes reaction time, since the conversion value 91.80%, and the variables that had a significant influence on the synthesis of eugenyl acetate were the temperature and the catalyst content used in the reaction. The kinetic study showed that the maximum conversion obtained with values greater than 90% was close to the time of 5 hours of reaction. The ester obtained from the synthesis was purified and was not observed by the tests, residues of acetic acid from the reaction, confirming that the purification process was efficient and the Infrared Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR and ^{13}C) tests used for characterization of the synthesized ester confirmed that the compound is eugenyl acetate by the presence of a methoxy group and an acetoxy group in the molecule. Thus, the results demonstrate the importance of the acetylation and enzymatic catalysis reaction for the conversion of eugenol to eugenyl acetate, making it a more stable compound for use.

Keywords: Indian Clove. Eugenol. Eugenyl Acetate. Lipases. Enzymatic Acetylation.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância;
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> ;
BHT	Butilhidroxitolueno;
°C	Graus Celsius;
CALB	<i>Candida Antarctica B</i> ;
cm	Centímetros;
CO ₂	Dióxido de Carbono;
δC	Deslocamento químico (RMN ¹³ C);
d	Dubleto;
d/d	Duplo Dupleto;
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> ;
DMSO-d ₆	Dimetilsulfoxido Deuterado;
DPR	Desvio Padrão Relativo;
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> ;
FES	Fermentação do Estado Sólido;
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> ;
FTIR	<i>Fourier Transform Infra – Red</i> ;
g	Gramas;
GC	<i>Gas chromatography</i> ;
δH	Deslocamento químico (RMN ¹ H);
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> ;
Hz	Hertz;
J	Joule;
KDa	Kilodalton;
KLU	<i>Kilo Lipase Unit</i> ;
LDH	Desidrogenase Láctica;
LU	<i>Lipase Unit</i> ;
m	Massa;
min	Minuto;
µg	Microgramas;
mg	Miligrama;
mL	Mililitro;

μL	Microlitros;
mol	Quantidade de Substância;
m	Multiplete;
MHz	Megahertz.
NaOH	Hidróxido de Sódio;
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio;
ρ	Densidade;
%	Porcentagem;
R ²	Coefficiente de Determinação;
R	Coefficiente de Correlação;
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;
rpm	Rotações por Minuto;
s	Singleto;
TCI	Triple Chanel Inverse;
TL	<i>Thermomyces Lanuginosus</i> ;
USP	<i>United States Pharmacopeial</i> ;
v	Volume;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	24
Figura 2: Estrutura molecular dos principais compostos do Óleo Essencial de Cravo-da-Índia.	25
Figura 3: Reações Catalisadas por Lipases.....	29
Figura 4: Síntese de acetato de eugenila por acetilação do eugenol com anidrido acético.....	32
Figura 5: Destilador Clevenger Óleos Essenciais com Banho Termostatizado.....	35
Figura 6: Botões florais secos e triturados de Cravo-da-Índia.....	36
Figura 7: Cromatógrafo Gasoso Agilent 7890B com FID.	39
Figura 8: Etapas do teste de definição do melhor Catalisador.	41
Figura 9: Etapas do planejamento fatorial completo 2 ³	43
Figura 10: Cromatograma solução branco (Ciclohexano).....	49
Figura 11: Cromatograma solução amostra diluída 1/10.....	50
Figura 12: Diagrama de Pareto mostrando o efeito da razão molar, temperatura e teor da Enzima na produção de acetato de eugenila.	54
Figura 13: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando a interação de teor da enzima e temperatura.	56
Figura 14: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando temperatura e a razão molar eugenol/anidrido acético.....	57
Figura 15: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando a teor de enzima e a razão molar eugenol/anidrido acético.....	58
Figura 16: Curva de Calibração do padrão de Acetato de Eugenila.....	59
Figura 17: Cinética de conversão do Acetato de Eugenila.....	60
Figura 18: Cromatograma solução padrão de Ácido Acético.	61
Figura 19: Cromatograma solução Amostra após Purificação.	62
Figura 20: Espectro de infravermelho para a amostra de acetato de eugenila obtido na reação de acetilação catalisada por Lipozyme TL 100L.....	63
Figura 21: Espectro de RMN de ¹ H do éster de acetato de eugenila (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	66
Figura 22: Espectro de RMN de DEPT 135 do Éster de Acetato de Eugenila (DMSO-d ₆ , 150 MHz).....	67

Figura 23: Mapa de contorno HMBC do Éster de Acetato de Eugenila (DMSO-d6, 600 e 150 MHz).....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa de botões florais de cravo-da-índia e seus respectivos tempos de destilação.....	36
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais, codificadas e com o catalisador ideal.....	42
Tabela 3: Temperatura da coluna.....	45
Tabela 4: Rendimento de Óleo Essencial das Extrações do de Cravo-da-índia.....	47
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos obtidos nos testes realizados com o óleo essencial de cravo-da-índia.....	48
Tabela 6: Resultados do teor em % do Constituintes do Óleo Essencial de Cravo-da-Índia obtidos por Normalização.....	50
Tabela 7: Conversões de Acetato de Eugenila para os biocatalisadores condições fixas de reação, durante 2 horas de reação.....	51
Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais, codificadas e com o catalisador ideal.....	53
Tabela 9: ANOVA para validação do modelo que descreve a produção de acetato de eugenila utilizando a enzima Lipozyme TL 100L.....	55
Tabela 10: Resultados da análise das principais bandas da amostra da síntese do Acetato de Eugenila.....	64
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) do Éster de Acetato de Eugenila (δ em ppm e J em Hz).....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo Geral	19
1.1.2. Objetivos Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
2.1.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL VIA DESTILAÇÃO DE ARRASTE POR VAPOR.....	21
2.2 CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i>)	23
2.3 EUGENOL	25
2.4 ACETATO DE EUGENILA	26
2.5 LIPASES	28
2.6 ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA HOME-MADE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO	33
3.1.1 Esterilização de meios e equipamentos	33
3.1.2 Estoque e Manutenção das Cepas.....	33
3.1.3 Preparação dos Substratos	33
3.1.4 Condições de Cultivo no Meio Sólido	34
3.1.5 Secagem	34
3.1.6 Extração da Enzima	35
3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i>)	35
3.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO....	37
3.3.1 Determinação da Densidade Relativa	37
3.3.2 Determinação do Índice de Refração	37
3.3.3 Determinação da Água em % no Óleo Essencial.....	38
3.3.4 Determinação da Cor	38
3.3.5 Determinação da Aparência.....	38
3.3.6 Determinação da Solubilidade em Etanol (70%).....	38
3.4 QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	39
3.5 PROCEDIMENTO GERAL DE SÍNTESE DO ACETATO DE EUGENILA.....	40
3.6 SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	40
3.7 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	42
3.8 ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	43
3.9 DETERMINAÇÃO DA % DE CONVERSÃO EM ÉSTER NA REAÇÃO	44

3.10 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO (ACETATO DE EUGENILA)	45
3.11 CARACTERIZAÇÃO DO ACETATO DE EUGENILA	45
3.11.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	45
3.11.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (^1H e ^{13}C).....	46
3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i>)	47
4.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO....	48
4.3 QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	49
4.4 SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	51
4.5 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA	52
4.5.1 Efeito da Teor da Enzima e da Temperatura.....	55
4.5.2 Efeito da Temperatura e da Razão Molar.....	56
4.5.3 Efeito do Teor da Enzima e da Razão Molar.....	57
4.6 CINÉTICA DA CONVERSÃO DE ACETATO DE EUGENILA	59
4.7 PURIFICAÇÃO DO ACETO DE EUGENILA	61
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO ACETAO DE EUGENILA	62
4.8.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	62
4.8.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN (^1H e ^{13}C).....	65
5. CONCLUSÃO	71
5.1 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A atual demanda por alimentos e produtos livres de aditivos sintéticos, naturais e que sejam benéficos à saúde das pessoas vêm crescendo. Os óleos essenciais e extratos vegetais são conhecidos como fontes de substratos para a síntese de substâncias naturais (aditivos), usadas como conservantes, antimicrobianos e antioxidantes nas indústrias cosmética, química, farmacêutica e alimentícia (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Um fator muito importante é que os óleos essenciais podem apresentar compostos iguais qualitativamente, mas diferenças quantitativas tornam estes únicos, com características próprias para aquela espécie, ou seja, com propriedades químicas e biológicas diferentes (PROBST, 2012).

Diversas substâncias orgânicas compõem os óleos essenciais, tais como hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, acetatos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis, além de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, que são os constituintes predominantes (LINARD, 2008). Os principais constituintes possuem natureza hidrofóbica e grande parte possui densidade maior que a água, tornando-os solúveis em solventes orgânicos, imiscíveis em água (ASBAHANI et al., 2015).

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é um poderoso agente antimicrobiano e antioxidante, sendo estas características atribuídas principalmente ao seu composto majoritário, o eugenol (AYOOLA et al., 2008). Apesar dessas excelentes propriedades, o uso direto deste composto fenólico, o eugenol, apresenta algumas desvantagens, principalmente por apresentar baixa estabilidade, devido a presença do radical hidroxila na sua estrutura, que é particularmente instável na presença de fatores como luz, ar, umidade, e altas temperaturas, o que faz reagir rapidamente com outras moléculas. Dessa forma, surgem diversas alternativas de substituição da estrutura do eugenol, possibilitando que seus derivados acilados, esterificados, acetilados e outros apresentem vantagens em relação às propriedades químicas e biológicas (KARMAKAR et al., 2012)

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) tem potencial para síntese de um éster, conhecido como acetato de eugenila. Este é um fenilpropanóide disponível no óleo essencial representando de 1 a 10% da composição. Ele pode ser sintetizado através da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético por

catálise química ou enzimática (SILVA et al., 2015). O acetato de eugenila por sua vez, apresenta diversas propriedades, como elevada atividade antioxidante, antimicrobiana, entre outras, porém sua disponibilidade na natureza é pequena (BURDOK, 2010 e PANDEY et al., 2013).

Dessa forma, será explorado o potencial de síntese do éster acetato de eugenila, a partir do óleo essencial de cravo-da-índia, utilizando um processo biotecnológico, baseado na acetilação do composto principal do óleo, o eugenol com anidrido acético, usando diferentes catalisadores enzimáticos (lipases). O material sintetizado será purificado e caracterizado.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a síntese enzimática do acetato de eugenila a partir do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*).

1.1.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter óleo essencial de cravo-da-índia quantitativamente com destilação por arraste de vapor d'água com destilador de óleos essenciais Clevenger;
- ✓ Realizar a caracterização físico-química do óleo essencial;
- ✓ Avaliar o potencial de catálise das lipases na síntese do acetato de eugenila e selecionar o melhor catalisador;
- ✓ Otimizar o processo de formação do acetato de eugenila avaliando o efeito de variáveis do processo (concentração de enzima, temperatura e razão molar substrato:anidrido acético) via técnica de planejamento experimental;
- ✓ Avaliar a cinética de conversão do sistema estudado nas condições experimentais otimizadas determinadas nas etapas anteriores;
- ✓ Purificar o acetato de eugenila obtido da síntese.
- ✓ Caracterizar o Acetato de Eugenila obtido da Purificação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são constituídos por um grande número substâncias complexas caracterizadas por apresentarem cheiro forte, e suas propriedades têm sido exploradas durante décadas. Existem mais de 17.000 espécies de plantas aromáticas conhecidas, das quais somente 10% são utilizadas para a obtenção de óleos essenciais. Os principais gêneros usados pertencem as famílias: *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Cupressaceae* e *Piperaceae* (ASBAHANI et al., 2015).

Os óleos essenciais são constituídos de substâncias que possuem natureza hidrofóbica e a grande maioria possui densidade superior à da água, tornando-os solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis em água (ASBAHANI et al., 2015).

Estas substâncias são muito sensíveis ao calor, podendo ocorrer perdas de alguns compostos voláteis, conforme o método empregado no processo de extração pode-se obter um baixo rendimento devido à degradação de compostos provenientes de efeitos térmicos ou hidrolíticos (LUCCHESI et al., 2004).

A composição química, qualidade, quantidade dos óleos essenciais são geralmente afetadas por fatores ambientais. Dentre estes fatores estão o estado do solo onde é cultivada a planta, a luz solar, a temperatura e o estresse hídrico. A parte da planta usada na obtenção do óleo, sua idade, métodos de coleta, processos de extração e análise, além da variabilidade genética, também podem afetar muito as características dos óleos essenciais (CASTRO et al., 2008).

Com importância industrial os óleos essenciais são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais (TRANCOSO, 2013).

De acordo com Simões e Spitzer (2007), a extração desses óleos essenciais pode ser realizada por diversas técnicas, como por exemplo, a destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, prensagem a frio, extração com solventes orgânicos, enfloração, entre outros. A relevância de se obter estes óleos deve-se a presença de substâncias específicas tais como, eugenol, linalol, limoneno, geraniol, calareno e estragol entre outras (SIFOLA; BARBIERI, 2006).

A extração de produtos naturais com o uso de solventes orgânicos, torna os processos menos vantajosos devido à dificuldade de remoção dos resíduos destes solventes presentes nos extratos. Em muitas situações, tanto para fins farmacológicos quanto sensoriais, o solvente residual torna-se indesejável devido, à sua capacidade reagente, à sua toxicidade ou pela influência no sabor e aroma do extrato. A utilização de gases densos como alternativa ao uso de solvente apresenta-se como uma forma alternativa para obtenção de compostos naturais de alto valor agregado e com excelente grau de pureza, em comparação com processos convencionais que necessitam de mais uma etapa para a remoção dos solventes (MAUL, 1999).

Devido a crescente preocupação da população com uso de substâncias sintéticas na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica, novas pesquisas na área de processamento de novos biomateriais e o controle da poluição adotado pelos governos e órgãos ambientais tem fomentado o desenvolvimento de tecnologias limpas. A extração em fluido supercrítico é considerada uma tecnologia limpa, muito difundida e de grande aplicação potencial na área de produtos naturais. (ARAÚJO et al., 2000). Atualmente, fluidos supercríticos estão sendo aplicados também na produção de fármacos de nano e micropartículas (AGUIAR et al., 2016)

A extração supercrítica tem muitas aplicações atualmente entre elas, a extração de princípios aromáticos de especiarias, retirada de nicotina do tabaco, extração de diversos insumos farmacêuticos, óleos essenciais de frutas, folha e sementes, dentre vários outros produtos. Possui também, várias aplicações em larga escala com relação à formulação de tintas que vêm sendo trabalhada, onde a dissolução em CO₂ supercrítico reduz a viscosidade da tinta, e permite assim uma boa redução de (30 a 60%) na concentração de solvente orgânico (PERRUT, 2001).

2.1.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL VIA DESTILAÇÃO DE ARRASTE POR VAPOR

A técnica de extração por arraste a vapor é uma das mais antigas e utilizadas nas operações de extração empregados nos processos associados à indústria e baseia-se na diferença de volatilidade dos compostos presentes na matéria-prima vegetal. Esta técnica é utilizada na indústria devido à sua maior simplicidade, facilidade e economia, assim como possibilita o processamento de grandes

quantidades de material vegetal de uma só vez. Além do mais, esse método possui baixo custo quando comparado com os métodos tecnológicos mais avançados, a exemplo da extração com fluido supercrítico (CASSEL e VARGAS, 2006).

Os óleos voláteis possuem pressão de vapor mais elevada que a água, por isso são arrastados pelo vapor d'água. Após obtido, o óleo volátil separado da água, deve ser seco com Sulfato de Sódio (Na_2SO_4) anidro. Mesmo sendo clássico, o procedimento pode formar resíduos em função da alta temperatura empregada, assim sendo, é desaconselhado para extração do óleo de flores por causar a decomposição das mesmas na presença do calor (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Em geral, as folhas das plantas aromáticas são colocadas sobre uma placa perfurada e o vapor d'água produzido pela caldeira, saturado e superaquecido vai se misturando ao material vegetal, provocando um rompimento dos vasos do tecido vegetal, onde estão armazenados os óleos essenciais, que são então liberados e arrastados pela corrente de vapor até o condensador (KOKETSU; GONÇALVES, 1991). Ao passar pelo condensador de serpentina, refrigerado com água natural, a mistura óleo-água perde energia cinética, calor e sofre uma transformação física do estado de vapor para o de líquido, sendo coletada na saída do condensador com um recipiente apropriado.

Na destilação de óleos essenciais por arraste à vapor, a água assume um papel importante na geração de vapor e no aumento da pressão de vapor do sistema. Essa condição é necessária para romper os vasos do tecido vegetal, bem como elevar a pressão de vapor da mistura óleo-água contida na coluna de extração a um valor superior ao da pressão atmosférica exercida sobre ela, destilando os componentes dos óleos essenciais a temperaturas um pouco menores que $100\text{ }^\circ\text{C}$, mesmo que as substâncias orgânicas que constituem o óleo essencial tenham valores de pressão de vapor baixos e pontos de ebulição superiores ao da água (RUBINGER; BRAATHEN, 2012). Isso só é possível porque de acordo com a lei das pressões parciais de Dalton, a pressão de vapor total dentro de um sistema de destilação será a soma das pressões parciais de vapor de todos componentes da mistura:

$$(P_{total} = P_a + P_b + P_c + \dots)$$

A lei estabelece “que, a uma dada temperatura, a pressão total exercida por uma mistura gasosa é igual a soma das pressões parciais dos constituintes gasosos” (CASTELLAN, 2001).

Na extração de óleos essenciais em escala industrial, o rendimento de óleos pode variar de acordo com a época da colheita e o tipo, a idade e a espécie do material vegetal. Este método de arraste por vapor d'água segue os princípios do aparelho de Clevenger, obviamente, atingindo outras proporções. Na destilação por arraste de vapor d'água, a mistura entra em ebulição a uma temperatura menor do que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes puros. Portanto líquidos de alto ponto de ebulição são destilados abaixo de 100 °C, quando um deles é a água, evitando-se a decomposição do componente de maior ponto de ebulição. (GRAMOLELLI JÚNIOR et al, 2006).

2.2 CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia fornece um óleo essencial aromático, com propriedades biológicas exploradas amplamente pelas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (GUENTHER, 1948 e SIMÓES; SPITZER, 2003).

Pertencente à classe *Magnoliopsida*, família *Myrtaceae*, a oitava maior família de plantas angiospermas, este caracteriza-se por um botão seco, obtido das flores verdes amareladas da árvore *Syzygium aromaticum* (L.), com altura aproximada de 8 a 10 metros, sendo nativa das Ilhas Molucas, na Indonésia e possui odor fortemente aromático e sabor ardente (Figura 1) (AFFONSO et al., 2012 e ITIS, 2018). Existem quatro numerosos gêneros nesta família: *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Myrcia* e *Syzygium* (Flora do Brasil, 2018).

Figura 1: Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*).



Fonte: <https://www.plantasexoticas.com.br/cravo-da-india-eugenia-caryophyllata>.

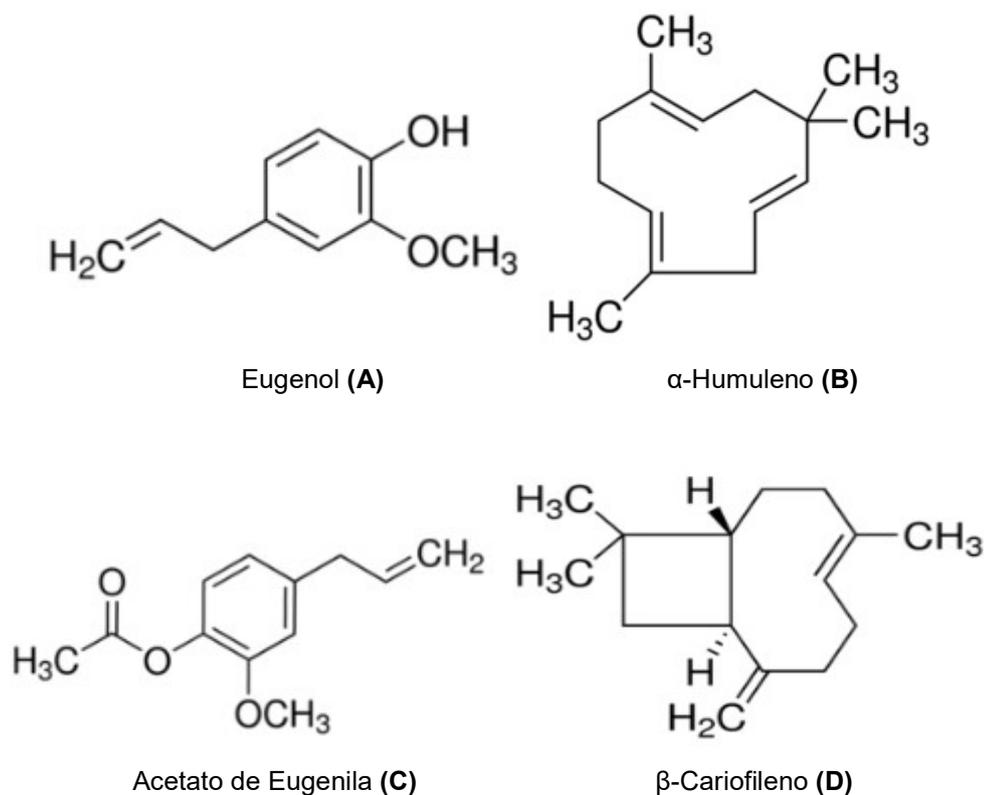
Aqui no Brasil, a região do Nordeste, especialmente na Bahia, destaca-se como maior produtor do cravo-da-índia sendo cultivados 8000 hectares que produzem anualmente 2500 toneladas de cravo-da-índia (CORTÉS-ROJAZ et al., 2014).

Na descrição de Soto; Burhanuddin (1995) e Anderson et al. (1997), o óleo do cravo-da-índia é um líquido amarelo claro, oleoso e obtido pela destilação das flores, caules e folhas da árvore *Syzygium aromaticum*, L.

Este composto, na visão de Reineccius (1994), é aromático fenólico de impacto sensorial médio. Importante indicar as várias atividades já estudadas do cravo-da-índia, como a antimicrobiana, a antioxidante, a antimutagênica, (MIYAZAWA: HISAMA, 2003), a anti-inflamatória (KIM et al., 1998), a antiulcerogênica (ZHENG et al., 1992), a antiparasitária (YANG et al., 2003), a antifúngica (PINTO et al., 2009) e anestésica para dores de dente (ALQAREER; ALYAHA; ANDERSSON, 2006).

Como todos os óleos essenciais são uma mistura de compostos, o óleo do cravo-da-índia tem como componente majoritário, o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), em concentração de 76,8 a 95% (BRIOZZO et al., 1989), outros compostos fenólicos em menor quantidade, como o β -cariofileno (17,4%), o α -humuleno (2,1%) e o acetato de eugenila (1,2%) (Figura 2), também estão presentes, conforme descrição de (CHAIEB et al., 2007).

Figura 2: Estrutura molecular dos principais compostos do Óleo Essencial de Cravo-da-Índia.



Fonte: Adaptado Catálogo Sigma Aldrich, 2018.

2.3 EUGENOL

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto natural ativo do óleo de cravo-da-índia, isolado e caracterizado como um fenilpropeno de cadeia curta de hidrocarbonetos, podendo ser produzido de forma sintética por alilação do guaiacol com cloreto de alila. Caracteriza-se por ser um líquido oleoso de cor amarelo claro quase pálido e odor característico ao do cravo (ITO; MURAKAMI; YOHIMO, 2005). O eugenol representado na Figura 2 estrutura química (A) é considerado um composto promissor para sínteses mais complexas e um substrato usado para diversas biotransformações (KAUFMAN, 2015).

Conforme Kamatou et al., (2012) separa-se o eugenol do óleo essencial, misturando-se o mesmo à solução salina com excesso de sódio aquoso (3%) ou a solução de hidróxido de potássio, formando um sal alcalino fenólico, removendo-se a

porção não dissolvida e submetendo a solução alcalina a baixas temperaturas, conseguindo a liberação do eugenol por purificação da destilação.

Na descrição da “*European Food Safety Authority*” - EFSA (2011), o eugenol é ligeiramente solúvel em água, miscível em água em temperaturas inferiores a 16 °C (SOTO, BURHANUDDIN, 1995). Quando submetido a altas temperaturas, o eugenol torna-se imiscível em virtude de sua alta densidade relativa (1,0676 g.cm⁻³ a 20°C) (SAYDMOHAMMED; PAL, 2009; WANNISSO et al., 2009), porém, observa-se que em solventes orgânicos, é solúvel (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O eugenol pode ser utilizado como aditivo natural, aromatizante e intensificador de sabor em bebidas alcólicas, como flavorizante em produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos, químicos e industriais (ROJO et al., 2008, KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Cabe destaque especial às propriedades biológicas do eugenol que podem ser antissépticas e antimicrobianas, pelo efeito bactericida e bacteriostático (BRIOZZO et al., 1989); antifúngicas e antilarvicida (PANDEY et al., 2013; RANA; RANA; RAJAK, 2011); antioxidantes, cito protetora, antígeno tóxica e anticancerígena; antiinflamatória e anticoncepcional (DANIEL et al., 2009), antimutagênica; anticoagulante; agente sedativo e anestésico (ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005). Além disso, ele atua como um antimicrobiano natural, usado normalmente como aromatizante em uma grande variedade de produtos cosméticos e alimentícios (KAUFMAN, 2015).

2.4 ACETATO DE EUGENILA

Classifica-se o acetato de eugenila como um éster aromático, com odor característico ao óleo de cravo-da-índia (Figura 2, fórmula estrutural (C)). Pode ser encontrado em quantidades menores nos óleos essenciais do Louro (*Lourus nobilis*), na Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e no cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Sua obtenção ocorre a partir da acetilação direta do eugenol com anidrido acético na presença de catalisadores (BURDOK, 2010 e PANDEY et al., 2013).

O acetato de eugenila pode ser utilizado como flavorizante de alimentos, por ser insolúvel em água, sendo absorvido rapidamente no trato intestinal, com metabolização hepática gerando produtos polares que se conjugam e são eliminados na urina. Na excreção, é hidrolisado para eugenol e ácido carboxílico (EFSA, 2011), portanto seguro para o consumo humano, mesmo sendo uma molécula com baixo teor aromático (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

Outras propriedades de interesse industrial do acetato de eugenila foram avaliadas e descritas por Kwang-Geun e Takayuki (2001) como, por exemplo, a atividade antioxidante em dois testes: no primeiro ensaio aldeído/ácido carboxílico, com resultado de inibição da oxidação do hexanal à ácido hexanóico e no segundo ensaio, lipídeo/malonaldeído, a oxidação do hexanal foi inibida em 99% pelo acetato de eugenila, pelo período de 30 dias em concentração de 200 mg.mL⁻¹. Quando as concentrações foram de 50 e 100 mg.mL⁻¹, houve inibição da oxidação do hexanal de 76 a 85% no prazo de 15 dias. Ainda, houve inibição da formação do malonaldeído em 79%, quando a concentração de acetato de eugenila foi de 160 mg.mL⁻¹, podendo ser comparada a antioxidantes como o α -tocoferol e butilhidroxitolueno (BHT). Estes ensaios permitem avaliar os efeitos antioxidantes contra fenômenos de oxidação lenta comum a períodos estendidos, como na conservação de alimentos.

O acetato de eugenila também apresentou ação inseticida em recentes pesquisas na quais esta ação foi testada frente as larvas do microcrustáceo *Artemia salina*, demonstrando um maior potencial toxicológico do éster comparado ao óleo de cravo (CANSIAN et al., 2016). Ação antifúngica contra várias espécies de *Candida sp*, demonstrando ser um eficiente fitoquímico, ocasionando danos celulares às células dos fungos causadores de infecções (MUSTHAFA et al., 2016).

Na percepção de Carrasco et al., (2008), a atividade anticancerígena do acetato de eugenila em células de câncer de próstata e câncer escamoso oral. Já Pasay et al., (2010) demonstrou em seus estudos a atividade acaricida do acetato de eugenila. O acetato de eugenila também tem efeito na erosão dentária na inibição da descalcificação e promoção da remineralização (CHARU et al., 2012).

A descrição do acetato de eugenila como antimicrobiano foi realizada por Chiaradia et al., (2012), em estudo que mediu seu potencial antimicrobiano frente ao eugenol e o cloranfenicol. Tal estudo foi testado em 16 diferentes tipos de bactérias com observância do melhor desempenho para o acetato de eugenila.

Tischer (2017), demonstrou em seus estudos a atividade antimicrobiana do éster acetato de eugenila tanto em bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo a maior inibição encontrada para *Listeria monocytogenes*. O efeito antimicrobiano do éster também foi comprovado pela concentração inibitória mínima, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* o microrganismo que foi inibido com menor concentração de acetato de eugenila.

2.5 LIPASES

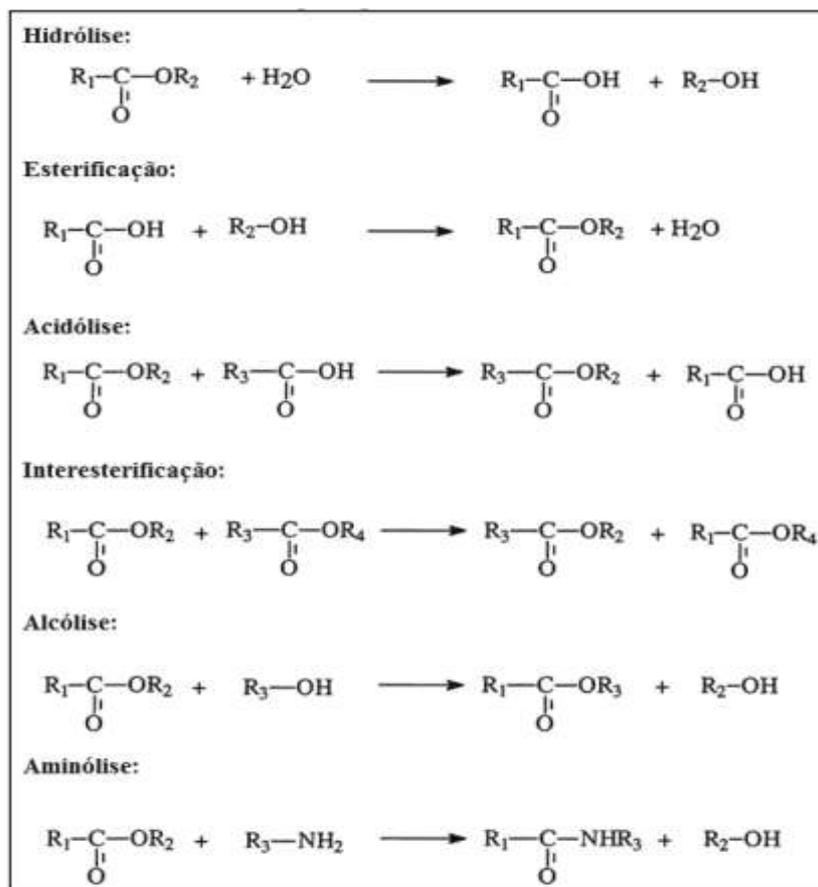
As lipases (triacilglicerol éster hidrolases - E.C.3.1.1.3) englobam um grupo de enzimas hidrolíticas que agem sobre a interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas de triacilgliceróis com a finalidade de liberar ácidos orgânicos e glicerol (BERGLUND, 2001).

Grupos de enzimas que apresentam ampla especificidade, reconhecendo uma diversidade de substratos. Quando se fala em enzimas, deve-se recordar que estas são proteínas com propriedades catalíticas específicas e seletivas que atuam com eficiência em condições brandas de temperatura, como também de pressão ambiente, transformando moléculas complexas (PANDEY et al., 1999).

São biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (VILLENEUVE et al., 2000).

As lipases são enzimas com função biológica de catalisar as reações de hidrólise das ligações éster presentes em triacilgliceróis, são facilmente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, que, devido à facilidade de produção em grande escala é a origem de grande parte das lipases utilizadas comercialmente (VILLENEUVE et al., 2000). As lipases microbianas estão sendo produzidas por diversas indústrias e não estão reféns às limitações de produção ou de suprimento, como a vegetal e animal (BENASSI et al., 2012). Estas por sua vez, são capazes de catalisar reações reversas a hidrólise, como a esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcólise) e aminólise (Figura 3).

Figura 3: Reações Catalisadas por Lipases.



Fonte: VILLENEUVE et. al. (2000)

A utilização destas enzimas ganha destaque na síntese e interesterificação de lipídeos, pois elas apresentam estabilidade em vários solventes orgânicos, amplo espectro de especificidade pelo substrato e boa conversão de reagente em produto (CAO et al., 2016).

Fisiologicamente, as lipases são um grupo especial das esterases que pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3 designadas como uma subclasse 3.1.1, pela especificidade das ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos com função biológica de conversão catalítica de gliceróis em di ou monoglicerois, ácidos graxos e glicerol (PATIL; CHOPDA; MAHAJAM, 2011; STERGIOU et al., 2013).

Sua atuação se dá na interface água-óleo ou óleo-água, dependendo do estado de agregação e estrutura do substrato, das propriedades moleculares da enzima e fatores que afetam ligações enzima-substrato, rearranjando estruturas, permitindo que o sítio ativo da enzima fique livre (PANDEY et al., 1999).

As lipases possuem características como, massa molar que variam de 20 a 75 kDA, uma faixa pH ótimo de 4 a 9, estáveis a temperaturas que oscilam de 30 a 70°C, mas com uma faixa ótima de 30 a 40°C (BORNSCHEUER, 2003).

Villeneuve et al., (2000) Dabdoub et al., (2009) e Cipolatti et al., (2014) apontam que as lipases podem ser inativadas por fatores químicos, físicos e biológicos, sendo difícil sua recuperação e reuso, aumentando os custos do processo e contaminado o produto com atividade enzimática residual. Dificuldades como estas exigem uma catálise eficiente com o uso de enzimas na forma imobilizada. Para tanto, deve-se utilizar técnicas de imobilização que estabilizam as enzimas e facilitam sua recuperação e reutilização, com melhor qualidade e obtenção do produto.

A enzima Lipozyme TL 100L é sintetizada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus*, sendo uma lipase 1,3 específica e deve ser armazenada em condições de 0 - 10°C, tem como temperatura ideal de reação de 20 a 50°C, faixa de pH ideal de uso de 7 a 10, sendo sua atividade de 100 KLU.g⁻¹. Apresenta-se na forma líquida, usada em reações de catálise, transesterificação, interesterificação e reações de hidrólise em geral, sendo usada especificamente para substratos ésteres (STREAM, 2018).

Já a Lipozyme® CALB L é uma lipase não específica obtida da *Candida Antarctica B*, esta é considerada estável em uma ampla faixa de pH (5 a 9), principalmente em pH alcalino e tem como temperatura ideal de reação de 30 a 60°C. Além disso, exibe maior especificidade para substrato ésteres e álcoois. Esta enzima tem sido amplamente utilizada na resolução de álcoois racêmicos, amins, ácidos. Os compostos opticamente puros resultantes são muito difíceis de obter por rotas alternativas, e pode ser de grande valor sintético. Possui uma atividade declarada 5 KLU.g⁻¹ e hidrolisa ligações éster em glicerídeos (STREAM, 2018).

Além destas enzimas lipases tem uma Lipase Home Made, produzida a partir da fermentação em estado sólido da semente de girassol com *Penicillium sumatrense*.

Conforme Patil; Chopda; Mahajam, (2011), as lipases atuam efetivamente obtendo compostos puros, boas quantidades de ésteres alifáticos e aromáticos, álcoois, ácidos e lactonas.

2.6 ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA

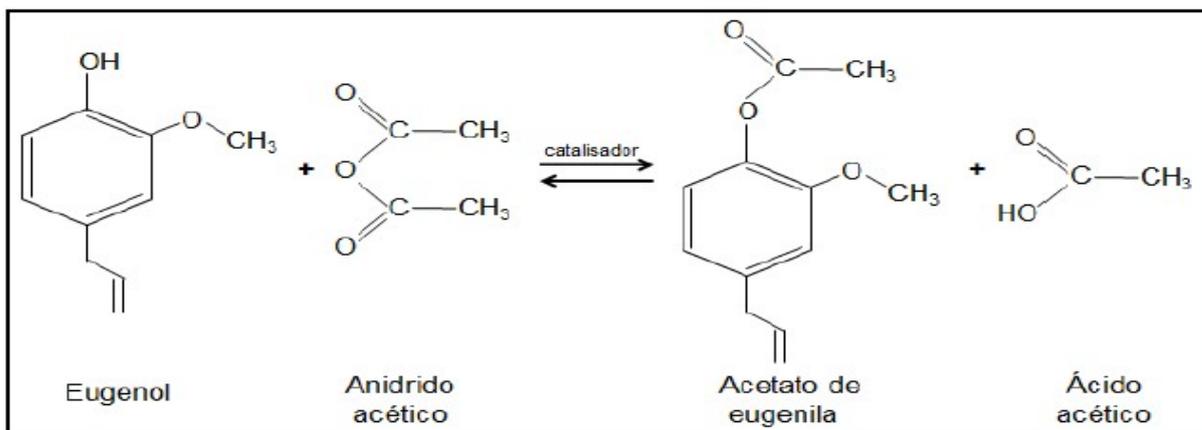
Lipases utilizadas como biocatalisadoras são vantajosas, pois além de serem uma tecnologia limpa, são seletivas, específicas e reduzem reações colaterais, sem falar que reagem onde catalisadores químicos não conseguem chegar. Ressalta-se que tanto o produto, quanto o biocatalisador, podem ser recuperados, com os custos de biocatálise semelhantes aos dos processos químicos (PANDEY et al., 1999; LIAQUAT; APENTEN, 2000).

Sistemas compactos, livres de solventes orgânicos na síntese de ésteres aromáticos tem grandes volumes de produção com concentrações menores de catalisadores em relação a reagentes. Sistemas assim reduzem os custos, os problemas de toxicidade resultante da recuperação do solvente, diminuindo impactos ambientais (GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002 e SANTOS et al., 2007).

Quando solventes são utilizados, as reações químicas heterogêneas tornam-se fáceis, principalmente em presença de uma substância tampão, contudo, o alto grau de toxicidade e formação de subprodutos indesejados destas reações (devido à baixa seletividade da síntese química), requer etapas subsequentes de purificação, aumentando os custos do processo e tendo o risco de manter resíduos tóxicos no produto final (SILVA, 2014). Além de tudo, 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 considerados como naturais, contanto que sejam obtidos a partir de substratos naturais, em sistema livre de solvente, e que o produto obtido seja de estrutura química conhecida (LONGO; SANROMÁN, 2006).

A acetilação enzimática possibilita a modificação da molécula do eugenol, com substituição do grupo hidroxila por outros compostos que melhoram sua funcionalidade. Uma possibilidade de modificação da molécula de eugenol pode ser pela reação de acetilação, obtendo-se acetato de eugenila, com um grupamento acetil mais estável e lipofílico, conforme Figura 4.

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



Fonte: Burdock (2010).

Produtos provenientes de síntese enzimática serão naturais se obtidos de substratos naturais, com sistema livre de solventes (LONGO; SAROMÁN, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a descrição dos materiais, equipamentos e as técnicas analíticas utilizadas durante o trabalho. Além disso, são apresentados os testes utilizados para a determinação das características físico-químicas do óleo essencial e determinação qualitativa e/ou quantitativa dos compostos do óleo essencial, como compostos da reação de síntese obtidas do planejamento experimental e estudo cinético de conversão. Também é apresentada a caracterização do material obtido da síntese.

3.1 PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA HOME-MADE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO

Preparar cerca de 1 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7 para cada 10g de substrato (sementes de girassol). Autoclavar a solução tampão e erlenmeyers de vidro com o substrato. Colocar 300 mL da solução com o Tween 80 com bolinhas de vidro para fazer a solução de esporos na concentração adequada.

3.1.1 Esterilização de meios e equipamentos

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados no procedimento são esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

3.1.2 Estoque e Manutenção das Cepas

As cepas são inoculadas em meio BDA (batata, dextrose, ágar) contendo o antibiótico cloridrato de tetraciclina (250 mg/L de meio BDA), sendo repicadas mensalmente e também em estoque em óleo mineral, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

3.1.3 Preparação dos Substratos

Foi utilizado como substrato com alto teor lipídico, a torta de crambe (*crambe abyssinica hochst*), fornecida pela indústria Fundação MS do Mato Grosso do Sul.

Este substrato foi utilizado na fermentação do estado sólido (FES) para a produção de lipases, o qual, ainda fresco, foi moído, tamisado e embalado em embalagens plásticas, sendo utilizadas as frações do substrato com diferentes granulometrias para os estudos de FES.

3.1.4 Condições de Cultivo no Meio Sólido

Os ensaios de FES foram realizados da seguinte forma: para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio ágar batata – cloridrato de tetraciclina (250 mg/L de meio BDA). O fungo *Penicillium sumatrense* foi incubado em estufa a 27°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a maceração do meio utilizando pedras de porcelana e adição de água estéril no material seguido de solubilização.

Para a FES foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, contendo, 10 g de substrato semente de girassol, com um teor de umidade de 60% e tampão fosfato de sódio pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em triplicata. Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo, mantendo-se uma quantidade final no meio sólido de aproximadamente 10^8 esporos/mL. As condições otimizadas para a FES foram estabelecidas previamente pelo grupo de pesquisa da Profa. Maria Luiza Fernandes Rodrigues, Unioeste-Toledo, que encontrou as seguintes condições: 27 °C, 96 horas de fermentação e com 60% de umidade.

A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U/gSS).

3.1.5 Secagem

Os sólidos fermentados foram congelados a 0°C por 24 h para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos na estufa de circulação de ar, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em geladeira.

3.1.6 Extração da Enzima

A enzima foi extraída do material fermentado com 500 mL de solução aquosa de NaCl 1% (m/v). A mistura de 50 g de sólido fermentado com 500 mL de solução extratora foi colocada em agitador magnético durante 1:30 h e então, filtrada em gaze, sendo o sólido prensado manualmente para extração do líquido, o qual contém a lipase. O extrato resultante foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante da centrifugação, denominado extrato bruto (EB).

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

Para obtenção do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), utilizou-se botões florais secos, da marca Iremar Alimentos obtidos no atacado da cidade de Toledo-PR. Utilizou-se a técnica de destilação de arraste à vapor d'água, com um destilador Clevenger óleos essenciais (SL-76 Solab) acoplado a um banho termostaticado (TE-2005 Tecnal) como mostra a Figura 5.

Figura 5: Destilador Clevenger Óleos Essenciais com Banho Termostaticado.



Fonte: O autor.

Foram realizados 5 testes de destilações por arraste à vapor d'água utilizando-se aproximadamente 200 g de botões florais de cravo-da-índia secos, em cada teste, obtidos do mesmo lote. Em cada teste, os botões florais foram previamente

triturados em moinho elétrico (Metavisa) para diminuição dos tamanhos dos botões florais e conseqüentemente, aumento da área superficial de contato do material. Devido o cesto do destilador Clevenger ter orifícios de diâmetro muito grande para suportar o material adaptou-se uma tela para suportar o material para realizar a extração do óleo. A Figura 6 mostra o material utilizado para obtenção do óleo essencial de cravo-da-índia.

Figura 6: Botões florais secos e triturados de Cravo-da-Índia.



Fonte: O autor.

A Tabela 1 demonstra a quantidade de botões florais secos utilizados em cada teste e o tempo de destilação utilizado para obtenção do óleo essencial de cravo-da-índia.

Tabela 1: Massa de botões florais de cravo-da-índia e seus respectivos tempos de destilação.

Teste	Massa (g)	Tempo de Destilação (min)
1	200,1067	63
2	200,0255	65
3	200,2673	61
4	200,0341	63
5	200,1280	62

Fonte: O autor.

O óleo essencial foi coletado em um frasco de vidro âmbar com auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. O restante do material extraído (água + óleo) foi deixado decantar para obter uma quantidade de óleo. Todo o óleo extraído foi seco, por meio de percolação de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), por duas vezes ao material. O óleo

essencial foi armazenado sobre refrigeração em geladeira, em frasco de vidro âmbar para evitar a possível perda dos compostos voláteis.

O rendimento da extração do óleo essencial de cravo-da-índia foi calculado utilizando-se a relação massa/volume e massa/massa, sendo o volume obtido no sistema de extração através da destilação por arraste de vapor d'água em destilador Clevenger.

3.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO

3.3.1 Determinação da Densidade Relativa

Pesou-se o picnômetro (Prolab) limpo, previamente seco e anotou-se o valor obtido. Determinou-se a massa da água purificada, preenchendo o picnômetro com água purificada a 20°C, pesou-se e anotou-se o valor. Secou-se o picnômetro e pesou-se novamente. Em seguida, preencheu-se com o óleo essencial e removeu-se qualquer excesso da substância, pesou-se e anotou-se a massa obtida com o óleo. Com os valores encontrados calculou-se a densidade pela equação:

$$\rho = \frac{m \text{ óleo} - m \text{ vazio}}{m \text{ água} - m \text{ vazio}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que ρ é a densidade relativa da amostra, $m \text{ óleo}$, $m \text{ vazio}$ e $m \text{ água}$ são as respectivas massas do picnômetro com o óleo, vazio e com água purificada (*The United States Pharmacopeial* – USP 41, 2018).

3.3.2 Determinação do Índice de Refração

Para determinação do índice de refração do óleo utilizou-se o refratômetro Abbe Quimis. Zerou-se o equipamento com água purificada a 20 °C. Na sequência o prisma foi limpo e colocou-se 2 gotas do óleo no prisma e fechou-se a placa de cobertura pressionando suavemente. Apontou-se a extremidade frontal do refratômetro para a direção da luz branca e realizou-se a leitura na escala correspondente ao limite entre a luz clara/escuro. Executou-se este procedimento em

duplicata e calculou-se a média das leituras para obter o valor do índice de refração para o óleo essencial de cravo-da-índia (*The United States Pharmacopeial – USP 41, 2018*).

3.3.3 Determinação da Água em % no Óleo Essencial

Para determinação da água presente no óleo utilizou-se o Titulador Automático Karl Fischer – 870 KF Titrino Plus Metrohm Pensalab. Adicionou-se aproximadamente, 20 mL de Metanol Anidro (Sigma Aldrich), condicionando o meio e efetuou-se a padronização da solução titulante. Após a padronização recondicionou-se o meio e introduziu-se 500 mg da amostra para obter-se o teor de água em % presente na amostra de óleo (BRASIL, 2010).

3.3.4 Determinação da Cor

Para o teste de cor, a técnica utilizada foi a comparação da cor do óleo essencial com cores conhecidas através de um fundo branco.

3.3.5 Determinação da Aparência

Para determinação da aparência utilizou-se a técnica visual na qual comparou-se o óleo essencial, no que diz respeito à sua limpidez e transparência.

3.3.6 Determinação da Solubilidade em Etanol (70%)

A solubilidade foi testada utilizando-se um balão volumétrico de 5 mL contendo um volume de 1 mL do óleo essencial e adicionou-se a este balão quantidades proporcionais crescentes de uma mistura de etanol/água a 70% (v/v) até completa solubilização (*The United States Pharmacopeial – USP 41, 2018*).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A quantificação e identificação dos principais constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) foi determinada por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo modelo 7890B da Agilent, com detector *Flame Ionization Detector* (FID), conforme Figura 7.

Figura 7: Cromatógrafo Gasoso Agilent 7890B com FID.



Fonte: O autor.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna capilar Agilent DB-1, 100% dimetilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de filme de revestimento) com a temperatura da coluna em 280 $^{\circ}\text{C}$ em isoterma por 15 minutos; temperatura de injetor 290 $^{\circ}\text{C}$; temperatura do detector 290 $^{\circ}\text{C}$; modo de injeção split, razão de split 100:1; gás de arraste hélio com vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; gás nitrogênio com gás *make up* a 35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; gás hidrogênio e ar sintético com fluxo de 30 e 300 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente como gás de chama. Utilizou-se Ciclohexano (Merck, grau CG, pureza $\geq 99,5\%$) como solvente de limpeza da agulha. O volume de injeção de 1,0 μL de amostra.

Para identificação dos compostos foram preparadas soluções qualitativas de padrões de Eugenol (Sigma-Aldrich, pureza de 99%), β -Cariofileno (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 80\%$), Humuleno (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 96\%$), e Acetato de Eugenila (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98\%$), sendo estes diluídos em Ciclohexano (Merck, grau CG, pureza $\geq 99,5\%$). Os padrões foram injetados separadamente para obter-se o

tempo de retenção de cada um dos constituintes e juntos para ter o padrão com todos os componentes.

Para determinação da concentração do Eugenol, β -Cariofileno, Humuleno e Acetato de Eugenila no óleo essencial utilizou-se o método de normalização, no qual fez-se a integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos obtidos de uma amostra diluída 1/10 em Ciclohexano e injetada em triplicata no sistema. O software utilizado para a aquisição dos dados no cromatógrafo foi o *Empower Enterprise 3* da Waters.

3.5 PROCEDIMENTO GERAL DE SÍNTESE DO ACETATO DE EUGENILA

A síntese do acetato de eugenila foi realizada adicionando-se em um sistema reacional, o óleo essencial de cravo-da-índia como material de partida, com o reagente anidrido acético até completa dissolução. A proporção molar dos substratos colocados no meio reacional foi estabelecida considerando-se a massa molar de anidrido acético (102 g.mol^{-1}) e a concentração em percentagem de eugenol, presente no óleo essencial de cravo-da-índia (87,7%), com massa molar do eugenol de 164 g.mol^{-1} . Dessa forma, 187 g do óleo equivale a 1 mol de eugenol. Em seguida, ao sistema reacional foi adicionado o catalisador enzimático (lipases) e o tempo reacional foi considerado a partir da adição dele. Após o tempo final da reação, o catalisador foi filtrado em papel filtro e lavado com solvente Ciclohexano (Merck, grau CG, pureza $\geq 99,5\%$). Em seguida o solvente foi evaporado em rota-evaporador, as amostras foram mantidas, sob refrigeração (2 a 8 °C) em frascos âmbar para serem analisadas.

3.6 SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Foram realizados testes com 3 catalisadores: uma enzima lipase Liofilizada – *Home Made* produzida a partir da fermentação em estado sólido da semente de girassol com *Penicillium sumatrense* e duas enzimas comerciais a Lipozyme TL 100L e a Lipozyme CALB L). As amostras foram preparadas em triplicata para verificar qual enzima seria mais eficiente na conversão do eugenol em acetato de eugenila: Foram utilizadas as condições experimentais otimizadas por Chiaradia et al., (2012), na

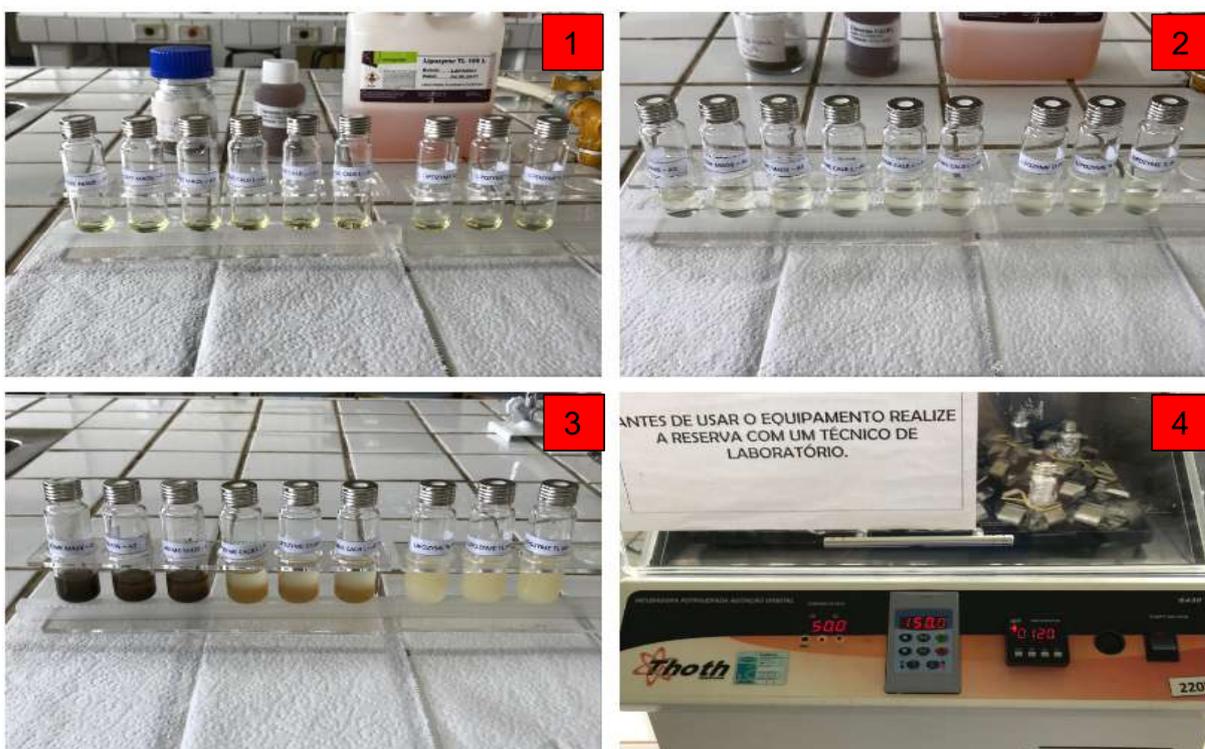
produção de acetato de eugenila, via síntese catalisada por Novozym 435, onde as melhores condições para uma elevada conversão em acetato de eugenila foram: concentração de enzima 5,5 % (m/m em relação à massa total de substratos), razão molar (eugenol : anidrido acético) 1:3, temperatura de 50°C, velocidade de agitação 150 rpm e tempo de reação de 2 horas.

A Figura 8 demonstra as etapas realizadas:

- ✓ Etapa 1 - Transferência do óleo essencial de cravo-da-índia para os frascos de vidro.
- ✓ Etapa 2 - Adição da quantidade de Anidrido Acético (Isofar) para solubilização do óleo essencial.
- ✓ Etapa 3 - Adição dos respectivos catalisadores aos frascos de vidros.
- ✓ Etapa 4 - Agitação com aquecimento em Incubadora Refrigerada de Agitação Orbital (Thoth).

Também foi realizado um teste sem a utilização do catalisador na reação (teste controle). A partir dos resultados da conversão obtidos nessa etapa, obteve-se a definição do melhor biocatalisador para os demais testes do planejamento experimental.

Figura 8: Etapas do teste de definição do melhor Catalisador.



Fonte: O autor.

3.7 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Após a seleção do catalisador, para determinação das condições experimentais que otimizem a síntese do acetato de eugenila, resultantes da reação de acetilação, foram realizados planejamentos experimentais, com triplicata do ponto central, em um total de 11 ensaios, avaliando a razão molar (eugenol: anidrido acético), temperatura e teor de catalisador na procura da melhor condição para a produção de acetato de eugenila. A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2³, com as variáveis reais e codificadas que foram testadas com o catalisador definido.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2³, com as variáveis reais, codificadas e com o catalisador ideal.

Níveis	Razão Molar*	Temperatura (°C)	Teor Enzima (%)
1	1:1 (-1)	45 (-1)	5 (-1)
2	1:5 (1)	45(-1)	5 (-1)
3	1:1 (-1)	55 (1)	5 (-1)
4	1:5 (1)	55 (1)	5 (-1)
5	1:1 (-1)	45 (-1)	10 (1)
6	1:5 (1)	45 (-1)	10 (1)
7	1:1 (-1)	55 (1)	10 (1)
8	1:5 (1)	55 (1)	10 (1)
9	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)
10	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)
11	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)

*Eugenol:Anidrido acético.

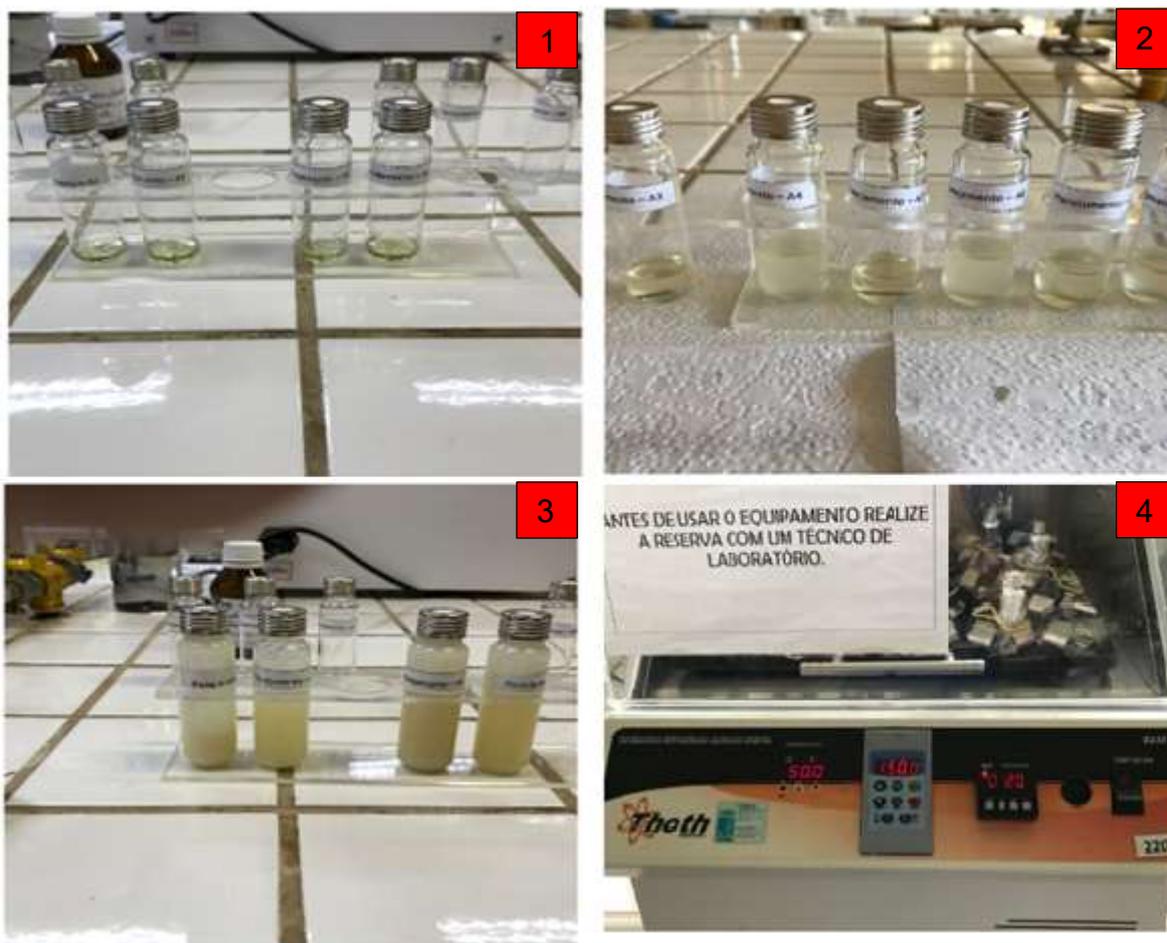
Fonte: O autor.

A Figura 9 demonstra as etapas realizadas utilizando o catalisador selecionado (enzima Lipozyme TL 100L):

- ✓ Etapa 1 - Transferência do óleo essencial de cravo-da-índia para os frascos de vidro.
- ✓ Etapa 2 - Adição da quantidade de Anidrido Acético (Isofar) para solubilização do óleo essencial.

- ✓ Etapa 3 – Adição do catalisador (enzima Lipozyme TL 100L) aos frascos de vidros.
- ✓ Etapa 4 – Agitação com aquecimento em Incubadora Refrigerada de Agitação Orbital (Thoth).

Figura 9: Etapas do planejamento fatorial completo 2³.



Fonte: O autor.

3.8 ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Após determinação do melhor catalisador no processo enzimático e as condições experimentais adequadas para otimização da síntese foi avaliada a cinética de conversão do sistema reacional com os seguintes tempos de reação: 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Este teste foi realizado com a razão molar na proporção 1:1 eugenol:anidrido acético, temperatura de 55°C e concentração da enzima Lipozyme TL 100L de 10%, sendo está a condição otimizada apresentada no

planejamento. Para quantificação do acetato de eugenila preparou-se uma curva de calibração utilizando padrão de Acetato de Eugenila (Sigma Aldrich) pureza superior a 98%, nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.9 DETERMINAÇÃO DA % DE CONVERSÃO EM ÉSTER NA REAÇÃO

Para quantificação da % de conversão em éster na reação foi utilizado um cromatógrafo gasoso modelo 7890B da Agilent, com detector *Flame Ionization Detector* (FID). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna capilar Agilent DB-1, 100% dimetilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de filme de revestimento) com a temperatura da coluna em 280 °C isoterma por 15 minutos, temperatura de injetor 290 °C, temperatura do detector 290 °C, modo de injeção split, razão de split 100:1, gás de arraste hélio com vazão de 1 mL.min^{-1} , gás nitrogênio com gás *make up* a 35 mL.min^{-1} , gás hidrogênio e ar sintético com fluxo de 30 e 300 mL.min^{-1} , respectivamente como gás de chama. Utilizou-se Ciclohexano (Merck, grau CG, pureza $\geq 99,5\%$) como solvente de limpeza da agulha. O volume de injeção de 1,0 μL de amostra solubilizada em Ciclohexano (1:10)

A determinação da % conversão em éster nas reações de síntese do acetato de eugenila foi realizada acompanhando-se a redução na área do sinal do agente limitante (eugenol) bem como o aparecimento do pico de produto. A área do pico da mistura reacional sem o catalisador (branco) e a área do pico da reação foram relacionadas pela Equação 2.

$$QC(\%) = \frac{100 (100 \times Ac)}{A_{branco}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: QC (%) é a quantidade convertida em acetato de eugenila, Ac é a área do pico da conversão e A_{branco} é a área do pico do branco. Utilizou-se como padrão químico, para identificação do pico correspondente ao éster produzido o acetato de eugenila (Sigma Aldrich pureza $\geq 98\%$).

3.10 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO (ACETATO DE EUGENILA)

O produto das reações enzimáticas foi purificado lavando-se o mesmo com solução de NaOH 0,1N e Ciclohexano na fração 1:3 (25:75 mL). Após a lavagem, em funil separou-se a fração orgânica (ciclohexano) da fração aquosa (solução de NaOH + ácido acético da reação). A fração aquosa foi submetida a uma nova lavagem e, em seguida, levou-se a fração orgânica para o rotaevaporador a 40 °C por 2 horas. Após estas etapas, as amostras obtidas foram analisadas em CG-FID. Verificou se o material apresentava resíduo de ácido acético da reação preparando-se uma solução padrão de Ácido Acético grau CG, 99,7% da JT.Baker e solução amostra da purificação 0,5 mL diluída em 10 mL de Diclorometano Sigma-Aldrich, de pureza \geq 99,8%. O sistema cromatográfico foi configurado utilizando as seguintes condições: gás de arraste hélio, volume de injeção de 0,6 μ L, split 1:15, detector FID a temperatura de 250°C, injetor a 180°C, fluxo a 5 mL.min⁻¹, coluna Phenomenex ZB-Wax G16 (Polietilenoglicol 100%) 30m x 0,32mm, 50 μ m e a temperatura da coluna foi configurada conforme Tabela 3.

Tabela 3: Temperatura da coluna.

Taxa de Aquecimento (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo mantém Temperatura (min)	Tempo de Corrida (min)
-	40	1	1
20	40 - 180	0	7
50	180 - 250	3,6	12

Fonte: Adaptado – USP <467> *Residual Solvents Method*, 2018.

3.11 CARACTERIZAÇÃO DO ACETATO DE EUGENILA

3.11.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

Com a finalidade de identificação das principais funções químicas da molécula sintetizada, realizou-se a leitura da amostra obtida em espectrofotômetro de infravermelho médio **PerkinElmer 400** com uso de aparato ATR. Configurou-se o equipamento para 16 scans e resolução de 2.0 e realizou-se a varredura da de uma pequena quantidade de amostra na região de 4000 a 650 cm⁻¹.

3.11.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (^1H e ^{13}C)

Os espectros de RMN 1D e 2D foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III HD 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Chanel Inverse) de 5 mm na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP – SP). Os deslocamentos químicos de ^1H foram referenciados de acordo com o pico do solvente DMSO- d_6 (δ_{H} 2,50 - Sigma-Aldrich), utilizado para solubilizar a amostra. Os deslocamentos químicos de ^{13}C também foram referenciados de acordo com o pico do solvente DMSO- d_6 (δ_{C} 39,5).

3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para tratamento dos dados (resultados obtidos no planejamento experimental) foi utilizado o software de análise estatística StatSoft Statistica versão 10.0, utilizando um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

O rendimento das extrações foi calculado a partir da quantidade de óleo essencial que se obteve com cada massa de botões florais secos e pré-triturados. Com base nas extrações do cravo-da-índia obteve-se uma média de 11,2 mL de óleo essencial em cada extração e um rendimento médio em massa de 11,7 g. Como a densidade do óleo foi determinada em 1,041 g.mL⁻¹, o rendimento médio m/m foi calculado em 5,83%. Os dados de rendimento de todas as extrações realizadas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimento de Óleo Essencial das Extrações do de Cravo-da-índia.

Teste	Volume (mL)	Massa (g)	(%)
1	11,5	12,0	5,98
2	12,5	13,0	6,51
3	10,5	10,9	5,46
4	12,0	12,5	6,24
5	9,5	9,9	4,94
Média	11,2	11,7	5,83

Fonte: O autor.

Segundo Reis (2006), que obteve em seus trabalhos rendimentos de massa/volume do óleo essencial dos talos e frutos secos de cravo-da-índia em torno de 15%, o baixo rendimento quando este comparado com os experimentos da tabela 4, pode ser determinado ao fato do período da coleta das amostras, estocagem e do clima que interfere na constituição do óleo.

No estudo de Radünz (2017), também foi obtido rendimentos baixos, com variação de 1,87% a 8,88%, utilizando-se a hidrodestilação para obtenção do óleo essencial de cravo-da-índia e este apresentou três componentes: eugenol, cariofileno e α -cariofileno, sendo o majoritário o eugenol com 56,06%.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO

Um óleo essencial de qualidade depende de vários parâmetros tais como solubilidade em diferentes solventes orgânicos, densidade, índice de refração, entre outros. Estes parâmetros são importantes, pois são utilizados para a verificação da qualidade do material vegetal, além do controle da pureza e identidade do óleo. A Farmacopeia Americana (*The United States Pharmacopeial* – USP 41, 2018) descreve na monografia do “*Clove Oil*” do óleo de cravo-da-índia vários testes específicos para verificar a qualidade deste material, dentre eles estão os citados anteriormente, sendo que para cada parâmetro/teste estabelece limites de especificação.

Os resultados dos testes físico-químicos com o óleo essencial de cravo-da-índia obtido estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos obtidos nos testes realizados com o óleo essencial de cravo-da-índia.

Parâmetros Físico-Químicos	Resultados	Especificação
Densidade (g/mL)	1,041	1,038 – 1,060
Índice de Refração (20°C)	1,531	1,527 – 1,535
Cor	Amarelo Claro	-
Aparência	Líquido límpido	-
Odor	Característico	-
Água	0,15%	-
Solubilidade em Etanol (70%)	1:2	1:2

Fonte: O autor.

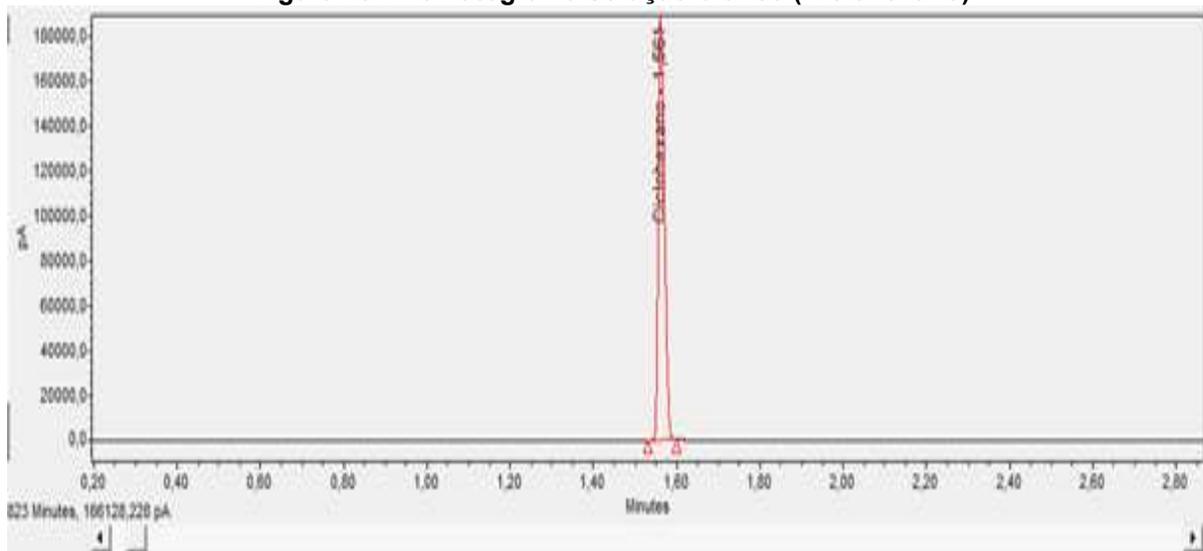
Os resultados demonstram que o óleo essencial obtido apresenta qualidade satisfatória, pois quando comparados os valores dos parâmetros de densidade (1,041 g/mL), índice de refração (1,531) e solubilidade em etanol 70%, na qual o óleo essencial foi solúvel na proporção de 1:2 com os valores de especificação para os testes obtidos da monografia do “*Clove Oil*” da USP 41, os valores ficaram dentro dos limites de especificação.

Os resultados de cor e aparência apresentados pelo óleo testado foram considerados como típicos, ou seja, líquido amarelo claro e límpido, denotando características próprias do óleo essencial de cravo-da-índia, conforme também descritas por Anderson *et al.*, (1997), como um líquido amarelo, oleoso e imiscível em água.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Utilizou-se de cromatografia gasosa acoplada detector de ionização em chama para separar e quantificar os constituintes do óleo essencial. O cromatograma da Figura 10, apresenta o pico do branco (ciclohexano), com tempo de retenção de 1,6 minutos.

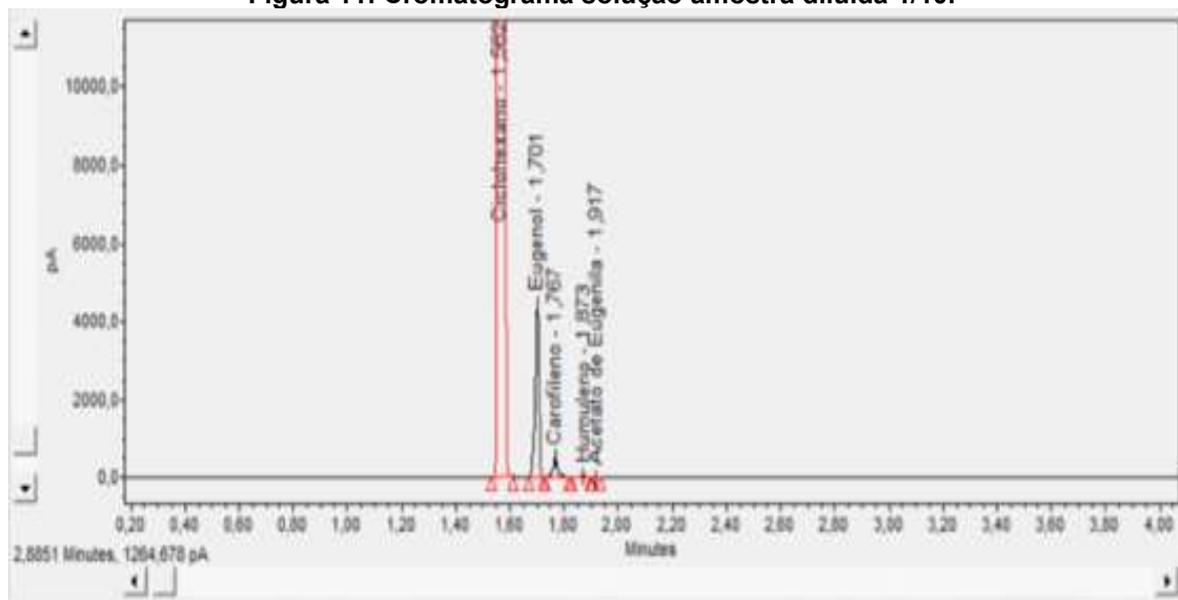
Figura 10: Cromatograma solução branco (Ciclohexano).



Fonte: O autor.

O cromatograma da Figura 11, que é da solução amostra, apresenta o pico do composto majoritário do óleo de cravo-da-índia que correspondente ao eugenol (pico 2) com tempo de retenção de 1,7 minutos. Os demais picos mostrados correspondem a: cariofileno (pico 3), humuleno (pico 4) e acetato de eugenila (pico 5), com os seguintes tempos de retenção, respectivamente: 1,8 min, 1,9 min, e 2,0 minutos

Figura 11: Cromatograma solução amostra diluída 1/10.



Fonte: O autor.

Na Tabela 6 são apresentados os compostos presentes no óleo juntamente com seus teores.

Tabela 6: Resultados do teor em % do Constituintes do Óleo Essencial de Cravo-da-Índia obtidos por Normalização.

Teste	Eugenol (%)	Cariofileno (%)	Humuleno (%)	Acetato de Eugenila (%)
1	86,66	12,18	1,06	0,10
2	87,10	11,74	0,88	0,12
3	86,84	11,18	0,84	0,12
Média	86,87	11,70	0,93	0,11

Fonte: O autor.

O maior teor obtido está relacionado ao pico 2 do cromatograma (86,87%), que confirma o eugenol como o componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, seguido pelo cariofileno (pico 3) com 11,70%, Humuleno (pico 4) com 0,93% e acetato de eugenila (pico 5) com 0,11%. Sendo, o percentual encontrado do eugenol próximo de alguns autores, como Costa et al. (2011), que encontraram em suas análises um percentual de eugenol de 83,6%. E também, Oliveira et al. (2009), que encontrou um percentual semelhante para o eugenol, 88,38%. O percentual de acetato de eugenila encontrado foi de 0,11%, em alguns trabalhos, como o de Radünz

(2017), este composto não foi encontrado na determinação dos componentes do óleo essencial de cravo-da-índia.

4.4 SELEÇÃO DO MELHOR BIOCATALISADOR NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Foram avaliados três biocatalisadores (enzimas lipases) na reação de esterificação de acetato de eugenila, utilizando-se como substrato o óleo essencial de botões florais de cravo-da-índia (eugenol) e anidrido acético, nas condições experimentais otimizadas obtidas por Chiaradia et al. (2012): temperatura a 50 °C, razão molar 1:3 (eugenol:anidrido acético), concentração de enzima 5,5%, velocidade de agitação de 150 rpm e tempo de 2 horas. A Tabela 7 apresenta os resultados das conversões em acetato de eugenila, com os diferentes biocatalisadores.

Tabela 7: Conversões de Acetato de Eugenila para os biocatalisadores condições fixas de reação, durante 2 horas de reação.

Enzimas Testadas	Razão Molar*	Temperatura (°C)	Teor Enzima (% m/m)	Conversão Experimental (%)	Média (%)	DPR (%)**
Home - Made	1:3	50	5,5	70,31		
Home - Made	1:3	50	5,5	73,30	73,4	4,2
Home - Made	1:3	50	5,5	76,50		
Lipozyme CALB L	1:3	50	5,5	57,14		
Lipozyme CALB L	1:3	50	5,5	62,28	58,3	6,0
Lipozyme CALB L	1:3	50	5,5	55,53		
Lipozyme TL 100 L	1:3	50	5,5	82,75		
Lipozyme TL 100 L	1:3	50	5,5	88,14	85,4	3,2
Lipozyme TL 100 L	1:3	50	5,5	85,18		

*Eugenol:Anidrido acético

**Desvio Padrão Relativo

Fonte: O autor.

Constatou-se, de acordo com a Tabela 8, que com o uso da lipase Lipozyme TL 100L obteve-se maior conversão em éster (88,14%), enquanto as conversões obtidas com o uso da Home Made e Lipozyme CALB L foram de 76,50 e 62,28%, respectivamente. Dessa forma, a Lipozyme TL 100L foi considerada como o biocatalisador mais específico para o sistema reacional formado por eugenol e anidrido acético na seleção do melhor biocatalisador. Com a amostra analisada sem a presença do catalisador (teste branco) obteve-se uma conversão de 37,20%, demonstrando que as enzimas têm efeito positivo na conversão.

Em comparação entre as enzimas utilizadas, a lipase comercial Lipozyme TL 100L apresentou maior conversão que a lipase comercial Lipozyme CALB L, devido ao fator atividade enzimática onde este é de 100 KLU.g⁻¹ contra 5 KLU.g⁻¹, respectivamente.

A atividade enzimática das lipases é um parâmetro importante no comportamento das enzimas, pois é medida em termos de unidade de lipase/unidade de interesterificação (LU/IUN), e pode ser definida como a quantidade de enzimas que é capaz de catalisar e modificar 1 µmol de substrato por minuto de reação, certamente, conforme as condições experimentais pré-estabelecidas. Dessa forma, a comercialização das enzimas é realizada em termos de atividade ou pela atividade específica, LU/IUN.g⁻¹ de proteína (FERREIRA, 2017; STREAM, 2018).

Em um estudo realizado por Silva (2014), onde também foram testadas diferentes lipases (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) para utilização na biocatálise do éster acetato de eugenila, empregando-se as mesmas condições experimentais otimizadas por Chiaradia et al. (2012), Silva (2014) também obteve conversões do éster superiores a 80%, com a enzima Lipozyme TL IM, que foi o biocatalisador selecionado para os estudos de planejamento experimentais.

A síntese de acetato de eugenila, em modo contínuo em reatores de leito fixo empacotado utilizando lipase Lipozyme TL IM usando condições otimizadas alcançou o valor de 93,1% de conversão, sendo excelente para a obtenção de ésteres de eugenol (MACHADO, 2018).

Com o uso da enzima Home-Made a conversão média em éster foi de 73,4%, um valor superior quando comparada com a enzima comercial Lipozyme CALB L que obteve nas reações uma conversão média de 58,3%.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Para realizar os experimentos utilizou-se a lipase Lipozyme TL 100L, pois foi o melhor biocatalisador. No estudo das variáveis que interferem na biocatálise adotou-se um planejamento experimental fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. Neste planejamento foram avaliados a razão molar (eugenol:anidrido acético), temperatura e concentração de catalisador. O a velocidade de agitação do meio reacional foi mantida em 150 rpm em shaker, assim como, tempo

de reação foi mantido fixo em 2 horas. A Tabela 8, mostra os resultados do planejamento experimental fatorial completo 2^3 com as variáveis reais e codificadas e as respostas em termos de conversão em acetato de eugenila.

Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com as variáveis reais, codificadas e com o catalisador ideal.

Testes	Razão Molar*	Temperatura (°C)	Teor Enzima (% m/m)	Conversão Experimental (%)
1	1:1 (-1)	45 (-1)	5 (-1)	38,12
2	1:5 (1)	45(-1)	5 (-1)	47,10
3	1:1 (-1)	55 (1)	5 (-1)	82,15
4	1:5 (1)	55 (1)	5 (-1)	68,23
5	1:1 (-1)	45 (-1)	10 (1)	58,50
6	1:5 (1)	45 (-1)	10 (1)	77,18
7	1:1 (-1)	55 (1)	10 (1)	91,80
8	1:5 (1)	55 (1)	10 (1)	88,85
9	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)	66,70
10	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)	67,50
11	1:3 (0)	50 (0)	7,5 (0)	64,30

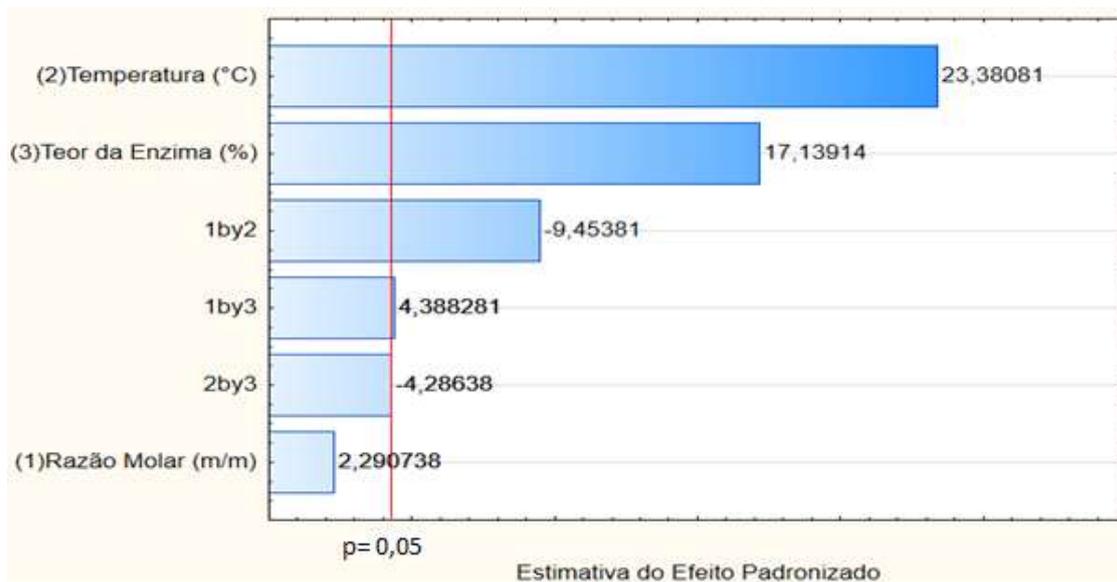
*Eugenol:Anidrido Acético

Fonte: O autor.

No planejamento experimental apresentado pela Tabela 8, pode-se observar que a maior conversão em acetato de eugenila ocorreu no ensaio 7 (91,80%), com a menor razão molar, ou seja, 1:1 (mol/mol) bem como 10% (m/m) de catalisador, mantendo-se a temperatura fixa em 55°C. Também, pode-se observar conversões semelhantes para os ensaios 3 e 8, que apresentaram valores acima de 82% em termos de conversão em acetato de eugenila, cujo os valores de conversão foram influenciados pela maior temperatura de 55°C.

O diagrama de Pareto, na Figura 12, confirma que a temperatura teve efeito positivo bem como o teor de enzima, indicando que o aumento destas variáveis pode conduzir a maiores conversões. Da mesma forma, a condição de temperatura de 55°C e teor da enzima de 10% foram significativos sobre a conversão em acetato de eugenila, onde ($p < 0,05$). Já a razão molar eugenol/anidrido acético apresentou efeito não significativo em termos de conversão em acetato de eugenila.

Figura 12: Diagrama de Pareto mostrando o efeito da razão molar, temperatura e teor da Enzima na produção de acetato de eugenila.



Fonte: O autor.

A estimativa do efeito padronizado tem grande valia, pois este indica quanto uma variável independente exerce influência sobre a variável dependente que seria a variável resposta. Quando a estimativa se apresenta positiva o efeito sobre a resposta indica que o aumento desta variável acarreta um aumento no valor da variável resposta. Quando a estimativa se apresenta negativa, o valor da resposta diminui em relação ao aumento do nível mínimo para o máximo (BARROS NETO et al., 2003).

Considerando-se as interações entre as variáveis independentes, observa-se pelo Gráfico de Pareto que a interação razão molar e temperatura tiveram um efeito negativo significativo para a conversão de acetato de eugenila, já a interação razão molar e teor da enzima tiveram um efeito positivo significativo, onde considerou-se $p < 0,05$. A interação temperatura e teor da enzima apresentou um p-valor de 0,0503, sendo considerada significativa para a conversão de acetato de eugenila.

Em estudo realizado por Tischer (2017) para conversão de eugenol em acetato de eugenila, esta obteve valores de conversões significativas (94,85%) no planejamento experimental utilizando a razão molar de 1:1 (mol/mol) bem como 1% (m/m) de catalisador, mantendo-se a temperatura fixa em 70°C empregando uma resina comercial, a Lewatit® GF 101 como catalisador.

A análise estatística dos resultados da Tabela 8, permitiu a obtenção de um modelo para a conversão em acetato de eugenila em função da razão molar,

temperatura e teor da enzima. Este modelo foi validado estatisticamente ($p < 0,05$), pela análise de variância, ANOVA, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: ANOVA para validação do modelo que descreve a produção de acetato de eugenila utilizando a enzima Lipozyme TL 100L.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	P
(1)Razão Molar (m/m)	14,5530125	1	14,553	5,2475	0,149093
(2)Temperatura (°C)	1516,077	1	1516,077	546,6624	0,001824
(3)Teor da Enzima (%)	814,667	1	814,667	293,7500	0,003387
1 by 2	247,865	1	247,865	89,3744	0,011005
1 by 3	53,406	1	53,406	19,2570	0,048205
2 by 3	50,955	1	50,955	18,3730	0,050352
Falta de Ajuste	17,609	2	8,804	3,1747	0,239541
Erro Puro	5,547	2	2,773		
Total	2720,678	10			

*Coeficiente de Determinação (R^2) = 99,15.

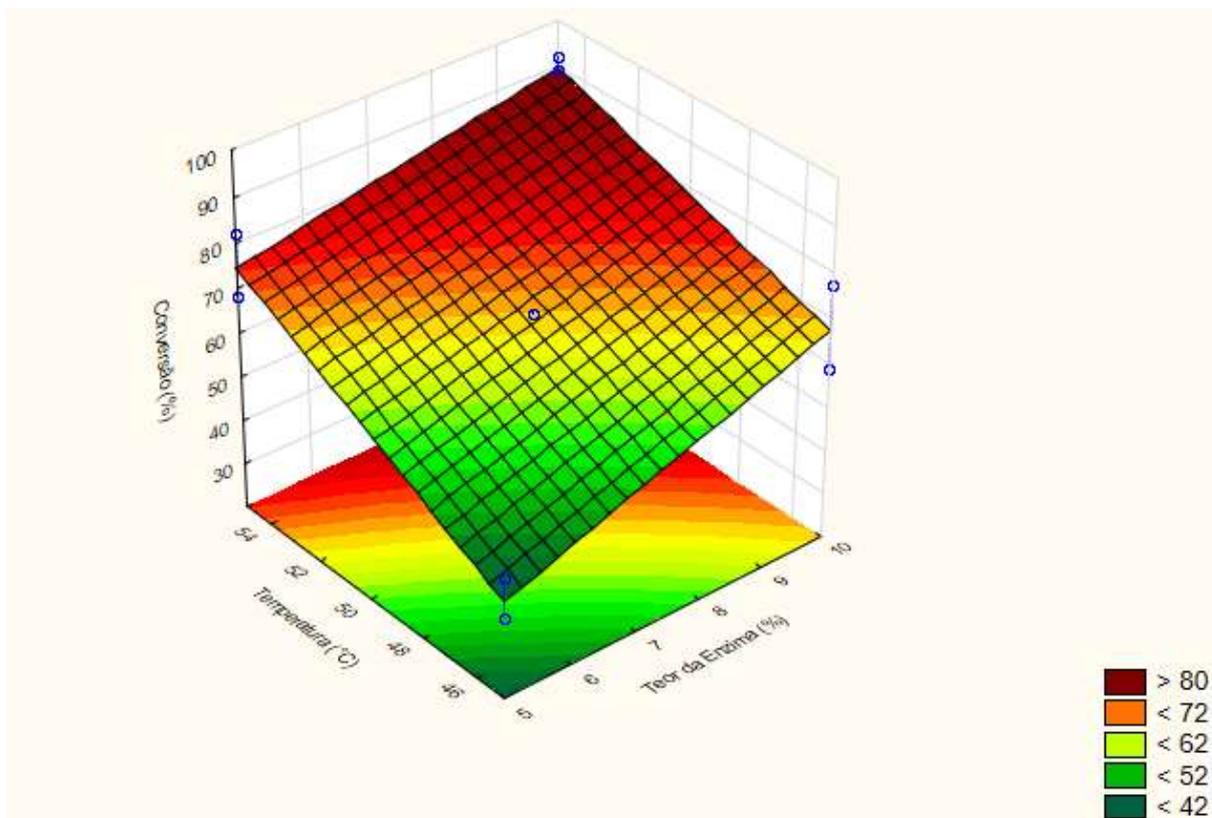
Fonte: O autor.

Os resultados obtidos na ANOVA, Tabela 9, demonstram principalmente, pelo coeficiente de determinação (R^2) de 99,15 e o p-valor da falta de ajuste de 0,24 que o modelo obtido é estatisticamente válido, com nível de 95% de confiança.

4.5.1 Efeito da Teor da Enzima e da Temperatura

A Figura 13 mostra o gráfico de superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila em função do teor da enzima e da temperatura, na qual podemos observar que quanto maior o teor da enzima e maior a temperatura, maior foi a conversão em acetato de eugenila. É possível verificar que as áreas de pico em vermelho demonstram o aumento na conversão, enquanto as áreas de cor amarela e verde determinam uma menor conversão.

Figura 13: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando a interação de teor da enzima e temperatura.

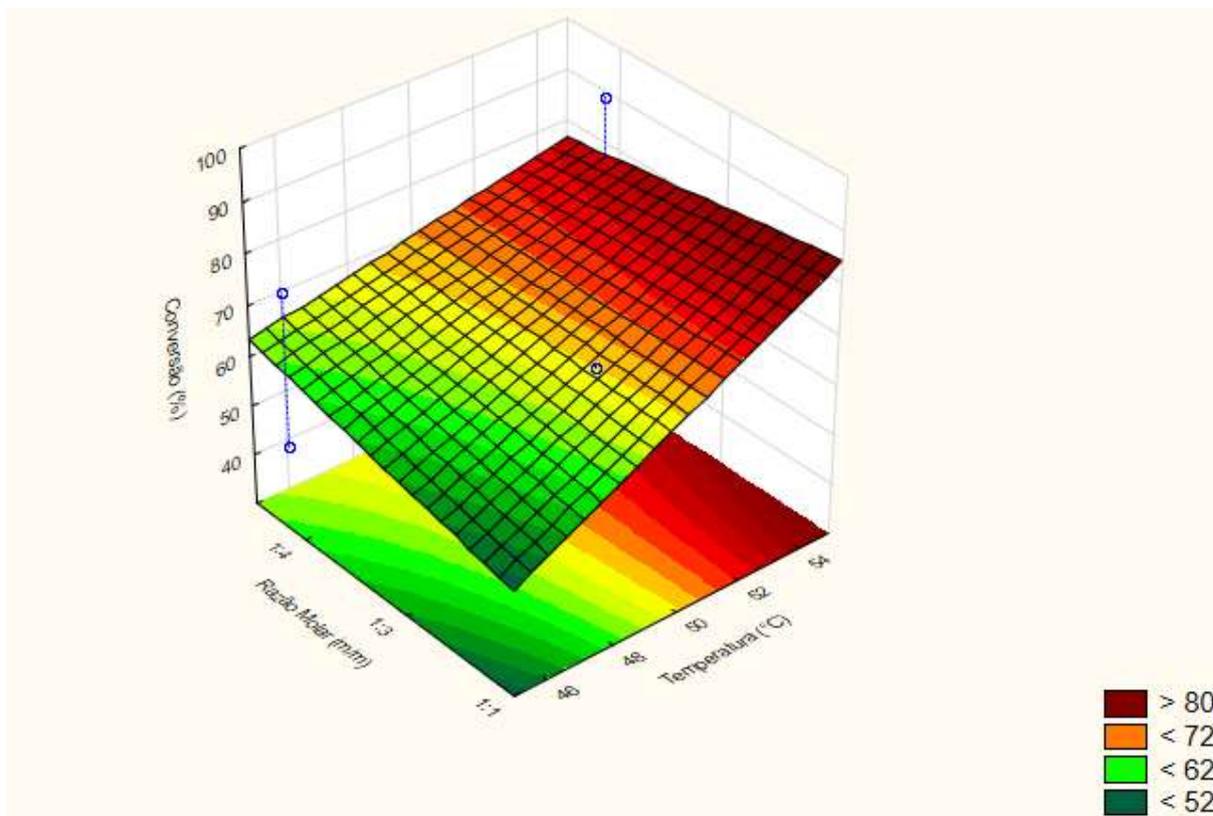


Fonte: O autor.

4.5.2 Efeito da Temperatura e da Razão Molar

A Figura 14 mostra a superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila em função da temperatura e razão molar eugenol/anidrido acético na reação.

Figura 14: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando temperatura e a razão molar eugenol/anidrido acético.



Fonte: O autor.

Na Figura 14 pode-se observar que mesmo quando a razão molar é aumentada, a área do gráfico apresenta-se na cor verde e amarela, o que implica em uma não alteração da conversão. De outra forma, percebe-se que quanto mais se eleva a temperatura, maior é a conversão na reação, até o ponto onde a temperatura pode desnaturar a enzima, devido a mudança conformacional da enzima.

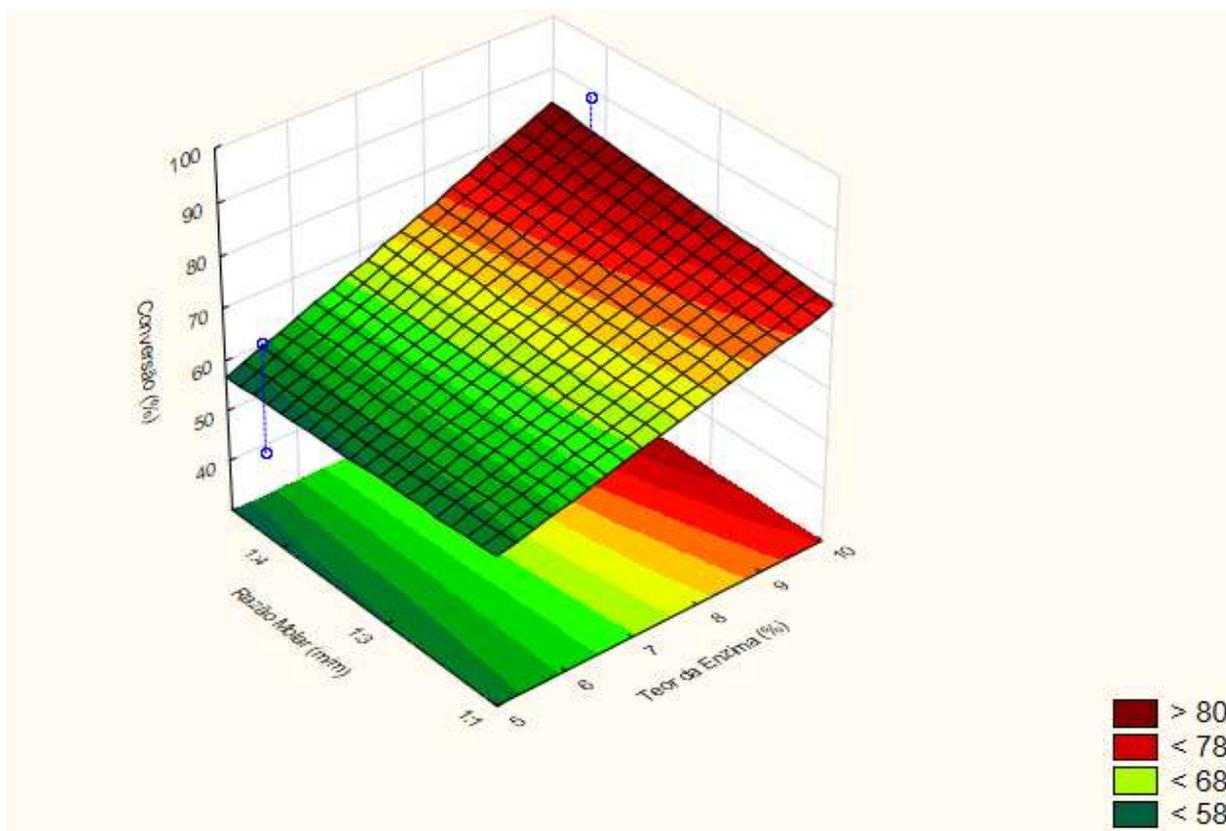
Machado (2018) também obteve resultados de conversões superiores a 90% usando um planejamento composto central rotacional para a produção do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com a enzima Lipozyme TL IM com temperatura de 55°C.

4.5.3 Efeito do Teor da Enzima e da Razão Molar

A Figura 15 mostra a superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila em função do teor da enzima e razão molar eugenol/anidrido acético, na qual pode-se observar que o aumento da razão molar não acarreta alteração da conversão

da reação. Por outro lado, verifica-se que quanto maior é o teor da enzima, maior é a conversão do éster, até o limite onde todos os sítios ativos da enzima estão ocupados por substratos.

Figura 15: Superfície de resposta para a produção de acetato de eugenila relacionando a teor de enzima e a razão molar eugenol/anidrido acético.



Fonte: O autor.

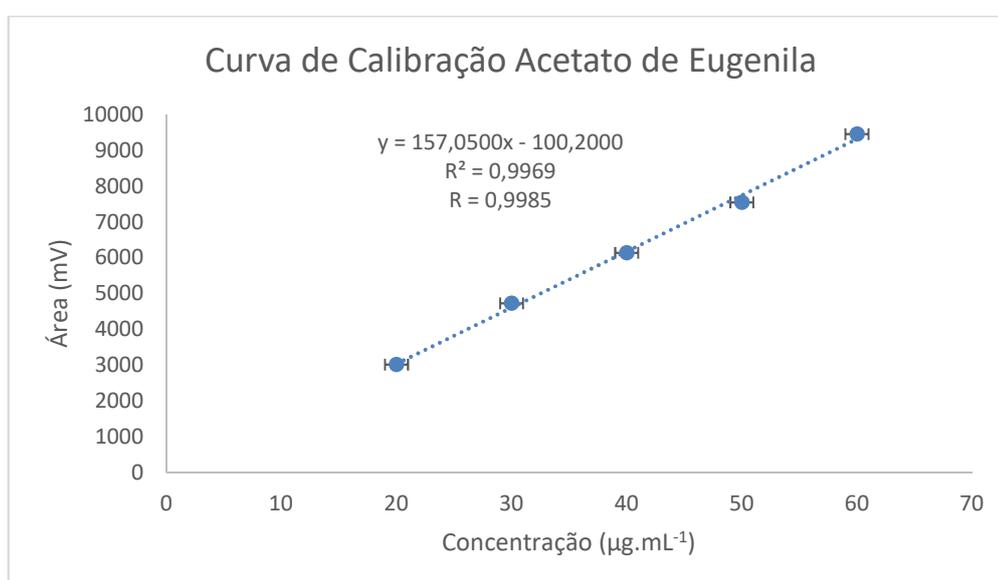
Laroque et al. (2014) avaliaram diferentes meios reacionais para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea a partir do óleo do cravo e anidrido acético utilizando nestes estudos catalisadores químicos (Amberlyst 15, Amberlyst 15 H+ e Amberlyst 36), e razão molar 1:3 eugenol/anidrido acético, 20% (m/m) de catalisador, temperatura de 55°C e 2 horas de reação, e obtiveram nos testes conversão superiores a 80% com todos os catalisadores.

Em estudo realizado por Tischer (2017), este relacionou as conversões de acetato e eugenila em relação a razão molar de eugenol/anidrido acético, % de catalisador (resina Lewatit® GF 101) e temperatura da reação e obteve resultados positivos para o aumento da temperatura e % de catalisador. Já a razão molar, assim como neste estudo, também não teve influência na conversão do acetato de eugenila.

4.6 CINÉTICA DA CONVERSÃO DE ACETATO DE EUGENILA

Para quantificação da conversão do acetato de eugenila na cinética da reação utilizou-se a curva de calibração, conforme Figura 16, na qual obteve a equação da reta ($y = 157,05x - 100,20$) e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9969$ e de correlação de 0,9985. Conforme Brasil Anvisa (2017), através do modelo de regressão é possível avaliar a associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2), que são medidas descritivas da qualidade do ajuste do modelo e considerando que o coeficiente de correlação ($r = \sqrt{R^2}$) deve estar acima de 0,990, o valor obtido neste trabalho está de acordo com a literatura.

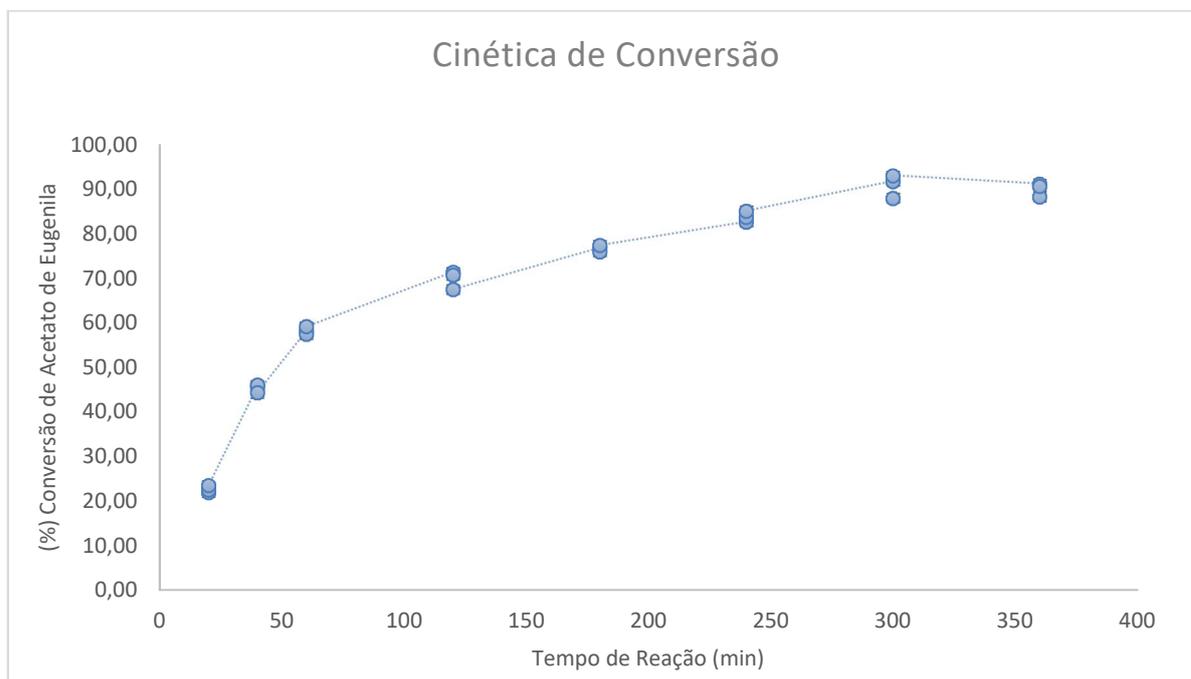
Figura 16: Curva de Calibração do padrão de Acetato de Eugenila.



Fonte: O autor.

A fim de avaliar a cinética de conversão com as condições otimizadas no planejamento, então utilizou-se as mesmas condições do teste 7 do planejamento experimental, devido a conversão (razão molar de 1:1 eugenol: anidrido acético, temperatura de reação 55°C e teor de enzima de 10%), utilizando um tempo total de 6 horas de reação. O comportamento da reação pode ser observado na Figura 17, sendo que os pontos representam os tempos que foram testados.

Figura 17: Cinética de conversão do Acetato de Eugenila.



Fonte: O autor.

Avaliando-se a cinética de conversão do acetato de eugenila, constatou-se que em aproximadamente 1 hora de reação já se obteve conversões em torno superiores a 60%, entre 3 a 4 horas de reação tem se uma conversão superior a 80% e a conversão máxima foi obtida com valores superiores a 90% foi próxima ao tempo de 5 horas de reação. No trabalho de Chiaradia et al. (2012), durante a esterificação de acetato de eugenila via catálise enzimática, estes obtiveram conversões acima de 80% do éster após 4 horas de reação e a conversão máxima (> 90%) foi obtido em 6 horas de reação a razões molares de 1:3 e 1:5 (eugenol: anidrido acético).

Em experimentos de Laroque et al. (2014), estes obtiveram conversões de 100% de acetato de eugenila em 2 horas de reação na cinética química, utilizando como catalisador a Amberlise XAD-16, Ambertyst 15 e Amberlyst 15 H+ na reação.

Chiaradia (2012) relatou dados experimentais do sistema reacional eugenol e anidrido acético empregando a enzima Novozym 435 como catalisador. Os resultados da cinética da reação evidenciaram que em 6 horas de reação houve conversões superiores a 90%.

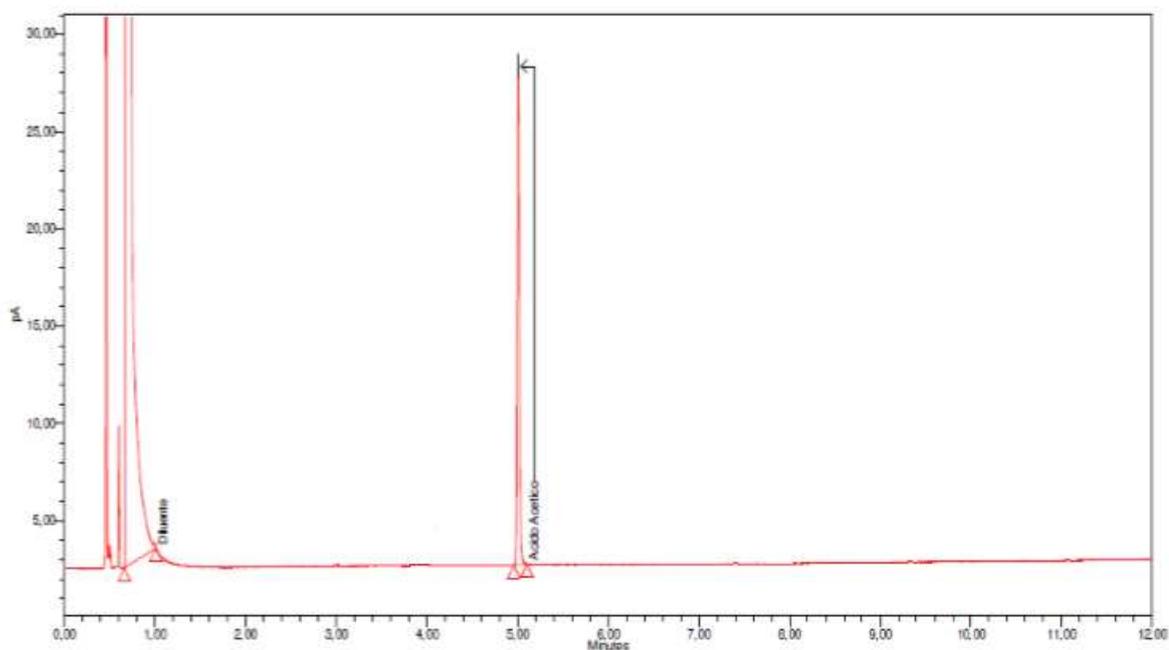
Em estudo realizado por Tischer (2017), esta obteve valores de conversão reacional de aproximadamente 100% de acetato de eugenila utilizando as condições

de 50°C, razão molar eugenol/anidrido acético 1:3 e 3% de catalisador, em 60 minutos de reação, empregando a resina Lewatit® GF 101 como catalisador.

4.7 PURIFICAÇÃO DO ACETO DE EUGENILA

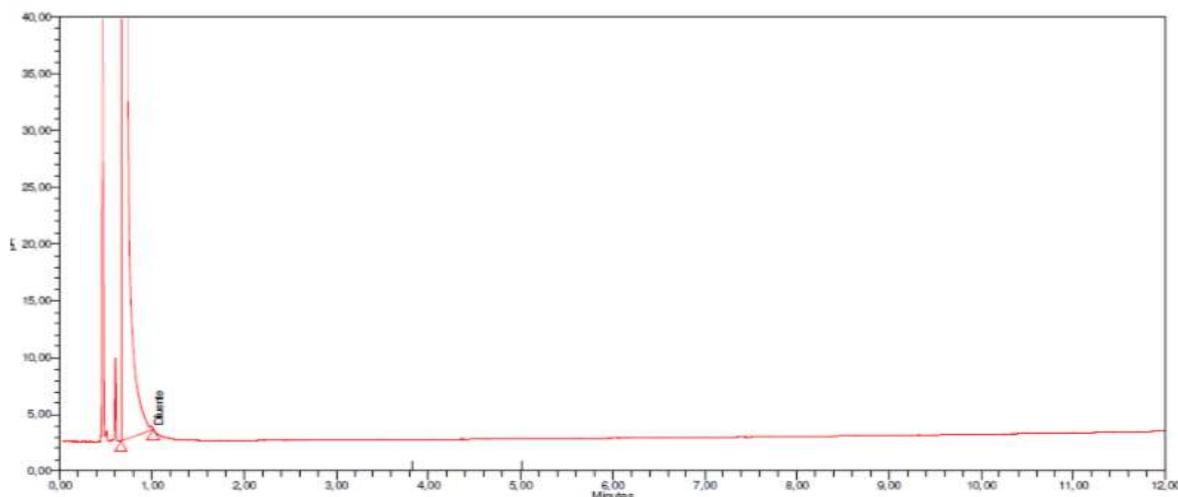
Em relação à purificação do éster acetato de eugenila obtido da síntese, após todo processo realizado conforme item 3.10, constatou-se pelos cromatogramas apresentados na Figura 18, solução padrão de ácido acético, e Figura 19, solução amostra da síntese, que ela não apresentou sinal de resíduo de ácido acético.

Figura 18: Cromatograma solução padrão de Ácido Acético.



Fonte: O autor.

Figura 19: Cromatograma solução Amostra após Purificação.



Fonte: O autor.

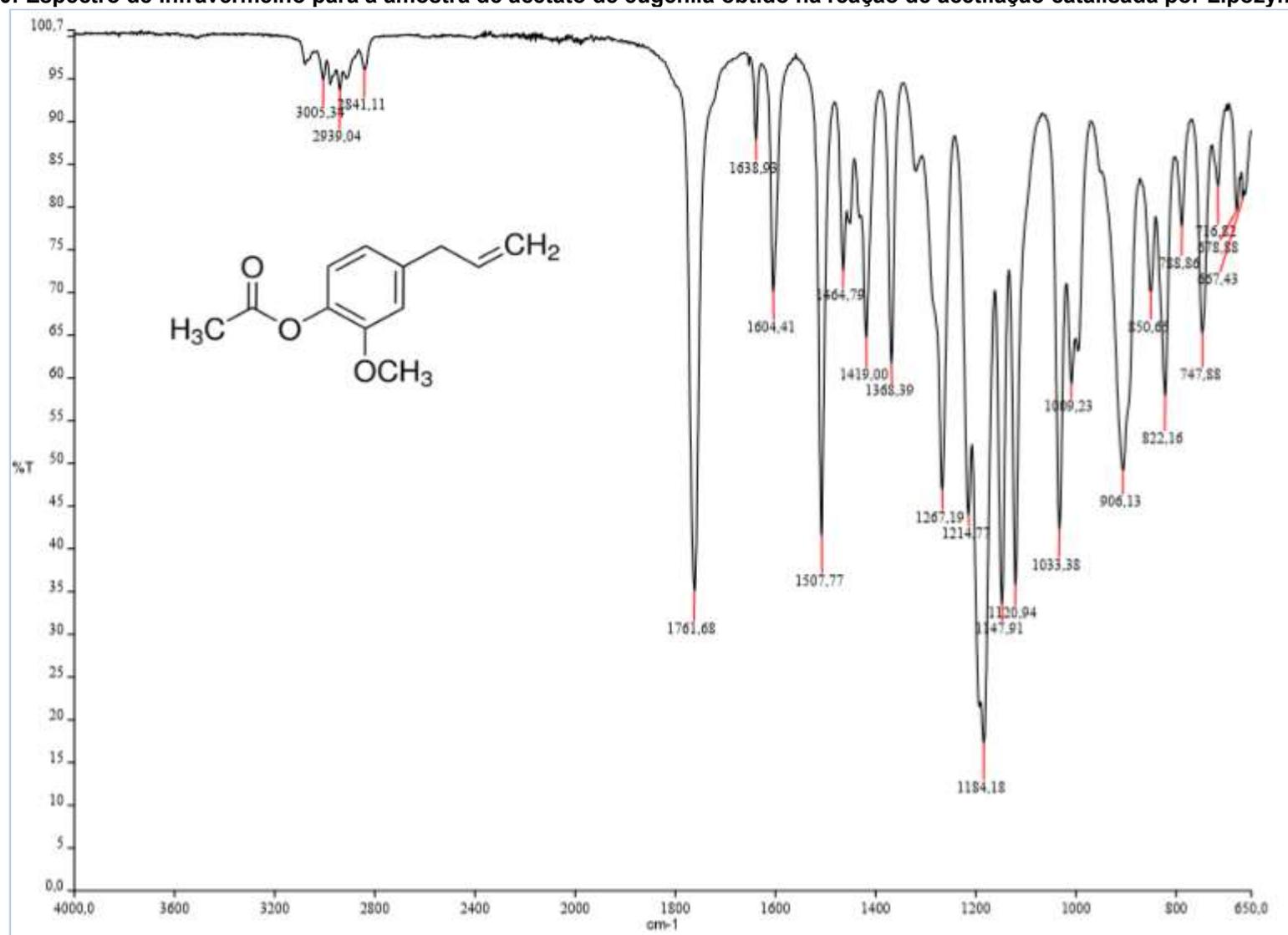
A etapa de purificação foi necessária para evitar a presença de compostos que possam interferir e levar a erros na análise de caracterização (IV e RMN) do produto. Em estudo realizado por Silva (2014), a purificação do éster obtido nas condições experimentais: razão molar 1:5 eugenol:anidrido acético, 5% (m/m substrato) de enzima Lipozyme TL IM, 70 °C, 150 rpm, em sistema de solvente foi realizada em destilação a vácuo a 40°C por 8 horas, também com a finalidade de minimizar erros nas etapas de identificação do composto, através da análise de RMN ¹H e avaliação do potencial antimicrobiano do composto produzido no estudo.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DO ACETAO DE EUGENILA

4.8.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

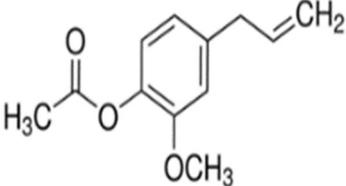
A espectroscopia de infravermelho é usada para identificar grupos funcionais presentes na amostra ou investigar a composição de uma amostra que tenham ligações covalentes, sejam estes compostos orgânicos ou inorgânicos que absorvem várias frequências de radiação eletromagnéticas na região vibracional do infravermelho que inclui radiações com comprimentos de onda entre 2,5 µm e 25 µm (PAVIA et al., 2015). Os resultados da análise de FTIR estão apresentados na Figura 20 e as informações referentes às atribuições e grupos funcionais identificados estão dispostos na Tabela 10.

Figura 20: Espectro de infravermelho para a amostra de acetato de eugenila obtido na reação de acetilação catalisada por Lipozyme TL 100L.



Fonte: Autor

Tabela 10: Resultados da análise das principais bandas da amostra da síntese do Acetato de Eugenila.

Estrutura do Acetato de Eugenila	Comprimento de onda (cm⁻¹)	Atribuição
	3005	Estiramento =C – H Aromático
	2939	Deformação Axial Assimétrica C - H ₂
	2841	Deformação Axial Simétrica C - H ₂
	1761	C = O Éster
	1604	Estiramento C = C Anel Aromático
	1507	Estiramento C = C Anel Aromático
	1419	Dobramento CH ₂
	1368	Dobramento CH ₃
	1267	Estiramento Axial Éster Média Intensidade
	1214	Estiramento Axial Éter C - O
	1184	Estiramento Axial Éster Alta Intensidade
	1033	Estiramento Axial Éter C - O
	906	Dobramento fora do Plano =C - H
	822	Dobramento fora do Plano =C - H
	747	Dobramento fora do plano C = C Aromático

Fonte: O autor.

O espectro avaliado mostra bandas em 2939 e 2841 cm⁻¹ que são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica e simétrica do grupo CH₂, enquanto a existente em 3005 cm⁻¹ é atribuída à estiramento de =C-H da estrutura do anel aromático.

No espectro é possível observar a presença característica da banda da carbonila do éster ligada com o anel aromático em 1761 cm⁻¹, sugerindo que a molécula é o acetato de eugenila, devido a adição do grupamento acila na molécula de eugenol. Além disso, os espectros apresentam duas bandas de estiramento axial de éster em 1184 cm⁻¹ (alta intensidade) e 1267 cm⁻¹ (média intensidade).

Os estiramentos da ligação C-O em torno de 1214 e 1033 cm^{-1} são atribuídos aos estiramentos da ligação C-O do grupo metoxi. Em 1419 e 1368 cm^{-1} tem-se dobramento de CH_2 e CH_3 (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2015).

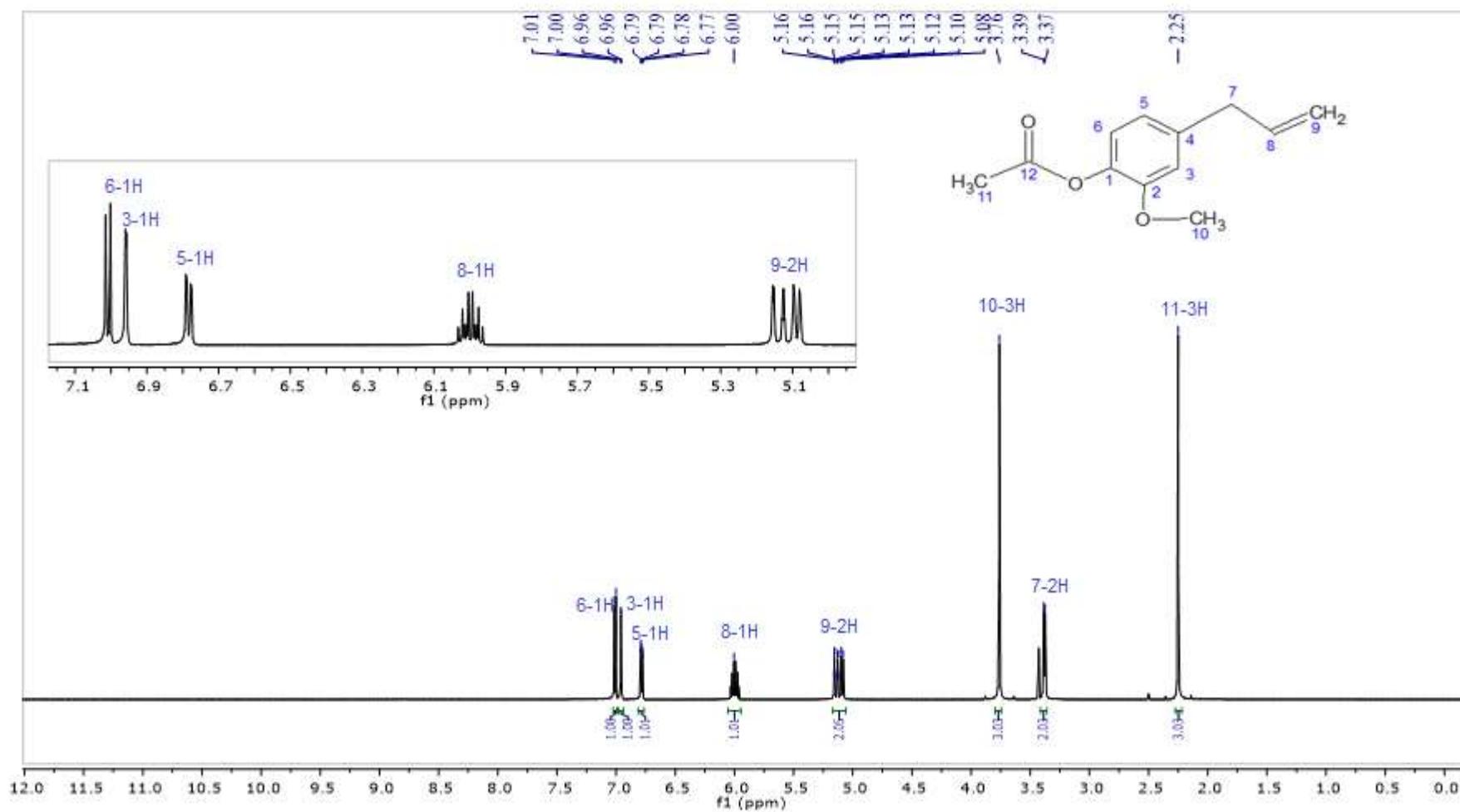
Conforme Pavia et al., (2015), o estiramento da ligação dupla do carbono de alifático/aromático encontra-se em torno de 1680-1600 e 1600 e 1475 cm^{-1} , respectivamente. Na Figura 20, tais estiramentos ocorreram em 1604 e 1507 cm^{-1} , provenientes do C = C alifático e C = C aromático.

O composto aromático da molécula do acetato de eugenila apresentou bandas características em torno de 906, 822 e 747 cm^{-1} , sendo estas atribuídas à dobramento fora do plano, onde estas ocorrem em 900 – 690 cm^{-1} e são usadas para definir padrão de substituição do anel aromático (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2015).

4.8.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN (^1H e ^{13}C)

Seguem os resultados de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 21, 22 e 23), demonstrando a estrutura molecular do éster acetato de eugenila, obtido através da reação de acetilação (Figura 4) do eugenol com anidrido acético utilizando a enzima Lipozyme TL 100L como catalisador.

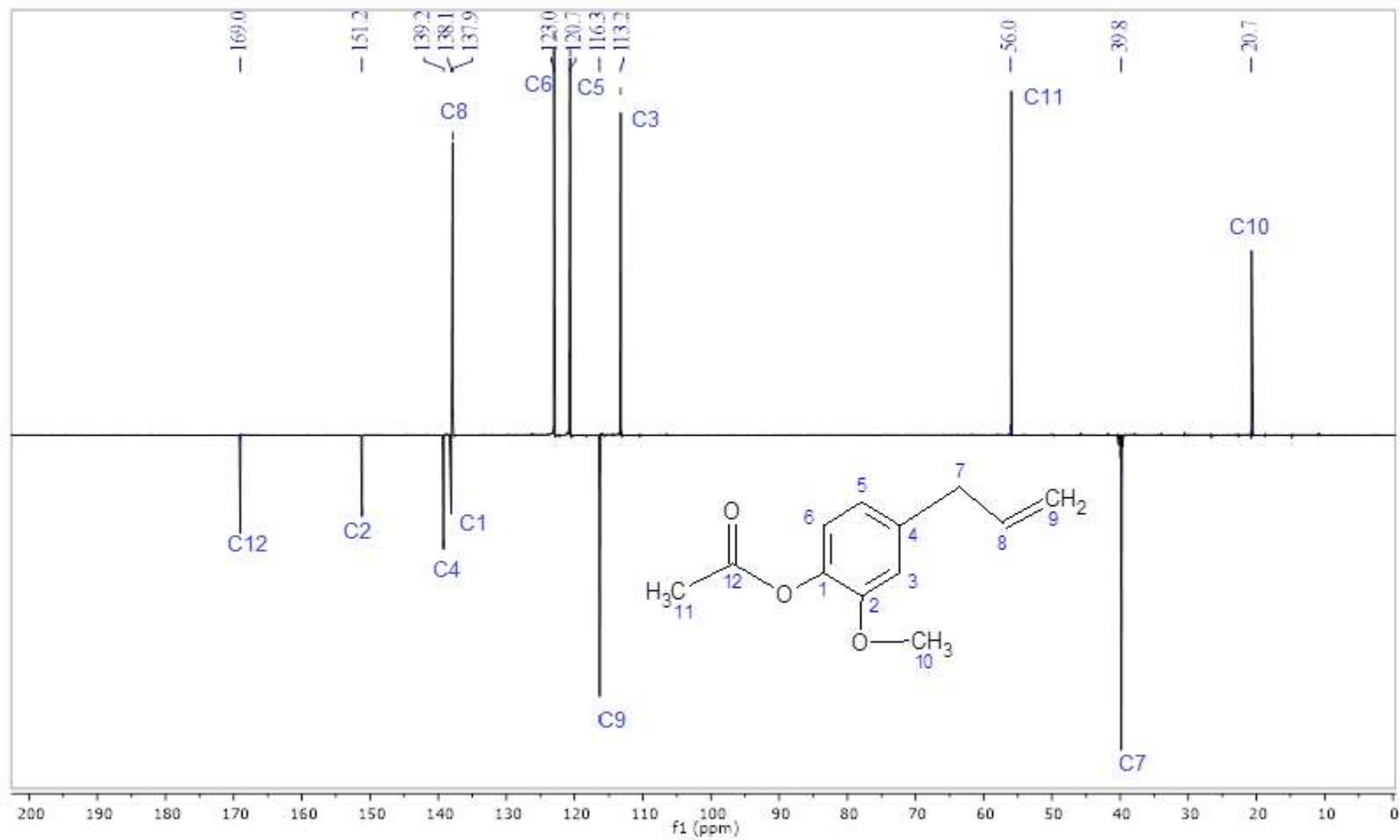
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do éster de acetato de eugenila (DMSO- d_6 , 600 MHz).



H: Hidrogênio.

Fonte: O autor.

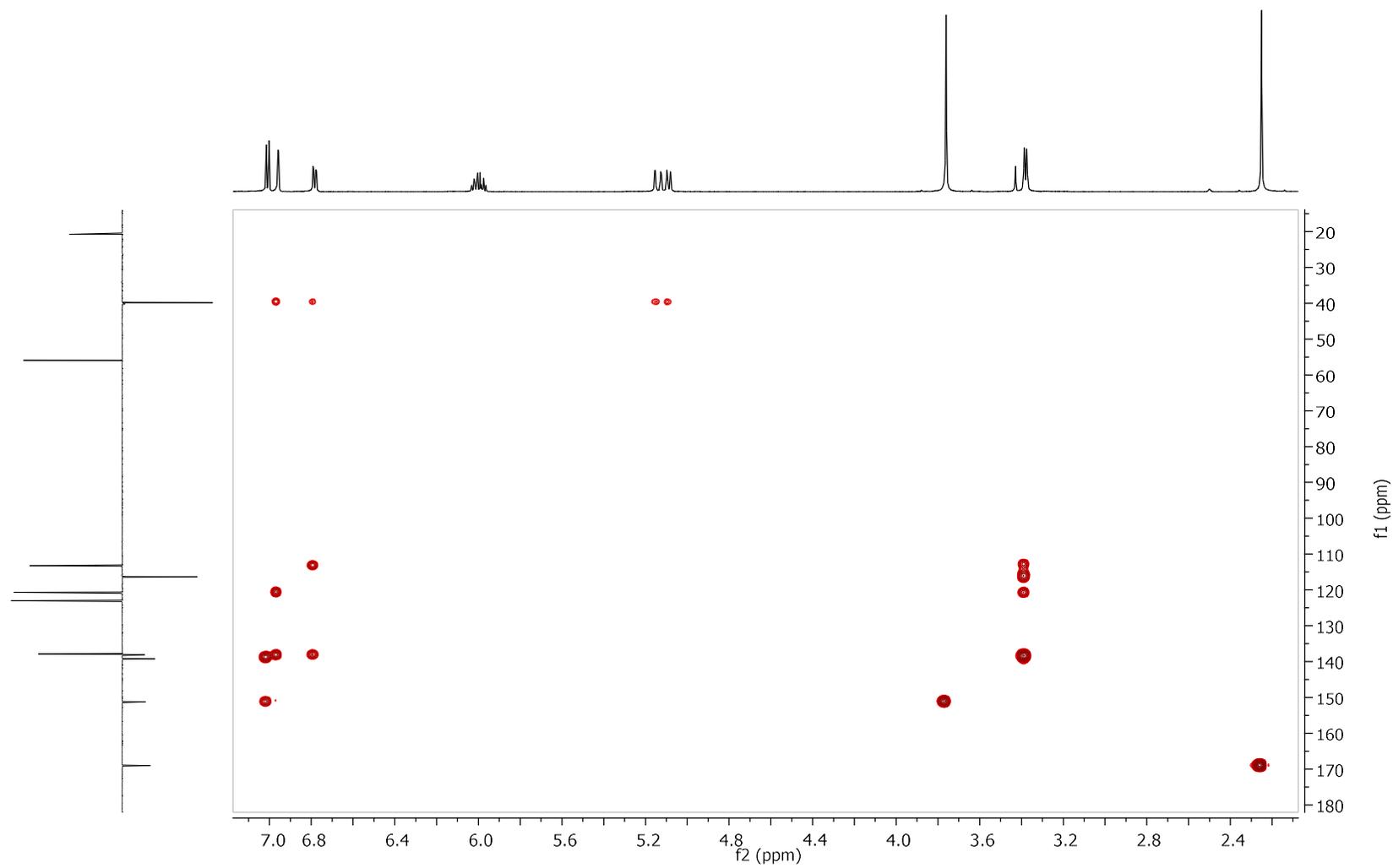
Figura 22: Espectro de RMN de DEPT 135 do Éster de Acetato de Eugenila (DMSO-d6, 150 MHz).



C: Carbono

Fonte: O autor.

Figura 23: Mapa de contorno HMBC do Éster de Acetato de Eugenila (DMSO-d6, 600 e 150 MHz).



Fonte: O autor

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) do Éster de Acetato de Eugenila (δ em ppm e J em Hz).

Posição (Carbono)	Deslocamento Hidrogênio (δ_{H})	Deslocamento Carbono (δ_{C})
1	-	138,1
2	-	151,2
3	6,96 (<i>d</i> ; 1,8)	113,2
4	-	139,2
5	6,78 (<i>dd</i> ; 1,8; 8,0)	120,7
6	7,00 (<i>d</i> ; 8,0)	123,0
7	3,38 (<i>d</i> ; 6,8)	39,8
8	6,00 (<i>m</i>)	137,9
9	5,12 (<i>m</i>)	116,3
10	3,76 (<i>s</i>)	20,7
11	2,25 (<i>s</i>)	56,0
12	-	169,0

d:dublete; *dd*:duplo dublete; *m*:multiplete; *s*:singleto.

Fonte: O autor.

O acetato de eugenila obtido da síntese foi submetido à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e 1 e 2 D. Através do espectro de RMN de ^1H (Figura 21), DEPT 135 (Figura 22) e Tabela 11 observa-se um dublete em δ_{H} 7,00 ppm (1H do carbono da posição 6, *d*, $J= 8,0$ Hz), um dublete em δ_{H} 6,96 ppm (1H do carbono da posição 3, *d*, $J= 1,8$ Hz) e um duplo dublete em 6,78 (1H do carbono da posição 5, *dd*, $J= 8,0$ e 1,8 Hz), indicando um anel aromático trissubstituído. A posição dos substituintes no anel aromático foi realizada com base nos valores dos deslocamentos químicos, multiplicidade e pelas correlações à longa distância.

Os átomos do grupo funcional que se encontram mais próximos ao átomo de oxigênio apresentam menor blindagem (maior valor de ppm de deslocamento químico), do que os átomos mais próximos a um átomo de carbono (menor valor de ppm deslocamento químico) (PAVIA et al., 2015). Dessa forma, dos 12 sinais de carbonos esperados para o acetato de eugenila que são observados no espectro de

DEPT 135 (Figura 22), destaque-se o sinal do carbono da posição 12, conforme Tabela 11, que corresponde ao grupo carbonila do éster com o maior deslocamento de 169,0 ppm

Adicionalmente foi observado um dubleto em δ_H 3,38 (2H do carbono da posição 7, *d*, $J= 6,8$ Hz) e dois multipletos em δ_H 6,00 (1H do carbono da posição 8, *m*) e δ_H 5,12 (2H carbono da posição 9, *m*) aliado às correlações do HMBC da Figura 23, permitem atribuir estes à unidade isoprênica (grupo alílico) como um dos substituintes ligados ao anel aromático.

A presença de dois singletos em δ_H 3,76 (3H do carbono da posição 10, *s*) e 2,25 (3H do carbono da posição 11, *s*), são atribuídos respectivamente, aos hidrogênio do grupo metoxilo e aos hidrogênios do grupo acetóxi, associado os dados de DEPT 135 da Figura 22, permitiram caracterizar a estrutura molecular do éster de acetato de eugenila obtido na acetilação do eugenol com anidrido acético utilizando a enzima Lipozyme TL 100L como catalisador.

Santos (2010) verificou, através de RMN, a molécula de acetato de eugenila, onde observou-se nos espectros os picos do grupo acetyl adicional, C-CH₃ com menor valor de deslocamento químico, e -COCH₃ com maior valor de ppm.

Silva (2014), através da análise de RMN, onde observou a metila ligada ao oxigênio, os hidrogênios do carbono que une o anel aromático com a dupla ligação e a metila ligada ao carbono do éster, a estrutura molecular, como sendo, realmente o acetato de eugenila obtido da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético através da síntese enzimática com Lipozyme TL IM em sistema livre de solvente.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi testado a o uso de diferentes catalisadores enzimáticos para a obtenção de um composto aromático derivado do eugenol, o acetato de eugenila. Este composto foi obtido via acetilação e catálise enzimática, com uso de lipases e óleo de cravo-da-índia.

As extrações do óleo essencial de cravo-da-índia foram realizadas via arraste de vapor da água com auxílio do destilador Clevenger dos botões florais secos do cravo-da-índia forneceram um rendimento médio de 5,83%, sendo este um satisfatório para a técnica de extração.

Os parâmetros físico-químicos testados do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) obtido das extrações apresentaram resultados satisfatórios, principalmente quando comparados com as especificações destes que estão descritas na farmacopeia americana.

Na quantificação do óleo essencial realizada por normalização de área obteve-se excelentes quantidades do composto majoritário o eugenol, aproximadamente 87%, o que torna o óleo essencial extraído com um ótimo potencial para ser utilizado na produção de acetato de eugenila através da acetilação com anidrido acético e catálise enzimática com uso das enzimas lipases.

Dentre os catalisadores enzimáticos testados o que apresentou maior potencial na conversão foi a enzima Lipozyme TL 100 L com a qual obteve-se valor de conversão de 88,12%, sendo o catalisador selecionado para os testes de otimização das condições reacionais.

A melhor condição para a produção de acetato de eugenila foi encontrada na condição de 55°C de temperatura, razão molar de substratos de 1:1, teor da enzima de 10% e o tempo de 120 minutos de reação, onde obteve-se um valor de 91,80% de conversão.

As variáveis que tiveram influência significativa na síntese do acetato de eugenila, foram a temperatura e o teor de catalisador utilizado na reação. Já a razão molar eugenol/anidrido acético não teve interferência significativa na reação.

O estudo cinético de conversão demonstrou que entre 2 a 4 horas de reação tem se uma conversão superior a 80% e a conversão máxima foi obtida com valores superiores a 90% foi próxima ao tempo de 5 horas de reação.

O éster obtido da síntese foi purificado e não se observou pelos testes resíduos de ácido acético da reação, confirmando que o processo de purificação foi eficiente.

Os testes de Espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) utilizados para caracterização do éster sintetizado confirmaram que o composto é o acetato de eugenila pela presença de um grupo metoxilo e um grupo acetóxi na molécula.

Assim, este estudo atendeu o objetivo geral pois foi possível obter o éster acetato de eugenila com elevadas conversões utilizando acetilação e catálise enzimática a partir do óleo essencial de cravo-da-índia.

A partir dos resultados já existentes na literatura e dados deste trabalho, verifica-se o grande potencial de aplicação do acetato de eugenila que pode ser obtido por reação de acetilação e catálise enzimática em alimentos e cosméticos como um conservante e antioxidante.

5.1 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudo de estabilidade do acetato de eugenila sintetizado;
- ✓ Testar técnicas de encapsulamento do material;
- ✓ Testes de aplicação em alimentos e medicamentos com conservante;
- ✓ Estudo de outras propriedades biológicas;
- ✓ Realizar testes com outros catalisadores nas condições experimentais otimizadas;
- ✓ Realizar testes antimicrobianos com microrganismos;
- ✓ Realizar testes de síntese utilizando a enzima Home-Made.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGUIAR, A.C. de, SILVA, L.P.S., REZENDE, C.A. de BARBERO, G.F., MARTÍNEZ, J., 2016. Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. *J. Supercrit. Fluids* 112, 37–43. doi:10.1016/j.supflu.2016.

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.

ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction of pupunha (*Guilielma speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.17, n.3, 2000.

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.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2. ed. São Paulo: Unicamp - Universidade Estadual de Campinas - Cid. Universitária, 2003.

BENASSI, V. M. et al. Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 253–260, 2012.

BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 1, p. 13–22, 2001.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie**, v. 42, n. 29, p. 3336–7, 2003.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, v.1, p.123, 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.

BURDOCK, G.A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6^a ed., USA: Taylor and Francis Group, p. 681, 2010.

CANSIAN, R.L. et al. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, 2016.

CAO, X.; SÁNCHEZ, J.M.; FENG, F.; ADLERCREUTZ, P. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effect of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus ozyrae*, support material, and water activity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1579 – 1587, 2016.

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, n.º. 3, p. 543-548, 2008.

CASSEL, E.; Vargas, R. M. F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. *J. Mex. Chem. Soc.* v. 55, p. 57- 60, 2006.

CASTELLAN, G. Fundamentos de Físico-Química. Tradução: SANTOS. C. M. P; FARIA. R. B. Rio de Janeiro: LTC, 1^a ed. 11^a reimpressão, p. 527, 2001.

CASTRO, N.E.A.; CARVALHO, M.G.; PIMENTEL, F.A.; CORREA, R.M.; GUIMARÃES, L.G.L. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. *Rev. Bras. Pl. Méd.*, v. 10, n. 1, p. 70-75. 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. 2012,2012.

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.

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L.; JÚNIOR, C.V.; DETOFOL, M.R.; LERIN, L.A.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n°. 4, p. 742, 2012.

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

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.4, n.2, p. 90-96, 2014.

COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2011, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

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.

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.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AIT ADDI, E.H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADICK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.483, p.220-243.

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.

FERREIRA, Matheus Moreira. **Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados.** Dissertação (Engenharia Química). 2017. 97 f. Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2017.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 19 Dez. 2018.

GRAMOLELLI JÚNIOR, F. et al. Extração de óleos essenciais e verificação da atividade antifúngica. *Revista das Faculdades de Educação, Ciências e Letras e Psicologia Padre Anchieta: Jundiá*, n. 14, p. 55-56, maio 2006.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. New York: D. Van Nostrand, 1948.

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

ITIS - Integrated Taxonomic Information System On-Line Database, 2018. Disponível em: <http://www.itis.gov/>. Acesso em: dezembro de 2018.

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.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 26, No. 6, 1055-1085, 2015.

KIM, H.M.; LEE, E.H.; HONG, S.H.; SONG, H.J.; SHIN, M.K.; KIM, S.H. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 125, 1998.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, L.S. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991. 24p.

KWANG-GEUN, L.; TAKAYUKI, S. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. **Food Chemistry**, v. 74, p. 443-448, 2001.

LAROQUE, D.A, et al. Seleção de catalisadores e sistema reacional para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014.

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.

LINARD, C.F.B.M. Estudo do efeito antinociceptivo do Eugenol. Fortaleza, 2008. 90 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará.

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.

LUCCHESI, M.E. et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, v.1043, p.323327, 2004.

MACHADO, J. R. **Produção de nanopartículas carregadas com acetato de eugenila obtido através da reação de acetilação em reator de leito fixo empacotado**. 2018. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos, situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.11, p.42-46, 1999.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of phenylpropanoides from clove (*Syzygium aromaticum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n°.22, p. 6413, 2003.

MUSTHAFA, K. S., VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Eugenyl acetate inhibits growth and virulence factors of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Flavour and Fragrance Journal**. V. 31, p. 448-454, 2016.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. **Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol**. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

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, n°. 8, 2010.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase Biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v.4, p.971-982, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 5ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial Development and economic Issues. In: Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering. Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454-1462, 2009.

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.

REIS, T.V. **Potencialidade das folhas do Craveiro-da-Índia cultivados no Sul da Bahia para a extração de óleos essenciais**. In: XLVI Congresso Brasileiro de Química, Associação Brasileira de Química, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

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.

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.

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

SIFOLA, M.I.; BARBIERI, G.G. Yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae*, v. 108, p.408-413, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0304423806000781>>. Acesso em: 15 Abril 2017.

SILVA, M.J.A. 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. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, M. J. A. LOSS R.A.; LAROQUE, D. A.; LERIN, L.A.; PEREIRA, G.N.; THON, É. OLIVEIRA, J.V.; NINOW J.L.; HENSE H.; OLIVEIRA, D. Lipozyme TL IM as Catalyst for the Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent-Free Acetylation, *Applie Biochemistry Biotechnology*, v.3, p. 782–795, 2015.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6º edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 467-485.

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.

STREAM, Chemicals. Catalog 06-3105, **Strem Chemicals, Inc**, 2018.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M.mm Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1846-1859, 2013.

PROBST, I.S. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. Botucatu, 2012. 112 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas- Estrutura e função) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RADÜNZ, Marjana. Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.): extração, encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante. 2017. 142 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

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

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.

RUBINGER, M. M. M.; BRAATHEN, P. C. Ação e Reação: ideias para aulas especiais de química. Belo Horizonte: RHJ, p.292, 2012.

TISCHER, S. J. Emprego de resinas na obtenção de acetato de eugenila em sistema livre de solvente orgânico. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Comunitária da região de Chapecó, Chapecó.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 41. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018, p. 5298.

TRANCOSO, M.D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. Revista Práxis: Rio de Janeiro, n. 9, p. 89-96, jun. 2013.

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.

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.

YANG, Y.C.; LEE, S.H.; LEE, W.J.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n°. 17, p. 4884, 2003.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n°. 7, p. 999-1003, 1992.