

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

Juliana Ribeiro Machado

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM
ACETATO DE EUGENILA OBTIDO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE
ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR DE LEITO FIXO
EMPACOTADO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Dra. Débora de Oliveira

Co-orientadores: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow, Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo e Dr. Lindomar Alberto Lerin

Florianópolis, SC

2018

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

Machado, Julana Ribeiro

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM
ACETATO DE EUGENILA OBTIDO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE
ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR DE LEITO FIXO
EMPACOTADO / Julana Ribeiro Machado ; orientador,
Débora de Oliveira , orientador, Jorge Luiz Ninow
, coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo ,
coorientador, Lindomar Alberto Lerin, 2018.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Lipases. 3.
acetato de eugenila . 4. nanoencapsulação . 5.
larvicida. I. Oliveira , Débora de. II. Ninow ,
Jorge Luiz III. Hermes de Araújo , Pedro Henrique
. IV. Lerin, Lindomar Alberto. V. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos. VI. Título.

**“PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS
COM ACETATO DE EUGENILA OBTIDO ATRAVÉS DA
REAÇÃO DE ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR
DE LEITO FIXO EMPACOTADO”**

Por

Juliana Ribeiro Machado

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Profa. Dra. Débora de Oliveira
Orientadora

Prof. Dr. Pedro Henrique Hérmes de Araújo
Coorientador

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Coorientador

Dr. Lindomar Alberto Lerin
Coorientador

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Cardiofi
Coordenador

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Débora de Oliveira

Profa. Dra. Helen Treichel

Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda
Cavalcanti

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018

da UFSC.



*Aos meus pais por toda a dedicação
e empenho para me proporcionar
a melhor educação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ajudar a enfrentar os desafios do dia a dia seja na vida pessoal ou na profissional;

Aos meus pais Adão Carlos Fernandes Machado e Maria Eunice Ribeiro Machado pelo apoio, compreensão e amor que me dedicam;

A minha orientadora Débora de Oliveira por ter aceitado me orientar e sempre estar disposto a me ajudar quando necessário;

Aos meus coorientadores Jorge Luiz Ninow, Lindomar Lerin, Pedro Henrique Hermes de Araújo por aceitarem me orientar durante a realização deste projeto e sempre estarem dispostos a me ajudar.

Ao professor Sócrates Cavalcanti pois a sua participação foi fundamental para a idealização do projeto;

Aos meus colegas que agora se tornaram pessoas muito queridas em meu coração Mara Cristina, Raquel Loss, Maria José e Eliane Cipollati por toda ajuda e sugestão dada no início do trabalho;

Aos meus colegas da Universidade Federal de Sergipe Rafael e Thaysnara que me ajudaram muito na chegada a Aracaju e na realização dos experimentos sendo muito amorosos e atenciosos.

Ao meu amigo Gean Pablo que nunca deixou de me ajudar mesmo seu projeto sendo totalmente diferente do meu;

Aos colegas do Engebio- Laboratório de Engenharia Bioquímica em especial as amigas Jaqueline Pires, Pâmela Goulart, Natielle Meneses pelas tardes de muitos experimentos e risadas;

Aos colegas do LATESC- Laboratório Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica que me acolheram para que eu pudesse dar início a este trabalho;

Aos colegas do LCP-Laboratório de Controle de Processos por me auxiliarem nos experimentos e me acolherem, especialmente a Alessandra Meneses, Daniela Bresolin e Alexssandra Valério;

As minhas bolsistas de iniciação científica Gabriela Nayana Pereira e Priscilla dos Santos, Andrielli e Camila a ajuda de vocês foi fundamental para o bom andamento desse projeto;

Aos meus amigos de Floripa obrigada por toda a diversão sem vocês a realização desse trabalho também não seria possível;

Aos professores do Departamento de Engenharia Química e Alimentos por todo o aprendizado transmitido principalmente no início do curso;

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química e Alimentos que estão sempre dispostos a ajudar, principalmente o técnico Leandro do Laboratório Central de Análises-EQA e Denise do ENGEBIO;
Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade;
A CAPES pelo apoio financeiro e a concessão da bolsa de doutorado.
A todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero

MUITO OBRIGADA!!!

Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo. Nem mesmo eu. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto final.

(À Procura da felicidade)

RESUMO

O principal objetivo desta tese é a produção do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com a enzima Lipozyme TL IM e a encapsulação do éster pelas técnicas de Nanoemulsificação (NE), formação de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS), visando estudar a eficiência de encapsulação e o potencial larvicida do éster, livre e encapsulado. Foi obtido o valor de 83,5% de conversão do eugenol em acetato de eugenila utilizando uma vazão de alimentação de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em reator de leito fixo empacotado com a enzima Lipozyme TL IM. Após, foi realizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) ²², cuja condição ótima foi obtida com temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão molar eugenol: anidrido acético de 1:5,82, alcançando 93,1% de conversão em acetato de eugenila. A concentração letal do éster contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* apresentou o valor CL_{50} $0,102 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Com relação a encapsulação de acetato de eugenila utilizando a técnica de nanoemulsificação, foi possível obter formulações com diâmetro de partícula entre 92,9 nm e 206,4 nm e baixos índices de polidispersão, 0,10 à 0,19. A atividade larvicida das formulações de nanoemulsões NAE1, NAE3 e NAE5 apresentaram valores de CL_{50} de $0,193 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,196 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. As NLS carregadas com acetato de eugenila foram obtidas com eficiência de encapsulação do éster de 96,4%, diâmetro médio 209,3 nm e índice de polidispersão de 0,20. O valor de CL_{50} encontrado foi de $0,204 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As nanopartículas de PHBV obtidas pela técnica de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos apresentaram o valor máximo de eficiência de encapsulação de 48,7% com concentração de acetato de eugenila $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e pressão de operação de 80 bar, com diâmetro médio de 88 nm a 109 nm. E não foi possível determinar a atividade larvicida das nanopartículas de PHBV. Os resultados mostraram, que foi possível obter o éster acetato de eugenila com elevados valores de conversão empregando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador em reator de leito fixo empacotado. Além disso, foi possível produzir nanopartículas carregadas com o éster por três diferentes técnicas NE, NLS e SEDS, sendo avaliado o potencial destas como carreadores de substâncias com efeito larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: acetato de eugenila, Lipozyme TL IM, nanoencapsulação.

ABSTRACT

The main objective of this thesis is the production of eugenyl acetate in a Packed Bed Reactor catalyzed by the enzyme Lipozyme TL IM and the encapsulation of the ester by techniques of Nanoemulsification (NE), Solid Lipid Nanoparticles formation (SLN) and Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids (SEDS), aiming to study the encapsulation efficiency and the larvicide potential of the ester, encapsulated or free. It was obtained a conversion of 83.5% of eugenol in eugenyl acetate using a flow rate of $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ in a packed bed reactor with a Lipozyme TL IM. The central composite rotatable experimental design (CCRD) 2^2 , showed an optimal reaction condition at 55°C and eugenol: acetic anhydride molar ratio of 1:5.82, achieving 93.1% conversion in eugenyl acetate. Lethal concentration of larvae of the mosquito *Aedes aegypti*, presented LC_{50} of $0.102 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nanoemulsions of eugenyl acetate were obtained by the nanoemulsification technique, generating droplets with average sizes between 92.9 nm and 206.4 nm and low polydispersity index, 0.107 and 0.197. The larvicidal activity of the nanoemulsions formulations NAE1, NAE3 and NAE5 presented LC_{50} of $0.193 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.196 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. SLN loaded with eugenyl acetate were obtained with an encapsulation efficiency of 96.4 %, average size of 209.3 nm and polydispersity index of 0.208. The LC_{50} value found was $0.204 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. PHBV nanoparticles obtained by Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids (SEDS) presented the maximum encapsulation efficiency of 48.7% with eugenyl acetate concentration of $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and operating pressure of 80 bar. The average size diameter was situated between 88 nm to 109 nm. However, the PHBV nanoparticles did not release the active substance, thus, the larvicidal activity was not determined. Results showed that high conversions were obtained in the synthesis of eugenyl acetate using the enzyme Lipozyme TL IM as a catalyst in a packed bed reactor. In addition, the ester was encapsulated in nanoparticles by three different techniques, NE, SLN and SEDS, and their potential as carriers of substances with larvicidal effect against the larvae of the *Aedes aegypti* was evaluated.

Keywords: eugenyl acetate, Lipozyme TL IM, nanoencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de acetato de eugenila por reação de acetilação do eugenol com anidrido acético.....	30
Figura 2 - Desenho esquemático dos principais reatores de leito empregados na produção de ésteres com lipases imobilizadas.....	37
Figura 3 - Principais características das microcápsulas obtidas por algumas técnicas convencionais de encapsulação de compostos hidrofóbicos.	41
Figura 4 - Esquema de encapsulação de composto lipofílico por nanoemulsificação.	42
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo mecânico do homogeneizador ultrassônico (a), homogeneizador a alta pressão (b) e microfluidizador (c).	44
Figura 6 - Representação esquemática dos processos que utilizam CO ₂ como anti-solvente.....	51
Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercríticos (SEDS).	52
Figura 8 - Esquema do aparato experimental utilizado na síntese do acetato de eugenila: (1) Recipiente contendo a mistura do substrato; (2) bomba peristáltica; (3) reator de leito fixo empacotado (4) entrada do substrato (5) saída de produto (6) coleta de amostra; (7 e 8) banho de aquecimento.....	56
Figura 9 - Esquema do aparato experimental da técnica de coprecipitação e encapsulação empregando fluido supercrítico como anti-solvente.	65
Figura 10 - Efeito da vazão de alimentação (0,1, 0,8 e 1,35 mL.min ⁻¹) na produção de acetato de eugenila em PBR com valores fixos de temperatura (55 °C) e razão molar de eugenol:anidrido acético (1:3).	72
Figura 11 - Avaliação do efeito da temperatura e da razão molar na produção de acetato de eugenila em leito fixo empacotado com Lipozyme TL IM.	74
Figura 12 - Curva de contorno da conversão de acetato de eugenila em função da temperatura e razão molar eugenol:anidrido acético.....	76
Figura 14 - Espectro de infravermelho para a amostra de acetato de eugenila obtido na reação de acetilação catalisada por Lipozyme TL IM.	79
Figura 15 - Espectro de RMN ⁻¹ H da amostra obtida através da reação de acetilação do óleo de cravo-da-índia (eugenol) e anidrido acético, catalisada pela enzima Lipozyme TL IM, em sistema livre de solvente.	80

Figura 16- Diâmetro médio de partícula (Dp) (a) e índice de polidispersão (PdI) (b) para as formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila no dia 0 e após 60 dias.	82
Figura 17- Formulações de nanoemulsão solução dispersa contendo acetato de eugenila.	84
Figura 18 - Estabilidade do diâmetro médio (Dp) e índices de polidispersão (PdI) das NLS durante 60 dias de armazenamento.	90
Figura 19- Morfologia das NLS.	91
Figura 20 - Análise FT-IR das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila	92
Figura 21- Perfil de liberação das NLS carregadas com acetato de eugenila. ..	95
Figura 22 – Partículas de encapsulação de acetato de eugenila empregando técnica SEDS.	98
Figura 23- Estrutura do co-polímero PHBV.....	99
Figura 24 - Espectro de infravermelho obtido das nanopartículas de acetato de eugenila e PHBV.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fonte microbiana e as condições ótimas de algumas lipases imobilizadas comerciais.....	35
Tabela 2 - Resumo das técnicas de formação de partículas empregando fluidos supercríticos.....	50
Tabela 3 - Especificações técnicas do óleo essencial de folha de cravo-da-índia.....	55
Tabela 4 - Níveis codificados e valores reais das variáveis utilizadas no delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2 ²	58
Tabela 5 - Formulação das nanoemulsões contendo acetato de eugenila.....	61
Tabela 6 - Composição das formulações de NLS carregadas com acetato de eugenila.....	61
Tabela 7 - Matriz do delineamento composto central rotacional DCCR 2 ² com os valores reais e codificados e resultados em termos de conversão em acetato de eugenila reais e preditos.....	73
Tabela 8 - Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental Composto Central Rotacional 2 ²	75
Tabela 9 - Resultados do Potencial Zeta (mW) para as formulações de nanoemulsão NAE1, NAE2 e NAE5 contendo acetato de eugenila.....	85
Tabela 10 -Valores de concentração letal (CL) 50 % e 90 % de morte das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> e os intervalos de confiança a 95 % determinados para as formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila.....	86
Tabela 11 - Resultado das eficiências de encapsulação (EE), diâmetro médio (D _p) de partícula e índice de polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (PZ) para as formulações de NLS carregadas com acetato de eugenila.....	88
Tabela 12 - efeito do Crodamol GTCC e do Pluronic F-127 no diâmetro de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação das nls carregadas com acetato de eugenila.....	89
Tabela 13 - Resultados obtidos para o encapsulação de acetato de eugenila em PHBV pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.....	96
Tabela 14 – Os valores de diâmetro médio (D _{médio}), desvio padrão e o coeficiente de variância (CV) para os ensaios.....	97

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	22
1.1.OBJETIVOS	25
1.2.Objetivo Geral	25
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1.Óleos essenciais	27
2.2.Eugenol.....	28
2.3.Acetato de eugenila.....	30
2.4.Atividade larvicida de terpenos e fenilpropanóides obtidos a partir de óleos essenciais.....	32
2.5.Lipases.....	33
2.6. Produção de ésteres com lipases imobilizadas.....	36
2.6.1.Produção de ésteres com reatores de leito fixo empacotado com enzimas imobilizadas comerciais.....	36
2.7.Encapsulação de substâncias bioativas	40
2.8.Encapsulação pela técnica de Nanoemulsificação (NE)	42
2.9.Encapsulação pela técnica de formação de Nanopartículas Lípicas Sólidas (NLS).....	46
2.10.Encapsulação de compostos bioativos empregando fluidos supercríticos como anti-solvente: Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos	48
2.11.Considerações sobre o estado da arte.....	53
3.MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1.Material.....	55
3.1.1.Substratos.....	55
3.2.Catalisador.....	55
3.3.Síntese de acetato de eugenila em reator de leito fixo (PBR)	56
3.3.1.Estudo da vazão de alimentação na conversão do éster acetato de eugenila por reação de acetilação em reator de leito fixo empacotado.....	56
3.3.2.Otimização da reação de acetilação do eugenol em reator de leito fixo empacotado com Lipozyme TL IM	57
3.4.Caracterização do acetato de eugenila	58
3.4.1.Purificação do éster acetato de eugenila	58
3.4.2.Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN- ¹ H.....	58
3.4.3.Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	58
3.4.4.Análise de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa CG-MS.....	59
3.4.5.Quantificação do acetato de eugenila.....	59
3.5.Preparo da Nanoemulsão contendo acetato de eugenila	60
3.6.Preparação das Nanopartículas Lípidicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila.....	61

3.6.1. Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PdI)	62
3.6.2. Potencial Zeta	62
3.6.3. Morfologia das partículas	63
3.6.4. Eficiência de encapsulação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila	63
3.7. Estudos de liberação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	64
3.8. Encapsulação do acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS)	64
3.8.1. Preparação das nanopartículas carregadas com acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.....	66
3.8.2. Determinação da eficiência de encapsulação do acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.....	67
3.8.3. Caracterização das nanopartículas de PHBV carregadas com acetato de eugenila.....	67
3.9. Atividade Larvicida	68
3.9.1. Obtenção dos ovos	68
3.9.2. Eclosão das larvas	68
3.9.3. Preparação das soluções estoque	68
3.9.4. Determinação da atividade larvicida da Nanoemulsão e das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila.....	69
3.9.5. Exposição das larvas	69
3.9.6. Análise estatística	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Efeito da vazão de alimentação na acetilação enzimática do eugenol em reator de leito fixo empacotado (PBR)	71
4.2. Otimização da reação de acetilação do eugenol em reator de leito fixo empacotado com enzima Lipozyme TL IM	73
4.3. Estabilidade operacional da Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado (PBR)	77
4.4. Caracterização do acetato de eugenila	79
4.4.1. Análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	79
4.4.2. Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN- ¹ H.....	79
4.5. Ensaio larvicida	80
4.6. Encapsulação de acetato de eugenila por Nanoemulsificação (NE).....	81
4.6.1. Atividade larvicida da Nanoemulsão contendo acetato de eugenila.....	85
4.7. Encapsulação do acetato de eugenila em Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	87
4.7.1. Morfologia das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	91

4.7.2. Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	92
4.7.3. Atividade larvicida das Nanopartículas Lípidicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila.....	93
4.7.4. Ensaio de Liberação.....	94
4.8. Encapsulação pelo método de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos-SEDS	96
4.8.1. Análise de espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das cápsulas de PHBV carregadas com acetato de eugenila.....	99
4.8.2. Atividade larvicida das nanopartículas de PHBV carregadas com acetato de eugenila.....	100
5. CONCLUSÕES.....	101
6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
8. PUBLICAÇÕES ADVINDAS DO DESENVOLVIMENTO DA TESE.....	119

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM ACETATO DE EUGENILA OBTIDO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO

Porque?

O acetato de eugenila é um éster com atividade larvicida;
É um composto natural podendo ser obtido do óleo de cravo ou com o uso de catalisadores enzimáticos considerados de baixo impacto ambiental;
Encapsular o éster por diversas técnicas com o objetivo de aumentar a disponibilidade da substância em água visando a aplicação em formulação de larvicidas.

Quem já fez?

São poucos os trabalhos de catálise enzimática da reação de acetilação do óleo de cravo-da-índia para produção de acetato de eugenila em reator de leito fixo em modo contínuo;
Não constam na literatura trabalhos de formação de micro/nanopartículas de acetato de eugenila empregando técnicas Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), Nanoemulsão (NE) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos-SEDS;
Ausência de trabalhos com o uso de nanopartículas como carreadores de compostos com propriedades larvicidas.

Hipóteses?

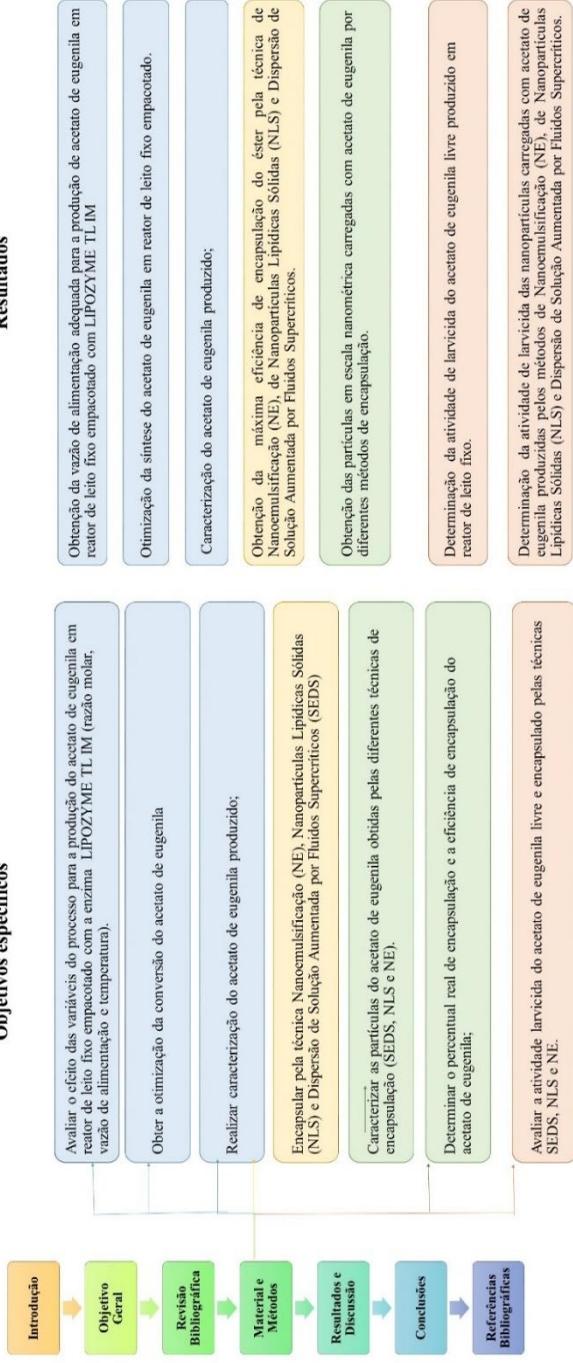
É possível obter elevadas conversões em éster empregando reatores de leito fixo empacotado com enzima Lipozyme TL IM?
É possível obter nanopartículas carregadas com acetato de eugenila por diversos métodos?

Métodos Experimentais

Quantificação dos ésteres por cromatografia gasosa;
Identificação do éster por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa CG-MS;
Determinação da atividade larvicida do éster acetato de eugenila;
Formação de nanopartículas empregando as técnicas NE, NLS e SEDS;
Caracterização das partículas por MEV e TEM;
Testes de atividade larvicida com as nanopartículas carregadas com acetato de eugenila.

Estrutura da Tese

Objetivos específicos



1. INTRODUÇÃO

O acetato de eugenila é um fenilpropanóide disponível no óleo essencial de cravo-da-índia, representando de 1 a 10% da composição. Este composto pode ser sintetizado através da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético por catálise química ou enzimática (BARBOSA et al., 2012; SILVA et al., 2015). A *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization* (FAO/WHO) e *European Food Safety Authority* (EFSA) considera segura a sua aplicação em alimentos, sendo a sua dose de consumo entre 1-5 mg/kg (EFSA, 2011). No Brasil a sua utilização é liberada, pois a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segue a recomendação dos produtos aprovados pelas organizações citadas anteriormente (ANVISA, 2007). O acetato de eugenila possui propriedade antimicrobiana (CHIARADIA et al., 2012; SILVA et al., 2015), pode ser usado como agente antileishmaniose e regulador da hiperglicemia (DE MORAIS et al., 2014; SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010) e estudos recentes apontam que a substância também possui propriedade larvicida (BARBOSA et al., 2012; PANDEY et al., 2013). Porém há poucos trabalhos com sua aplicação em uma matriz alimentícia, farmacêutica ou cosmética.

A maioria dos trabalhos apresenta as lipases imobilizadas como catalisadores da produção de ésteres de eugenol em reatores no modo batelada (CHIARADIA et al., 2012; HORCHANI et al., 2010; SILVA et al., 2015). Os reatores de leito fixo empacotado (PBR) são pouco explorados para a síntese desse tipo de éster, porém eles oferecem vantagens em relação ao processo em batelada como a facilidade de operação em modo contínuo, garantia da estabilidade da enzima, possibilidade de reuso do catalisador, o que torna o processo econômico para aplicação industrial (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; GANGULY; NANDI, 2015; ZHAO et al., 2014). Além disso, com esse processo há a possibilidade de obter maiores valores de conversão em menores períodos de tempo (VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015a).

A manutenção das propriedades e dos benefícios de compostos bioativos é uma das preocupações para a aplicação na indústria química, farmacêutica e alimentícia. A encapsulação dessas substâncias é uma alternativa para garantir a proteção dessas propriedades dentro de uma matriz. Por exemplo, o tempo de vida útil de um composto volátil pode ser bastante aumentado por encapsulação, pois a membrana impede a sua

evaporação. Além disso, a encapsulação também pode proteger uma substância dos efeitos da radiação ultravioleta, umidade ou do contato com o oxigênio, mantendo a estabilidade em condições desfavoráveis do meio (oscilação de temperatura e pH), melhorando a biodisponibilidade em meios aquosos, visando aumentar e prolongar a ação destas substâncias (AZEREDO, 2005; CHATTERJEE; BHATTACHARJEE, 2013; PRIAMO et al., 2010; SUGUMAR et al., 2014). Os processos de encapsulação baseiam-se no isolamento de uma substância do meio externo por uma barreira física inerte por um determinado tempo com o objetivo de preservar/prolongar as suas propriedades bioativas ou funcionais e aumentar a sua disponibilidade no meio de liberação.

As técnicas de encapsulação são processos que dependem da seleção adequada de diferentes variáveis. Entre as principais técnicas utilizadas estão a emulsão/nanoemulsificação (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013) e as nanopartículas lipídicas sólidas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; GARG; SINGH, 2011; ROUSSAKI et al., 2014), além do surgimento de técnicas mais recentes, como a aplicação de fluidos supercríticos nos processos de formação de partículas (BOSCHETTO et al., 2014; MACHADO et al., 2014; BAKKALI et al., 2008; COCERO et al., 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012; PRIAMO et al., 2013). De maneira geral, os processos de encapsulação citados acima são de baixo impacto ambiental e as nanopartículas obtidas não oferecem risco na aplicação em formulações de produtos farmacêuticos ou alimentícios.

Levando em consideração esses fatos e os estudos evidenciando a potencial ação larvicida do acetato de eugenila contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, que é o principal agente transmissor do vírus da Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Brasil (BARBOSA et al., 2012; PANDEY et al., 2013), a proposta desta tese é a produção enzimática do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com Lipozyme TL IM e a encapsulação do éster pelas técnicas de Nanoemulsificação (NE), formação de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) visando obter uma elevada eficiência de encapsulação e avaliar a toxicidade do acetato de eugenila livre e das nanopartículas carregadas com este composto contra as larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*.

1.1. OBJETIVOS

1.2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a produção de acetato de eugenila via acetilação enzimática em sistema livre de solvente orgânico utilizando reator de leito fixo empacotado em modo contínuo e posterior determinação da atividade larvicida das nanopartículas produzidas pela encapsulação do éster em diferentes métodos.

1.3. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das variáveis do processo para a produção do acetato de eugenila em reator contínuo (razão molar, vazão de alimentação e temperatura);
- Determinar as condições ótimas para a produção do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado;
- Realizar a purificação, quantificação e identificação do acetato de eugenila produzido;
- Encapsular o acetato de eugenila, obtido através da acetilação enzimática em reator contínuo, utilizando diferentes métodos de encapsulação como a técnica de Nanoemulsificação (NE), Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS);
- Analisar a morfologia das partículas carregadas com acetato de eugenila obtidas pelos diferentes métodos de encapsulação Nanoemulsificação (NE), Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS);
- Determinar o percentual real e a eficiência de encapsulação do acetato de eugenila;
- Avaliar a atividade larvicida do acetato de eugenila livre e encapsulado pelos métodos de Nanoemulsificação (NE), Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão sobre o estado da arte no qual o tema do trabalho se insere, procurando evidenciar a importância do tema sob investigação para a comunidade científica. Será apresentada uma pequena revisão sobre o óleo essencial de cravo-da-índia, focando nas propriedades do eugenol e do acetato de eugenila. Também uma breve exposição dos métodos de produção enzimática de ésteres de óleos essenciais por lipases imobilizadas, evidenciando o uso de reatores de leito fixo empacotado (*Packed Bed Reactor*). Por fim, o uso de diferentes técnicas de encapsulação de compostos bioativos com o foco nos métodos a serem estudados; Nanoemulsificação (NE) e produção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) será descrito.

2.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por mais de 300 substâncias complexas caracterizadas por apresentarem um odor forte, e suas propriedades vêm sendo exploradas durante anos (BAKKALI et al., 2008). Estima-se que existam mais de 17.000 espécies de plantas aromáticas conhecidas, sendo que, apenas 10% são utilizadas para a extração de óleos essenciais. Os principais gêneros usados pertencem as famílias: *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Cupressaceae* e *Piperaceae* (ASBAHANI et al., 2015).

Os óleos essenciais são biossintetizados como metabólitos secundários em diferentes partes das plantas aromáticas como as flores (jasmim, rosa, violeta e lavanda), as ervas, o botão (cravo), as folhas (eucalipto, sálvia), as frutas (anis), os galhos, as cascas (canela), as raspas (citrus), as sementes (cardamomo), a madeira (sândalo), o rizoma e as raízes (gingibre). Esses compostos possuem funções específicas no metabolismo da planta como proteção contra fatores externos (luz, calor, humidade e oxidação). Porém, o principal papel biológico dos óleos essenciais tem relação com as interações entre as plantas e o ambiente como: a inibição da germinação e crescimento de outras plantas (forma de sobrevivência), atrair polinizadores e o principal, que é o sistema de defesa conferido pela ação contra pragas, insetos, herbívoros e micro-organismos patogênicos (ASBAHANI et al., 2015; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos de hidrocarbonetos (isoprenos) e terpenóides. Os principais terpenos são os monoterpenos (10 átomos de carbono) e representam mais de 80% da composição, e os sesquiterpenos (15 átomos de carbono). Essas substâncias possuem estrutura de hidrocarboneto acíclico, podendo ser mono-, bi- ou tricíclico. Além desses compostos, também há os derivados oxigenados de terpenos, os isoprenóides que podem apresentar estruturas de álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (BAKKALI et al., 2008). As substâncias constituintes dos óleos essenciais possuem natureza hidrofóbica e a grande maioria possui densidade maior que a água, tornando-os solúveis em solventes orgânicos, não miscíveis em água (ASBAHANI et al., 2015).

A árvore do cravo-da-índia é nativa da Indonésia e acredita-se que em 1800, os britânicos promoveram o plantio das árvores de cravo-da-índia em outros lugares como Brasil, Madagascar, Ilhas Maurício, Tanzânia (Zanzibar). Porém, a Indonésia continua sendo o maior produtor de cravo-da-índia, seguido da ilha de Madagascar. No Brasil o grande pólo produtor de cravo-da-índia está localizado na região sul da Bahia, nas cidades de Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha (AFFONSO et al., 2014).

A obtenção do óleo essencial de cravo-da-índia é feita por destilação das flores, caule ou folhas da árvore (*Syzygium aromaticum* L.). E em larga escala é feita por processo de extração por destilação por arraste a vapor, porém também há métodos mais modernos sendo utilizados com o emprego de solventes ou CO₂ supercrítico (ASBAHANI et al., 2015). O óleo essencial de cravo-da-índia é um dos poucos que possuem uma classe de moléculas oxigenadas denominadas fenilpropanóides. Classe do seu principal componente o eugenol (76,8%), seguido por demais em menor proporção como β-cariofileno (17,4%), α-humuleno (2,1%) e acetato de eugenila (1,2%), o percentual dos constituintes pode sofrer alterações dependendo do órgão em que óleo é extraído, das condições climáticas e da composição do solo (ASBAHANI et al., 2015; MOON; KIM; CHA, 2011).

2.2. Eugenol

O eugenol (C₁₀H₁₂O₂-2-metoxi-4-prop-2-enilfenol) é um fenilpropanóide e o principal componente do óleo essencial de cravo-da-índia e suas propriedades bioativas vem sendo estudadas durante anos.

Diversas pesquisas relatam o efeito antimicrobiano (fungicida, bactericida e virucida) (ABBASZADEH et al., 2014; ASCENÇÃO; FILHO, 2013; DEVI et al., 2010), antioxidante (D'AVILA FARIAS et al., 2013; FUJISAWA et al., 2002; GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012; LEE; SHIBAMOTO, 2001; SCHERER et al., 2009), o uso como agente anti-leishmaniose e regulador de hiperglicemia (DE MORAIS et al., 2014; SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010), inseticida e larvicida (BARBOSA et al., 2012; PANDEY et al., 2013) do eugenol.

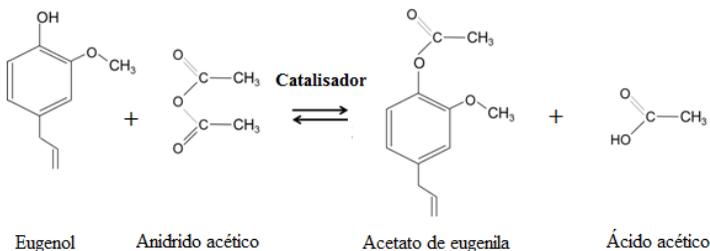
O efeito antimicrobiano do eugenol já foi observado em diversas espécies de micro-organismos. O efeito fungicida do composto foi verificado por Ascensão e Filho (2013) contra o fungo da espécie *Fusarium* com inibição total do crescimento. O mesmo efeito foi encontrado empregando pequenas concentrações de eugenol contra o crescimento e desenvolvimento do mesmo micro-organismo em alimentos em decomposição (ABBASZADEH et al., 2014). Também foi avaliado o efeito contra bactérias patogênicas como a *Salmonella typhi* (DEVI et al., 2010), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (PEREIRA et al., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens* (SCHERER et al., 2009), que são as principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos, as chamadas DTA's.

Com relação às propriedades medicinais, foi constatado que o eugenol possui atividade antileishmanial tanto *in vitro* quanto *in vivo*, podendo ser empregado como um componente para medicamentos no tratamento de *leishmaniose*, doença infecciosa, porém, não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania* (DE MORAIS et al., 2014). Além desse estudo, foi comprovada a ação sinérgica do eugenol junto a antibióticos (ampicilina e gentamicina) contra bactérias orais. Foi verificado o aumento da taxa de mortalidade das bactérias em valores superiores ao efeito utilizando apenas os antibióticos, o que comprova o potencial uso desse composto natural contra bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus* sp.) e periodontopatogênicas *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, causadoras de doenças orais devido à infecções na placa dentária (MOON; KIM; CHA, 2011).

2.3. Acetato de eugenila

O acetato de eugenila ($C_{12}H_{14}O_3$ -2-metoxi-4-prop-2-enilfenol acetato) é um derivado do eugenol que pode ser obtido por catálise química ou enzimática, como mostrado na Figura 1. A síntese ocorre através da reação de acetilação do eugenol e um doador do grupamento acila, geralmente o anidrido acético, gerando como produtos o acetato de eugenila e ácido acético. A substância produzida é líquida e possui uma coloração amarela pálida (PANDEY et al., 2013). Os órgãos *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization* (FAO/WHO) e *European Food Safety Authority* (EFSA) consideram a dose diária de consumo do acetato de eugenila entre 1-5 mg/kg (WHO, 2014; EFSA, 2011). No Brasil, a utilização desta substância é totalmente liberada pois a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segue a recomendação dos produtos aprovados pelas organizações internacionais (ANVISA, 2007).

Figura 1-Síntese de acetato de eugenila por reação de acetilação do eugenol com anidrido acético.



Fonte: AUTOR

O acetato de eugenila é um fenilpropanóide que vem sendo estudado devido à propriedade antimicrobiana (CHIARADIA et al., 2012; SILVA et al., 2015) e medicinal (DE MORAIS et al., 2014; SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010). Estudos mostraram que o eugenol junto com o acetato de eugenila possui a capacidade de reduzir a hiperglicemia em roedores. A suplementação de 100 mg de eugenol e acetato de eugenila por kg na dieta de roedores reduziu significativamente o aumento de açúcar no sangue, danos aos tecidos causados pela hiperglicemia e inibiu a formação de catarata, demonstrando o efeito de proteção dos órgãos e tecidos em diabéticos proporcionado pelos

componentes do óleo de cravo-da-índia (SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA, 2010).

Silva et al. (2015) e Chiaradia et al. (2012) estudaram o efeito antimicrobiano do acetato de eugenila empregando a técnica de halo de inibição. Silva et al. (2015) utilizaram 12 tipos de bactérias, algumas patogênicas. Foram testadas as bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* e Gram negativas *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella choleraesuis*. O volume de 20 µL de acetato de eugenila apresentou o valor máximo de 16,62 mm e 17,55 mm de halo de inibição para bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente.

Chiaradia et al. (2012) também avaliaram o efeito antimicrobiano do éster com o mesmo volume frente a 16 bactérias, sendo as Gram positivas *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* e Gram negativas *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris* e *Yersinia enterocolitica*. O maior halo de inibição foi contra a bactéria *Acinetobacter* sp. com 48,66 mm.

Um estudo mais recente tem vinculado os fenilpropanóides com ação larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, o principal agente transmissor do vírus da Dengue, febre Chikungunya e Zika vírus (causador da microcefalia em recém-nascidos) no Brasil e vem preocupando as autoridades médico sanitárias de todo o mundo (CAMPOS; ANDRADE, 2003; FURTADO et al., 2005).

Segundo os estudos, o efeito larvicida deste éster é explicado devido à presença do anel aromático e uma cadeia lateral com uma ligação dupla alílica em sua estrutura, o que o torna mais eficaz e mais reativo contra a parede celular da larva, inibindo o desenvolvimento e o crescimento dos insetos (PANDEY et al., 2013). Desta forma, estudos verificaram que pequenas quantidades de acetato de eugenila são eficazes contra o desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti* (BARBOSA et al., 2012).

2.4. Atividade larvicida de terpenos e fenilpropanóides obtidos a partir de óleos essenciais

Os terpenos e fenilpropanóides são as principais substâncias constituintes dos óleos essenciais como já foi citado no item anterior. E muitos autores afirmam que a eficácia da atividade larvicidas dos óleos essenciais está vinculada com a relação entre efeito larvicida e a composição química do óleo essencial, porém é difícil afirmar qual o mecanismo de ação das substâncias sobre os insetos. (ROMA; PAVELA, 2015; SMITH et al., 2016)

Uma explicação que pode ser dada é pelo fato da associação entre compostos lipofílicos provocar a desativação de proteínas e inibição enzimática, o que pode comprometer o desenvolvimento do inseto. SCOTTI et al. (2013) confirmou esse comportamento em um estudo quimiométrico aplicado a compostos ativos como terpenos e fenilpropanóides. Neste estudo, a atividade larvicida foi fortemente correlacionada com variáveis independentes com perfil hidrofóbico. Onde foi verificado que as ligações duplas são importantes na atividade larvicida de moléculas naturais, porque a hidrogenação dessas ligações diminui o caráter lipofílico desses compostos, restringindo sua passagem através da cutícula das larvas.

Além disso, os óleos essenciais e seus constituintes afetam os processos bioquímicos, que perturbam especificamente o equilíbrio endocrinológico dos insetos. Podendo ter ação neurotóxica ou atuar como reguladores de crescimento de insetos, interrompendo o processo normal de morfogênese. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) também desempenha um papel fundamental na modulação da atividade larvicida (RATTAN, 2010).

Os sesquiterpenos são citados por possuírem maior eficácia do que os monoterpenos em relação a atividade larvicida. Porém, estudos mostram que a ação sinérgica também pode desempenhar um papel muito importante em termos de eficácia. De modo geral, a ação larvicida dos óleos essenciais é feita com base na composição química e eficácia biológica. Assim, a atividade larvicida que apresenta o valor de CL_{50} abaixo de 100 ppm ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) podem ser considerada eficiente contra as larvas de teste. Porém o valor de concentração letal 50 % CL_{50} , concentração necessária para atingir a morte de 50 % das larvas de teste, pode variar segundo diversos fatores como estágio de desenvolvimento da larva, a temperatura do ambiente e a capacidade das substâncias para

penetrar na cutícula, bem como o mecanismo de ação (PAVELA et al., 2009, RATTAN, 2010).

Estudos que mostram que os óleos essenciais podem reduzir significativamente a fecundidade, a fertilidade e a vitalidade dos insetos quando são aplicadas doses ou concentrações letais ou subletais (PAVELA et al., 2007).

Desta forma, a biotecnologia moderna oferece alternativas como métodos de encapsulação e o uso da nanotecnologia para desenvolver formulações visando a aplicação das substâncias derivadas de óleos essenciais em formulações de inseticidas, larvicidas e repelentes comerciais. Com o objetivo de diminuir a dosagem de larvicidas comerciais que podem ter efeitos nocivos ao meio ambiente (MUTHUKUMARAN ET AL., 2015; ARAÚJO ET AL., 2016).

2.5. Lipases

Enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos devido à sua regioseletividade, seletividade em relação ao substrato ou ao grupo funcional e estereosseletividade. Dentre as principais enzimas utilizadas industrialmente tem-se as carboidrases, proteases, oxirredutases e as lipases. Esses catalisadores biológicos possuem diversas vantagens, uma das mais importantes é a obtenção de elevada eficiência catalítica em condições reacionais não agressivas ao meio ambiente quando submetidas as suas condições ótimas específicas de temperatura e pH (KOBBLITZ, 2008).

As lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são esterases que apresentam uma característica particular como a sua solubilidade em água com maior afinidade por substratos hidrofóbicos.

As lipases são classificadas de modo geral de acordo com o tipo de especificidade que apresentam: regioseletividade, seletividade ao substrato e enantioseletividade. A regioseletividade é a propriedade de reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato, é o caso das lipases que hidrolisam apenas as ligações nas posições 1,3 do triglicerídeo. A seletividade pode ser em relação ao substrato, que é a capacidade de hidrolisar as ligações de um ácido graxo específico; em relação ao tamanho da cadeia, devido à capacidade de identificação do ácido graxo pelo tamanho da cadeia, sendo esta curta (até 10 C), média (10 a 14 C) ou longa (acima de 16 C); em relação ao grau de insaturação do ácido graxo, sendo o mesmo saturado, mono ou poli-insaturado; em

relação à localização das insaturações, o que também pode determinar a atividade catalítica da enzima sobre o substrato. A enantiosseletividade está relacionada com a capacidade de a enzima reagir com isômero específico do substrato (KOBBLITZ, 2008).

Em oposição à maioria das enzimas, as lipases exibem uma vasta especificidade, possibilitando o uso de uma variedade significativa de substratos. Isto permite utilizar a mesma lipase como catalisador para diferentes reações, característica fundamental para a obtenção de diversos produtos químicos, farmacêuticos, alimentícios e de energia como o biodiesel, um dos principais produtos obtidos por essas enzimas nas últimas décadas (STERGIOU et al., 2013).

As lipases podem ser obtidas por diversas fontes como micro-organismos (bactérias e fungos), animais ou vegetais. Cada fonte confere à enzima diferentes características em relação à posição do sítio ativo, especificidade do ácido graxo, termoestabilidade e pH ótimo. Assim, para alcançar uma elevada eficiência catalítica é fundamental o estudo prévio da origem do catalisador (KOBBLITZ, 2008; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e sua principal atuação é na catálise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, dialciligliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além disso, são capazes de atuar como biocatalisadores em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não-aquoso (solventes orgânicos ou fluidos supercríticos), como também em reações de alcoólise, acidólise e aminólise (STERGIOU et al., 2013).

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas comercialmente, isso porque a variedade de micro-organismos existentes proporciona a obtenção de lipases com diferentes características. Além disso, o uso de micro-organismos na produção dessas enzimas favorece a ampliação de escala para a produção industrial (KOBBLITZ, 2008). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* que é uma proteína de cadeia única que consiste de 269 aminoácidos, peso molecular de 31.700 g/mol e ponto isoeletrico de 4,4 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) .

A maioria das reações catalisadas por enzimas tem como principal dificuldade a separação do biocatalisador ao final da reação, por isso uma das alternativas para a manutenção da estabilidade e favorecer a recuperação do biocatalisador, é a imobilização (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A Figura 3 apresenta esquematicamente o processo de imobilização de lipases, que é baseado na fixação do biocatalisador em

um suporte utilizando métodos como a adsorção, ligação covalente em materiais sólidos, retenção em polímeros (orgânicos ou inorgânicos) ou microemulsões (STERGIOU et al., 2013).

O método mais utilizado para a imobilização de enzimas, incluindo as lipases, é a adsorção, isso porque é um processo relativamente fácil e garante a estabilidade do biocatalisador durante a reação. As principais vantagens das lipases imobilizadas comerciais são: o bom desempenho em sistemas não aquosos; a facilidade de recuperação do biocatalisador, possibilitando a separação do produto no final da reação; possibilidade de reuso, o que implica na diminuição de custos; formação mínima de compostos indesejáveis; termoestabilidade; resistência a solventes orgânicos e, por fim, a obtenção de maior produtividade do processo (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; STERGIOU et al., 2013).

A maioria das enzimas imobilizadas comerciais são de origem microbiana, as principais são Novozym® 435, Lipozyme® TL IM e Novozym® 40086, fornecidas pela empresa NOVOZYMES. Cada enzima possui suas condições ótimas de pH e temperatura definidas para a garantia de um bom rendimento da reação catalítica (NOVOZYMES, 2013). A Tabela 1 apresenta as condições ótimas e a fonte de origem de cada lipase imobilizada comercial.

Tabela 1 - Fonte microbiana e as condições ótimas de algumas lipases imobilizadas comerciais.

Lipase imobilizada comercial	Fonte microbiana	pH ótimo	Temperatura ótima
Novozym® 435	<i>Candida antarctica</i> B	5-9	30-60 °C
Lipozyme® TL IM	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6-8	50-75 °C
Novozym® 40086	<i>Rhizomucor miehei</i>	7-10	30-50 °C

Fonte: (NOVOZYMES, 2013)

2.6. Produção de ésteres com lipases imobilizadas

A reação de esterificação catalisada por lipases imobilizadas em sistemas livres de solvente vem atraindo o interesse dos pesquisadores, devido ao aumento da utilização de ésteres orgânicos na indústria biotecnológica, química e alimentícia (GANGULY; NANDI, 2015; KHAN; RATHOD, 2015; WANG et al., 2014; SILVA et al., 2015). Os ésteres obtidos através da catálise enzimática vêm sendo aplicados na indústria como antioxidantes, emolientes, biossurfactantes, aromas e fragrâncias. Existem diversos estudos na literatura empregando lipases imobilizadas comerciais ou não na produção de ésteres de diferentes fontes como cera, ácidos graxos e óleos essenciais (CHANG et al., 2007; GANGULY; NANDI, 2015; VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015b; ZHAO et al., 2014). Entre os ésteres estudados estão Ésteres de Linalool Miristato de Isopropila (VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015a; PAROUL et al., 2010) produzido pela a enzima Novozym 435, Acetato de isoamila pela lipase imobilizada de *Candida antarctica*-CALB (AZUDIN; DON; SHUKOR, 2013), Valeroato de Etila (aroma de maçã verde) e Acetato de hexila (aroma de pera) lipase de *Staphylococcus simulans* não comercial (GHAMGUI et al., 2005) e os ésteres de eugenol como : Caprilato de eugenila e acetato de eugenila catalisados pela enzima Lipozyme TL IM (CHAIBAKHSH et al., 2012; CHIARADIA et al., 2012; SILVA et al., 2015) e Benzoato de eugenila pela lipase imobilizada de *Staphylococcus aureus* não comercial (HORCHANI et al., 2010).

2.6.1. Produção de ésteres com reatores de leito fixo empacotado com enzimas imobilizadas comerciais

As enzimas imobilizadas possibilitaram a aplicação de outros tipos de reatores nas reações de síntese de bioprodutos. Isso porque a princípio as enzimas eram comercializadas na forma livre e solúvel, o que dificultava o seu reuso e recuperação ao final do processo em reatores de batelada (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; ITABAIANA; DE MARIZ E MIRANDA; DE SOUZA, 2013). A Figura 2 mostra o desenho esquemático de alguns reatores de leito empregados na produção de ésteres com lipases imobilizadas. Segundo SCHMIDELL et al. (2001) os tipos de reatores que utilizam enzimas imobilizadas são:

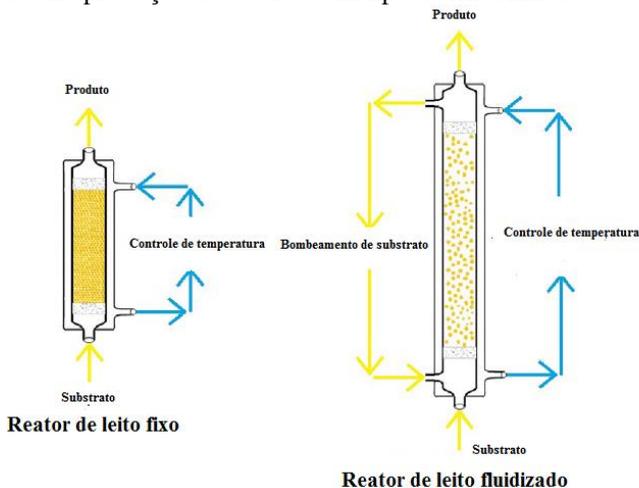
✓ **Reator de batelada:** usado em processos onde, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade por filtração ou decantação.

✓ **Reator agitado contínuo:** Possui uma entrada e saída contínua de fluido. Nesse tipo de reator, pode ocorrer um eventual arraste de uma certa quantidade de enzima no efluente, e por esse motivo normalmente, coloca-se na saída do sistema algum dispositivo que permite a recuperação como por filtração.

✓ **Reator de leito fixo:** Reator em que a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através do leito.

Reator de leito fluidizado: A enzima imobilizada encontra-se em suspensão no interior do reator, sendo a solução de substrato bombeada através do leito com velocidade de fluxo que impede a deposição das partículas no fundo do reator.

Figura 2- Desenho esquemático dos principais reatores de leito empregados na produção de ésteres com lipases imobilizadas.



Fonte : Adaptado de LORENZONI et al. (2015)

Os reatores de leito fixo empacotado (*Packed Bed Reactor-PBR*) estão sendo estudados como uma alternativa para a síntese enzimática de ésteres, pois possuem vantagens, como a facilidade de operação em modo contínuo, garantia da estabilidade da enzima, possibilidade de reuso do biocatalisador e a ausência de etapas complexas de purificação e

separação do produto ao final do processo (*downstream process*), devido à permanência da enzima imobilizada no leito do reator. Isso torna a utilização desse tipo reator interessante do ponto de vista econômico para aplicação industrial (BALCÃO, PAIVA; MALCATA, 1996).

Diversos autores têm avaliado os efeitos das variáveis que influenciam no bom rendimento da produção de ésteres utilizando esse tipo de reator. Chang et al. (2007) produziram o éster aromático laurato de hexila, utilizado em formulações de cosméticos como emoliente. Foram avaliadas a habilidade da enzima Lipozyme IM-77, lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, na catálise enzimática do éster utilizando como substrato 1-hexanol e ácido láurico. Através da análise de superfície de resposta foram avaliados os efeitos da temperatura de reação (35-55 °C), vazão de alimentação (1,5-4,5 mL.min⁻¹) e razão molar de substrato 1-hexanol e ácido láurico (1:1-1:3) na velocidade de produção (mmol.min⁻¹) de laurato de hexila. A condição otimizada para a produção do éster laurato de hexila foi com temperatura de reação de 45 °C, razão molar de substratos 1:2 e vazão de alimentação de 4,5 mL.min⁻¹, alcançando a produção de 435,6 ± 0,9 mmol.min⁻¹ de éster.

Skoronski et al. (2014) empregaram o reator de leito fixo empacotado contendo a enzima Lipozyme® RM como biocatalisador da reação de síntese do éster alifático octanoato de pentila. Nesse trabalho foram avaliados a razão molar substrato/enzima e a temperatura. A melhor condição para a produção do éster foi observada na temperatura de 30 °C obtendo aproximadamente 60 mmols de éster com 0,5 g de enzima no interior do leito.

Zhao et al. (2014) produziram ésteres de ácido ascórbico a partir de gordura de porco utilizando como substratos ácido L-ascórbico e gordura de porco e álcool terc-amílico como solvente em um reator de leito fixo (PBR) com lipase imobilizada (Novozym 435). Os efeitos da vazão de alimentação, temperatura de reação e da razão molar do substrato foram observados sobre a conversão molar do éster através da análise de superfície de resposta. As condições ótimas obtidas para a produção do éster foram com vazão de alimentação 1,07 mL.min⁻¹, temperatura da reação 56,44 °C e razão molar 2,24:1, com conversão de 50,83%.

Vadgama, Odaneth e Lali (2015) produziram o éster miristato de isopropila, muito usado como emoliente, agente espessante e lubrificante na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. A reação de esterificação com lipase imobilizada de *Candida antarctica* B-CalB a

NOVOZYM 435 foi estudada em dois reatores. Primeiro em modo batelada em agitador rotatório orbital avaliando os parâmetros temperatura, velocidade de agitação (rpm), solvente orgânico, carga de biocatalisador e estabilidade operacional da enzima. Obtendo a conversão de éster de 87,65% com razão molar de álcool isopropílico e ácido mirístico de 15:1 com 4% (p/p) de enzima, velocidade de agitação de 150 rpm, temperatura de 60 °C com um tempo de reação de 5 horas (VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015a). O segundo tipo de reator foi o de leito fixo empacotado com o mesma enzima e razão molar de ácido mirístico e álcool isopropílico empregando vazão de alimentação de 3 mL.min⁻¹ (tempo de residência de 16 min). Foi obtida uma conversão de 98,5% do éster em apenas 30 minutos de reação com a mesma razão molar e temperatura, tempo relativamente menor ao do processo com reator em batelada, o que evidencia uma das principais vantagens desse processo.

Desta forma, para a garantia de uma síntese de ésteres com elevados valores de conversão em reatores de leito fixo empacotado do tipo *Packed Bed Reactor*, é fundamental realizar um estudo prévio de parâmetros como a razão molar de substrato, temperatura de reação, vazão de alimentação (tempo de residência) e a presença ou ausência de solvente. Isso porque a maioria dos ésteres produzidos industrialmente, através das reações de esterificação e transesterificação, utilizam temperaturas entre 150-240 °C e catalisadores químicos ácidos ou básicos, condições que nem sempre favorecem a obtenção de elevadas quantidades do produto final gerando uma quantidade considerável de efluentes (KHAN; RATHOD, 2015)

Desta forma, os processos de síntese enzimática de ésteres se tornam uma alternativa para a substituição dos processos de síntese química, pois oferecem menos riscos ao meio ambiente. Isso porque reações de síntese de ésteres catalisadas por enzimas ocorrem em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão e produzem efluentes menos nocivos ao meio ambiente. Além disso, se encaixam no conceito da química verde, pois é um tipo de processo ambientalmente seguro com a utilização de menos reagentes com ou sem a presença de solventes. Outro fator que se pode levar em consideração, é que os ésteres obtidos de fontes naturais, mesmo após passar pelo processo enzimático, continuam sendo considerados naturais, devido à fonte de origem (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013; KHAN; RATHOD, 2015; SERRANO-ARNALDOS et al., 2016).

2.7. Encapsulação de substâncias bioativas

A encapsulação de uma substância consiste em isola-la do meio externo por uma barreira física por um determinado tempo com o objetivo de preservar/prolongar as suas propriedades bioativas ou funcionais. Diversos tipos de substâncias vêm sendo submetidos a esse tipo de processo, dentre eles os que oferecem sabor como aromatizantes, pigmentos, acidulantes, nutrientes (vitaminas), enzimas e conservantes (AZEREDO, 2005). Na indústria de alimentos, o material utilizado como encapsulante é normalmente constituído por materiais comestíveis ou biodegradáveis.

A diferença entre encapsulação, microencapsulação e nanoencapsulação está no tamanho da cápsula, que normalmente assume uma forma esférica por apresentar a menor relação área/volume. As cápsulas podem ser classificadas por tamanho: macro- ($>5000 \mu\text{m}$), micro- ($0,2-5000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2 \mu\text{m}$), diferindo também quanto à distribuição da substância na matriz encapsulante. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o composto ativo encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior de uma matriz encapsulante, que pode ser constituída de polímeros ou lipídeos, por exemplo, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado na partícula. Cápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (AZEREDO, 2005).

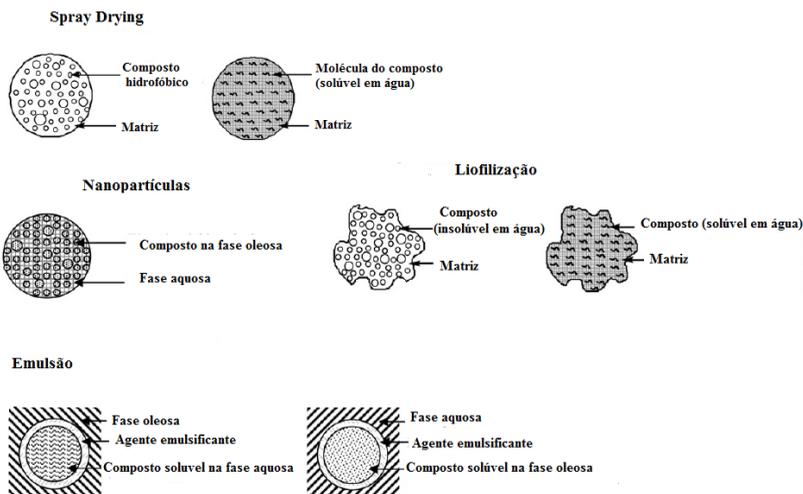
As principais vantagens dos processos de encapsulação são: a redução das interações do núcleo com fatores ambientais, retardo de alterações indesejadas causadas pela luz (fotooxidação) ou oxigênio (oxidação), separação dos componentes reativos ou incompatíveis presentes no meio, redução da taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, no caso de compostos voláteis) e o aumento da solubilidade, o que proporciona a melhor incorporação/dispersão do composto em sistemas aquosos, como, por exemplo, a encapsulação de compostos hidrofóbicos em nanopartículas de polímero dispersas em água (NEDOVIC et al., 2011; FANG; BHANDARI, 2010).

Dentre as vantagens citadas acima, a que chama a maior atenção dos pesquisadores é a possibilidade do composto ser liberado da cápsula lentamente ou a partir da ocorrência de um determinado evento, como por

exemplo a diminuição do pH. Esse conceito é denominado de *liberação ativada* ou prolongada e refere-se à modificação do meio necessária para que ocorra o início da liberação ou a velocidade liberação reduzida, que prolonga o tempo de liberação total. Esse tipo de liberação ajuda a evitar a utilização inefetiva e a perda das propriedades dos compostos em curto espaço de tempo (AZEREDO, 2005).

As principais técnicas de encapsulação utilizadas são *spray dryer* (BAYRAM; BAYRAM; TEKIN, 2005), liofilização (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014), extrusão, coaservação, lipossomas (SEBAALY et al., 2015), emulsão (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013), nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; GARG; SINGH, 2011; ROUSSAKI et al., 2014); além do surgimento de técnicas mais recentes, como a aplicação de fluidos supercríticos nos processos de formação de partículas (BAKKALI et al., 2008; COCERO et al., 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012; PRIAMO et al., 2013). A Figura 3 apresenta resumidamente as características das partículas obtidas em alguns processos de encapsulação de compostos hidrofóbicos.

Figura 3 - Principais características das microcápsulas obtidas por algumas técnicas convencionais de encapsulação de compostos hidrofóbicos.



Fonte: Modificado de FANG e BHANDARI (2010).

Na indústria de alimentos, a maioria dos materiais empregados no processo de encapsulação são compostos biodegradáveis e comestíveis. Esses materiais devem possuir uma certa resistência a determinados tipos de processamento, favorecendo o armazenamento e a ausência de interação com o composto encapsulado. Os principais materiais utilizados como agentes encapsulantes são polissacarídeos derivados do amido (maltodextrinas), extratos vegetais (goma arábica), extratos marinhos (alginato), derivados de animais (quitosana), biopolímeros derivados de micro-organismos (poli(ácido láctico) PLA, polihidroxibutirato (PHB) e poli(hidroxibutirato-co-valerato) PHBV), proteínas (gelatinas e proteínas do soro de leite) e lipídeos (ácidos graxos, ceras e fosfolipídeos) (NEDOVIC et al., 2011).

2.8. Encapsulação pela técnica de Nanoemulsificação (NE)

As nanoemulsões baseiam-se na mistura de dois líquidos imiscíveis em um processo de alto cisalhamento formando uma dispersão de gotas em um meio contínuo com diâmetro médio em torno de 100 nm.

As nanogotas são estabilizadas contra a degradação difusional (*Ostwald Ripening*), usualmente pela adição de um agente ultrahidrofóbico, e coalescência pela adição de um agente surfactante, obtendo-se uma dispersão coloidalmente estável (DONSI et al., 2011; MASON et al., 2006; SARI et al., 2015). A Figura 4 apresenta esquematicamente o processo de encapsulação de um composto hidrofóbico por nanoemulsificação.

Figura 4 - Esquema de encapsulação de composto lipofílico por nanoemulsificação.



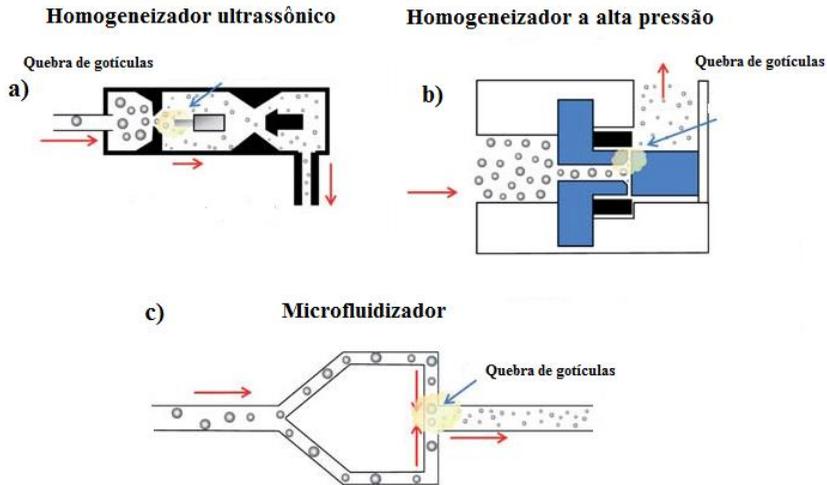
Fonte: Modificado de Sari et al. (2015)

O uso da ponteira de ultrassom na formação da nanoemulsão é a técnica mais empregada em escala laboratorial. A aplicação de um campo acústico produz ondas interfaciais que resultam na dispersão da fase oleosa em água e na formação de gotículas. Além disso, a aplicação do ultrassom provoca a cavitação acústica, cujo choque gerado pelas ondas sonoras forma cavidades que quebram as gotas da emulsão. Cada colisão de bolha resulta em uma implosão numa escala microscópica, esse evento provoca uma elevada turbulência do sistema, que é eficaz para a diminuição do tamanho das gotículas abaixo de 100 nm (KENTISH et al., 2008; SUGUMAR et al., 2014).

A emulsificação com a utilização de ultrassom é um método rápido e eficiente para a formação de uma nanoemulsão estável com pequeno diâmetro de gota e baixo índice de polidispersão. Além disso, esse tipo de processo permite controlar o diâmetro das gotículas através da otimização dos parâmetros como a concentração da substância hidrofóbica, concentração do surfactante, razão de mistura da substância hidrofóbica e agente tensoativo, viscosidade da fase contínua e o tempo de sonicação (SOUTO et al., 2011; SUGUMAR et al., 2014).

A aplicação de energia intensa nas emulsões também pode ser realizada por meio de dispositivos mecânicos que oferecem elevada energia de cisalhamento como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos e do tipo estator-rotor, como o equipamento de ultra-turrax (KENTISH et al., 2008; SOUTO et al., 2011). A Figura 5 apresenta esquematicamente os principais dispositivos mecânicos empregados na produção de nanoemulsões.

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo mecânico do homogeneizador ultrassônico (a), homogeneizador a alta pressão (b) e microfluidizador (c).



Fonte: Adaptado de McClements et al. (2011)

As nanoemulsões são muito aplicadas na indústria farmacêutica e alimentícia em relação a emulsão convencional. Isso porque a diminuição do tamanho de partícula favorece o aumento da estabilidade física e da superfície de contato das gotículas, o que proporciona um aumento na biodisponibilidade da substância ativa. Além disso, as nanoemulsões podem servir como agentes de entrega para substâncias bioativas lipofílicas, como medicamentos na indústria farmacêutica, compostos de aroma, sabor e conservantes na indústria alimentícia, pesticidas insolúveis em água na indústria agroquímica e veículo para a penetrar na pele em cosméticos. A aplicação tecnológica das nanoemulsões também é favorecida devido à sua transparência, podendo ser incorporadas em formulações sem causar turbidez, o que é indesejável para alguns cosméticos e alimentos, por exemplo (GARG; SINGH, 2011; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013). No entanto, vale ressaltar que esta transparência só é obtida para tamanhos médios de gotas muito reduzidos, que são obtidos com uma concentração de surfactante muito elevada e baixa concentração de fase dispersa.

A técnica de encapsulação/dispersão por nanoemulsão vem sendo estudada por pesquisadores visando o aumento da disponibilidade de substâncias bioativas com natureza lipofílica, como vitaminas lipofílicas, agentes conservantes, carotenóides e flavonoides em um meio aquoso. Os compostos constituintes dos óleos essenciais são a grande maioria de natureza hidrofóbica, o que dificulta a incorporação em sistemas aquosos como em formulações alimentícias e farmacêuticas (BAKKALI et al., 2008; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SUGUMAR et al., 2014).

Salvia-Trujillo et al. (2013) utilizaram a técnica para produzir nanoemulsões com óleos essenciais de capim-limão, cravo, chá preto, tomilho, gerânio, manjerona, palmarosa, pau-rosa, sálvia ou hortelã, estabilizadas com Tween 80 e alginato de sódio preparadas por homogeneização de alta pressão. As nanoemulsões obtidas por microfluidização contendo óleos essenciais de capim-limão, cravo-da-índia tomilho e palmarosa apresentaram maior ação bactericida contra *Escherichia coli*, atingindo reduções logarítmicas de 4,1, 3,6, 2,8 e 3,9 após 30 min de contato. O rápido decréscimo de crescimento dos microorganismos evidencia o potencial uso das nanoemulsões em formulações de conservantes alimentícios.

Ghosh, Mukherjee e Chandrasekaran (2013) formularam uma nanoemulsão com óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) empregando o tensoativo não iônico Tween 80 e água pelo método de miniemulsificação com o uso de dispersor ultrassônico. Foram avaliados parâmetros como a concentração de surfactante e tempo de emulsificação até obter uma nanoemulsão estável de óleo de manjeriço com diâmetro médio de gota de 29 nm com o tempo de emulsificação de 15 min. A ação bactericida da nanoemulsão foi avaliada contra a bactéria *Escherichia coli* e foi verificado o aumento da permeabilidade do composto na membrana da célula bacteriana, comprovando o aumento da biodisponibilidade do óleo essencial devido ao aumento da área superficial.

Sugumar et al. (2014) estudaram a nanoemulsão contendo óleo essencial de eucalipto, na fase orgânica, e surfactante não iônico, Tween 80, como emulsificante na fase aquosa na proporção de 1:1 v/v. O tempo de miniemulsificação empregando dispersor ultrassônico variou de 0 a 30 minutos, com o objetivo de estudar o efeito do tempo na formação da nanoemulsão e a estabilidade física da formulação. A nanoemulsão mais estável foi obtida em 30 min de sonicação com o diâmetro de gotícula médio de 51 nm. A ação antimicrobiana da emulsão obtida foi realizada

com a bactéria *Staphylococcus aureus*, na qual se obteve morte completa do micro-organismos em apenas de 15 min de interação. Confirmou-se, novamente, o aumento de interação da nanoemulsão com a membrana celular das bactérias. Além desse, o teste confirmou a capacidade de cicatrização de feridas em potencial em ratos *Wistar*, destacando mais uma potencial aplicação das nanoemulsões em formulações para indústria farmacêutica.

O uso de nanoemulsões como carregadores de óleos essenciais com propriedades larvicidas vem sendo reportado na literatura (OLIVEIRA et al., 2017, DUARTE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Oliveira et al. (2017) demonstraram que a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Pterodon emarginatus* com diâmetro médio de partícula de $53,2 \pm 0,5$ a $128,0 \pm 6.2$ nm, utilizando óleo essencial $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o surfactante Tween 80 (Polisorbato 80) na proporção 1:1 foram capazes de induzir a morte das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

O mesmo foi verificado por Rodrigues et al. (2014), avaliando formulações de nanoemulsões contendo óleo essencial de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer, Fabaceae). Duarte et al. (2015) utilizaram o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae, na formulação de nanoemulsões do tipo óleo em água, cuja a ação larvicida foi verificada após 24 horas com $80 \pm 10\%$) e a 48 horas ($90 \pm 10\%$) de morte das larvas do mosquito *A. aegypti*.

2.9. Encapsulação pela técnica de formação de Nanopartículas Lípidas Sólidas (NLS)

Segundo Souto et al. (2011), lipídeos caracterizados como ácido graxos formam NLS altamente cristalinas, acarretando na formação de estruturas organizadas e com poucos lugares para acomodar o princípio ativo, podendo causar a expulsão destes; enquanto os lipídeos de composições mais complexas formam estruturas com várias imperfeições, oferecendo mais espaço para alocar as moléculas de princípio ativo.

A técnica de encapsulação por nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi desenvolvida em 1991, como uma alternativa as técnicas convencionais de encapsulação de princípios ativos, como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas. A diferença dessa técnica está na natureza lipídica da matriz, o que a torna mais adequada para veicular compostos ativos apolares, com a obtenção de partículas com uma

elevada capacidade de carga (SOUTO et al., 2011; ASBAHANI et al., 2015; MEHNERT; MÄDER, 2012; SEVERINO et al., 2012).

As nanopartículas lipídicas sólidas são formadas por um lipídeo sólido a temperatura ambiente, um emulsificante (s) e água. Os principais lipídios utilizados são triglicerídeos (p.ex., tristearina), glicérides parciais, ácidos graxos (p.ex., ácido esteárico), esteróides (p.ex., colesterol) e ceras (p.ex., palmitato de cetila). Os emulsificantes são usados para estabilizar a dispersão de lipídeos e impedir a coalescência das partículas. Os emulsificantes podem variar em relação à carga iônica, balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e massa molar (MEHNERT; MÄDER, 2012).

A preparação das NLS pode ser realizada por fusão-emulsificação, por emulsificação-evaporação do solvente, ou a partir de uma emulsão. Os processos de preparação de NLS por fusão-emulsificação consistem na fusão prévia do ácido graxo, incorporando o princípio ativo por dissolução ou por dispersão. Em seguida, esta fase é emulsificada numa fase aquosa, que contém um tensoativo do tipo óleo em água (O/A) (MEHNERT; MÄDER, 2012; SOUTO et al., 2011). No final, a emulsão recém-preparada é resfriada à temperatura ambiente para a solidificação do ácido graxo e obtenção da dispersão aquosa de NLS. Para a emulsificação do lipídeo fundido com a fase aquosa faz-se uso de ultrassom, agitação mecânica, ou homogeneizadores à alta pressão, como demonstrado no item 2.8. Esses processos podem ocorrer a frio ou a quente, dependendo da temperatura de fusão da fase dispersa. Porém deve-se ter cuidado para que o aumento de temperatura não provoque a degradação/evaporação do composto ativo a ser encapsulado (MEHNERT; MÄDER, 2012; SOUTO et al., 2011).

O uso desses equipamentos provoca a ruptura das gotículas lipídicas de maiores dimensões, originando gotículas pequenas, dispersas na fase aquosa. Porém, o uso incorreto desses dispositivos mecânicos pode acarretar na obtenção de NLS com dimensões heterogêneas e na degradação do composto ativo pelo aumento da temperatura causado pela elevada força de cavitação devido ao tempo de homogeneização ser maior que o necessário (MEHNERT; MÄDER, 2012; NEDOVIC et al., 2011).

Os principais fatores que podem interferir nas características físico-químicas das nanopartículas lipídicas sólidas são a solubilidade do princípio ativo, o polimorfismo do lipídeo, que é a capacidade dos lipídeos de se cristalizar em formas distintas, criando estruturas diferenciadas que podem alterar a liberação do princípio ativo encapsulado, a natureza e

concentração do lipídio e do tensoativo, a temperatura, a força de cisalhamento e o número de ciclos de homogeneização no processo (SOUTO et al., 2011).

A utilização de lípideos sólidos, como matriz para as nanopartículas, é mais interessante devido à possibilidade de liberação prolongada do fármaco, processo que é mais difícil com a utilização de lípideos líquidos, devido a mobilidade do composto ser menor na matriz lipídica sólida (MEHNERT; MÄDER, 2012). As principais vantagens das nanopartículas sólidas são: a possibilidade de liberação prolongada, aumento da estabilidade do composto, alta carga útil, incorporação de compostos lipofílicos e hidrofílicos viáveis, ausência de toxicidade do transportador, baixa, ou mesmo nenhuma, utilização de solventes orgânicos, possibilidade de produção em larga escala e esterilização (FANG; BHANDARI, 2010; KAKRAN; ANTIPINA, 2014; MEHNERT; MÄDER, 2012; NEDOVIC et al., 2011).

Vários estudos revelaram que o sistema de entrega de fármacos contendo lípidios nanoestruturados melhoram a estabilidade e a solubilidade em água de óleos essenciais. Shi et al. (2017) desenvolveu estudo utilizando nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com óleo de mirra contra células antitumorais. Rodenak-Kladniew et al. (2017) produziram nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com linalool para auxiliar no tratamento de células cancerígenas.

Os estudos com a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas para utilização em formulações de larvicidas ainda é limitado. Porém há trabalhos com o uso de nanopartículas metálicas ou poliméricas como sistema de entrega de compostos larvicida e inseticida. Estudos realizados por Elemike et al. (2017) com nanopartículas de prata carregadas com extrato de folha de *Lippia citriodora* verificaram que a incorporação do extrato em nanopartículas de prata foi eficiente contra as larvas de *Culex quinquefasciatus* (um vetor de filariose linfática). O mesmo efeito larvicida das nanopartículas de prata foi verificado por Nalini et al. (2017) contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (vetor da Dengue, Chikugunya e Zika vírus) e *Anopheles stephensi* (vetor da malária).

2.10. Encapsulação de compostos bioativos empregando fluidos supercríticos como anti-solvente: Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

O emprego de fluidos supercríticos em processos de formação de partículas começou a ser observado no final dos anos 90. Isso porque as

propriedades intermediárias entre as de um líquido e as de um gás fornecidas pelos fluidos supercríticos apresentam vantagens sobre os métodos convencionais de formação de partículas. Além disso, essas propriedades podem ser facilmente alteradas por mudanças de pressão e temperatura do sistema (PRIAMO et al., 2013).

O dióxido de carbono, na região supercrítica, apresenta temperatura crítica $T_c=304,2$ K (31,2 °C) e pressão crítica $P_c = 7.38$ MPa condições de processo consideradas moderadas, o que proporciona a aplicação desta técnica para a encapsulação de substâncias termossensíveis, pois nessas condições de temperatura e pressão dificilmente irá ocorrer degradação do composto ativo durante o processo (COCERO et al., 2009; PRIAMO et al., 2013). Além disso, o sc-CO₂, dióxido de carbono supercrítico, proporciona uma fácil separação do composto micronizado e possui elevada solubilidade em solventes orgânicos, o que permite a recuperação de ambos ao final do processo o que torna essa técnica ambientalmente segura.

O dióxido de carbono supercrítico pode ter diferentes funções no processo de formação de partículas, atuando como solvente, soluto, co-solvente ou antisolvente. As principais técnicas estão demonstradas na Tabela 2 junto com a função do fluido supercrítico, do solvente orgânico e o modo de separação de fases (YEO; KIRAN, 2005; COCERO et al., 2009).

Tabela 2 - Resumo das técnicas de formação de partículas empregando fluidos supercríticos.

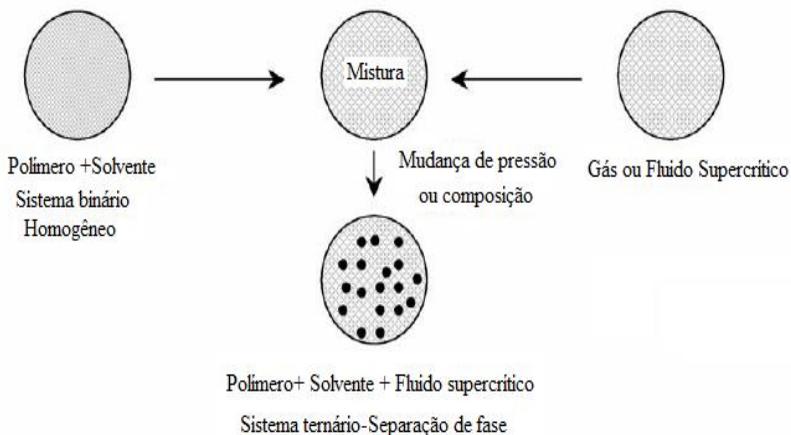
Processo	Papel do Fluido Supercrítico	Papel do solvente orgânico	Modo de separação de fase
<i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i> (RESS)	Solvente	Co-solvente	Pressão/temperatura induzida
<i>Gas Anti Solvent</i> (GAS)	Anti-solvente	Solvente	Solvente induzido
<i>Supercritical Anti Solvent</i> (SAS)	Anti-solvente	Solvente	Solvente induzido
<i>Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids</i> (SEDS)	Anti-solvente/agente dispersante	Solvente /não-solvente	Solvente induzido
<i>Particles from Gas Saturated Solutions</i> (PGSS)	Soluto		Pressão/temperatura /solvente induzido

Fonte: Adaptada de (YEO; KIRAN, 2005)

A técnica conhecida como Anti-solvente supercrítico (SAS), Sistema de Extração de Solvente em Aerosol (ASES) ou Precipitação com Antissolvente Comprimido (PCA). Foi a primeira desenvolvida com a ação do fluido supercrítico como anti-solvente sobre as soluções contendo o polímero e o composto de interesse. O polímero é dissolvido em um solvente líquido e a solução é pulverizada para dentro de uma câmara onde há um fluido supercrítico (anti-solvente) provocando rápido contato entre os dois o que gera uma maior relação de supersaturação da solução, resultando em uma rápida nucleação e crescimento, formando as micropartículas como mostrado na Figura 6. Uma vantagem especial

desta técnica é a possibilidade de trabalhar em operações contínuas, o que proporciona o aumento de escala para a produção em massa de partículas (YEO; KIRAN, 2005).

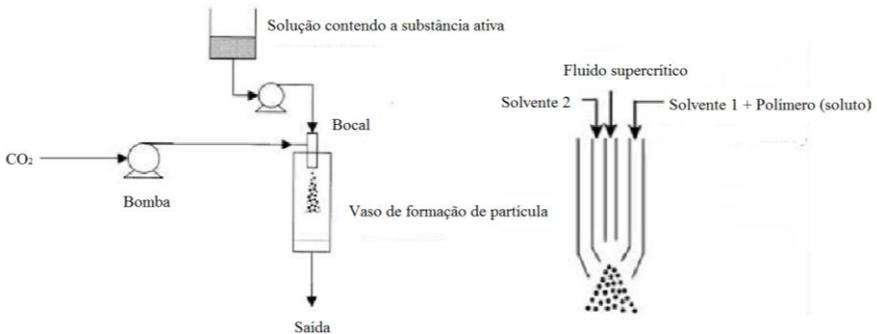
Figura 6 - Representação esquemática dos processos que utilizam CO₂ como anti-solvente.



Fonte: Adaptada de YEO e KIRAN, 2005.

A técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos, em inglês, *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*, é uma versão modificada do processo SAS, em que a solução líquida e o fluido supercrítico são pulverizadas em conjunto, utilizando um injetor coaxial, específico para o processo. São empregados dois canais e três bicos para a precipitação dos compostos individuais e binários, respectivamente. O fluido supercrítico atua como um anti-solvente e como um meio de dispersão, o contato espontâneo proporcionado pelas correntes de alta velocidade da solução líquida e do fluido supercrítico gera a mistura dispersa e provocando a precipitação das partículas (COCERO et al., 2009; PRIAMO et al., 2013). A Figura 7 apresenta esquematicamente como ocorre a interação do solvente com o soluto no processo de formação de partícula SEDS.

Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercríticos (SEDS).



Fonte: Adaptada de Boschetto (2014).

O agente encapsulante ou material de revestimento das partículas exerce um papel importante no processo de encapsulação por SEDS, pois ele é responsável por proporcionar proteção e permitir uma liberação controlada da substância ativa. As principais propriedades desses materiais são a biocompatibilidade, ausência de toxicidade, elevada capacidade de preservar as propriedades do composto encapsulado, ou seja, não há interação entre o composto e o material de revestimento da cápsula, ser de fácil precipitação para o tipo de processo escolhido, ser biodegradável, formar soluções de baixa viscosidade e ser de baixo custo (COCERO et al., 2009; PRIAMO et al., 2013).

As partículas formadas nesses processos são revestidas por polímeros de diferentes origens que geralmente são solúveis em solventes orgânicos. Os principais polímeros biodegradáveis empregados são constituídos por materiais como polissacarídeos, polímeros à base de amido, dextrana, inulina e ciclodextrinas (COCERO et al., 2009).

O poli(hidroxibutirato) (PHB) e poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) são poliésteres termoplásticos de origem bacteriana que possuem estrutura química semelhante aos poliésteres sintéticos convencionais (SQUIO; FALCÃO DE ARAGÃO, 2004). Devido às suas características como biodegradabilidade e biocompatibilidade, esses polímeros vem sendo estudado no processo SEDS como material de revestimento de partículas contendo compostos com propriedades

biotivas como o β -caroteno, astaxantina e licopeno (FRANCESCHI et al., 2009; MACHADO et al., 2014; PRIAMO et al., 2010).

Além de favorecer a manutenção das propriedades dos compostos foi verificado que a obtenção de um bom desempenho e o alcance de uma elevada eficiência de encapsulação no processo de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos depende do estudo de alguns fatores que influenciam no processo como a escolha do solvente, a temperatura e a pressão da câmara de precipitação, o fluxo de anti-solvente, o fluxo de solução orgânica contendo o composto ativo e a concentração do composto ativo e do polímero na solução de alimentação do sistema (CHATTERJEE; BHATTACHARJEE, 2013; FRANCESCHI et al., 2009; PRIAMO et al., 2010). Além disso, após a obtenção das cápsulas é necessário um estudo de liberação do composto encapsulado em PHBV em diferentes meios (aquosos ou não) para assim verificar a viabilização da aplicação das mesmas em formulações farmacêuticas, cosméticas, químicas ou alimentícias (PRIAMO et al., 2011).

2.11. Considerações sobre o estado da arte

Com base no descrito acima pode-se observar que existe uma variedade de trabalhos na literatura relatando os benefícios das propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais do eugenol, porém poucos relatam as propriedades bioativas dos demais componentes do óleo essencial de cravo-da-índia, como o acetato de eugenila, β -cariofileno e α -humuleno. O efeito antimicrobiano do acetato de eugenila obtido enzimaticamente já foi verificado na literatura. Porém, o potencial larvicida do éster obtido através da reação de acetilação via enzimática frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, principal transmissor da Dengue, ainda não foi estudado.

Outro desafio deste trabalho é a possibilidade de produção de éster de óleos essenciais em reator de leito fixo empacotado (PBR), devido às vantagens em relação ao reator em batelada, o que torna a utilização desse tipo de reator interessante do ponto de vista econômico para aplicação industrial. Além disso, os processos de síntese enzimática de ésteres se tornam uma alternativa para a substituição dos processos de síntese química, pois ocorrem em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão e produzem efluentes menos nocivos ao meio ambiente. Com isso, se encaixam perfeitamente no conceito da química verde, pois

é um tipo de processo ambientalmente amigável com a utilização de menos reagentes e ausência de solventes.

O acetato de eugenila é uma substância de difícil aplicação em sistemas aquosos por causa da sua característica lipofílica. Entretanto, a encapsulação desse composto ativo tem como objetivo favorecer a sua incorporação como ativo larvicida, o que ainda é muito pouco explorado na literatura. Assim como, não há trabalhos utilizando os métodos de Nanoemulsificação (NE), Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluídos Supercríticos (SEDS) para formação de nanopartículas carreadoras do éster. Esse estudo pode favorecer o armazenamento e o aumento da biodisponibilidade dessa substância, para por fim aplicar em formulações químicas e farmacêuticas. Visando auxiliar no combate ao mosquito *Aedes aegypti*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Substratos

Os substratos utilizados para a reação de acetilação foram o óleo essencial da folha de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, da Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, São Paulo, Brazil, 83,4% de eugenol, 0,04% acetato de eugenila, β -cariofileno 11,4%, α -humuleno 3,1%) e anidrido acético (Vetec, 98%) como agente doador do grupo acila. Padrão de acetato de eugenila foi obtido da Sigma-Aldrich (Fluka, 99%). A Tabela 3 apresenta a composição do óleo essencial, segundo o fornecedor.

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

Características	Especificações
Aparência	Líquido
Cor	Amarelo Palha a Castanho
Impurezas	Isento
Odor	Típico tempero
Densidade (20 °C)	1,030 - 1,050
Índice de Refração (20 °C)	1,520 - 1,540
Principal componente	Eugenol - 83%

Fonte: Fornecedor FERQUIMA

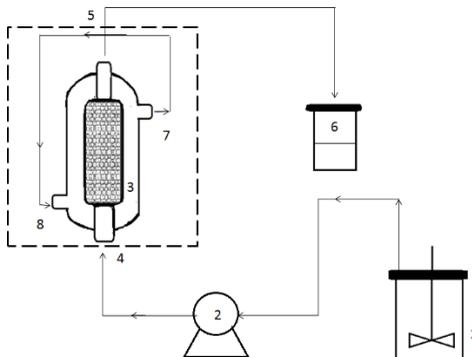
3.2. Catalisador

O catalisador empregado na reação de acetilação enzimática foi a preparação comercial Lipozyme TL IM - lipase produzida por fermentação submersa de *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em resina fenólica pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. O derivado enzimático apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicéride. É recomendável o uso em solventes orgânicos, uma vez que em meio aquoso, o suporte pode sofrer solvatação. A atividade catalítica declarada pelo fornecedor é de 75 IUN.g⁻¹; densidade 0,42 g.mL⁻¹; diâmetro de partícula: 0,3-1,0 mm; conteúdo de água: 5%.

3.3. Síntese de acetato de eugenila em reator de leito fixo (PBR)

O acetato de eugenila foi obtido pela reação de acetilação utilizando o anidrido acético como doador do grupo acila e o eugenol em sistema livre de solvente. A síntese enzimática de acetato de eugenila foi realizada em reator de leito fixo (PBR), com uma capacidade nominal de 10 mL. Os ensaios foram realizados utilizando a enzima Lipozyme TL IM. O sistema era composto de 9 g de enzima imobilizada adicionado à coluna do reator, em seguida, foi submetida à estabilização da temperatura com um banho termostático de circulação (MICROQUIMICA). A solução de alimentação contendo os substratos foi bombeada com uma bomba peristáltica (ATTA INSTRUMENT) com fluxo ascendente com o valor de vazão definido previamente para cada ensaio. A Figura 8 representa o esquema do aparato experimental utilizado na síntese do acetato de eugenila.

Figura 8 - Esquema do aparato experimental utilizado na síntese do acetato de eugenila: (1) Recipiente contendo a mistura do substrato; (2) bomba peristáltica; (3) reator de leito fixo empacotado (4) entrada do substrato (5) saída de produto (6) coleta de amostra; (7 e 8) banho de aquecimento.



Fonte: AUTOR

3.3.1. Estudo da vazão de alimentação na conversão do éster acetato de eugenila por reação de acetilação em reator de leito fixo empacotado

Os ensaios de estudo da vazão de alimentação para a conversão do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com a

lipase Lipozyme TL IM foram realizados variando as vazões em 0,1, 0,8 e 1,35 mL.min⁻¹, temperatura de 55 °C e razão molar eugenol:anidrido acético de 1:3, parâmetros escolhidos baseados em trabalhos anteriores. O cálculo da porosidade do leito foi realizado de acordo com a Equação 1.

$$\varepsilon = \frac{V_{void}}{V} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: V_{void} é o volume ocupado pela enzima no leito empacotado (mL) e V é o volume total do leito do reator. A porosidade foi mensurada pela injeção de água destilada no leito do reator. O tempo de residência foi calculado de acordo com a Equação 2 (XU et al., 2002). As amostras foram retiradas a cada tempo de residência determinado, segundo Dalla Rosa et al. (2009) como está demonstrado na Equação 2. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

$$\tau = \frac{\varepsilon \cdot V_t}{q} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: τ =tempo de residência; V_t =Volume da coluna do leito; ε = porosidade da enzima e q = vazão de alimentação.

3.3.2. Otimização da reação de acetilação do eugenol em reator de leito fixo empacotado com Lipozyme TL IM

Com os resultados obtidos após determinar a vazão de alimentação adequada para a conversão do éster, foram avaliados os efeitos da temperatura e da razão molar com o auxílio de um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2² cujos níveis codificados e os valores reais das variáveis estão demonstrados na Tabela 4. A análise estatística ANOVA foi realizada com o auxílio do software STATISTICA 13. O cálculo para o desvio relativo dos valores da conversão experimental e prevista do DCCR foi realizado segundo a Equação 3.

$$\% \text{ Desvio relativo} = \left(\frac{\% \text{ Conversão}_{Exp} - \% \text{ Conversão}_{pred}}{\% \text{ Conversão}_{Exp.}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Tabela 4 - Níveis codificados e valores reais das variáveis utilizadas no delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2².

Nível	Razão Molar (eugenol:anidrido acético)	Temperatura (°C)
-1, 41	1:0,18	47, 95
-1	1:1	50
0	1:3	55
1	1:5	60
1,41	1:5,82	62, 1

3.4. Caracterização do acetato de eugenila

3.4.1. Purificação do éster acetato de eugenila

O produto da reação (acetato de eugenila) foi purificado mediante a lavagem com solução de NaOH e acetato de etila na fração de 1:4 (50: 200 mL). Após a lavagem, o produto (acetato de eugenila) foi separado na fase orgânica contendo acetato de etila e fase aquosa dada por demais constituintes da reação, como ácido acético. A fase orgânica foi submetida à uma nova lavagem e posterior rotaevaporação para remoção do solvente.

3.4.2. Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN-¹H

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN-¹H) da amostra de acetato de eugenila purificada, foi realizada em equipamento modelo Varian Mercury Plus AS-400 MHz, em 400 MHz, utilizando TMS como padrão interno e clorofórmio-*d*₁(CDCl₃) como solvente.

3.4.3. Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram submetidas à análise de FTIR e os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo Cary 600 Series FTIR da Agilent. A quantidade de 10% em massa da amostra foi misturada e moída com 100% em massa de brometo de potássio e em seguida comprimida numa pastilha sob uma pressão de 11 tons, durante cerca de um minuto. Os espectros foram registrados na faixa de número de onda 400-4000 cm⁻¹.

3.4.4. Análise de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa CG-MS

A determinação da composição química do óleo de cravo fornecido pela empresa FERQUIMA e da amostra de acetato de eugenila obtido pela reação de acetilação catalisada pela enzima Lipozyme TL IM foi realizada no Laboratório de Central de Análises-UFSC, segundo a método modificado de Guan et al. (2007). Foi adicionada 1 μL de solução (1% v/v em clofórmio) em um cromatografo de gás equipado com espectrômetro de massas (GC/MS, model 7890 A, detector de mass 5975C, Agilent Technologies, USA) com a uma coluna HP-5MS (30 m x 0.25 mm diâmetro interno x 0.25 μm filme, Agilent Technologies, USA).

O gás carreador foi o hélio com vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, split 1:100, temperatura do injetor de 240 $^{\circ}\text{C}$ e do detector de 250 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura da coluna foi programada na faixa de 70 a 180 $^{\circ}\text{C}$ com taxa de aquecimento de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (GUAN et al., 2007). Os principais compostos foram identificados pela comparação entre os espectros de massas e os tempos de retenção segundo a biblioteca de espectro de massa NIST 11.

3.4.5. Quantificação do acetato de eugenila

A quantificação dos ésteres produzidos foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (Shimadzu GC-2010), segundo Chairadia et al. (2012) com modificações. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida ZB-WAX (30 m x 250 μm x 0.25 μm), detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40 $^{\circ}\text{C}$ (8 min), 40-150 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), 150-220 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), 230 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$, detector 275 $^{\circ}\text{C}$, razão de split 1:100, gás de arraste N_2 , volume injetado 1 μL de amostra diluída em diclorometano (2:10).

A determinação da conversão das reações foi realizada acompanhando a redução na área do sinal do agente limitante (eugenol) bem como o aparecimento do pico de produto. A área do pico da mistura reacional sem o catalisador (branco) e a área do pico da reação foram relacionadas pela Equação 4.

$$AE\% = \frac{100 - (100 * A_{\text{reação}})}{A_{\text{branco}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde: AE (%) é a quantidade convertida em acetato de eugenila, $A_{\text{reação}}$ é a área do pico da reação e A_{branco} é a área do pico do branco. Como padrão químico para identificação do pico correspondente ao éster produzido foi empregado acetato de eugenila (99 % de pureza) (Sigma-Aldrich).

3.5. Preparo da Nanoemulsão contendo acetato de eugenila

As formulações das nanoemulsões foram constituídas por Crodamol GTCC um lipídio líquido ultrahidrofóbico utilizado para auxiliar na estabilidade das emulsões, Pluronic F-127 como surfactante HLB 22 usado para evitar a coalescência das formulações e posterior desestabilização e Acetato de eugenila purificado obtido pela síntese enzimática com a enzima LIPOZYME TL IM.

As formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila foram preparadas utilizando o percentual de massa por volume (m/v) de 0,33 a 1% de Crodamol GTCC (lipídeo líquido) e 0,7 a 2,5% de acetato de eugenila na fase orgânica e 0,33 a 1% de Pluronic F-127 na fase aquosa completada com 6 mL de água destilada. As fases orgânica e aquosa foram unidas e submetidas a agitação de 600 rpm por 15 min à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas utilizando dispersor ultrassônico durante 1 min (sonicação 30 s e pausa 10 s) a amplitude de 50%. Ao final, as amostras foram resfriadas em banho de gelo para minimizar o calor da etapa de sonicação. Todas as nanoemulsões preparadas foram mantidas a temperatura de 10 ± 2 °C e a estabilidade das amostras foi avaliada do dia 0 a 60 dias após a preparação. A Tabela 5 apresenta as formulações definidas para a nanoemulsão contendo acetato de eugenila.

Tabela 5 - Formulação das nanoemulsões contendo acetato de eugenila.

Nanoemulsão	Pluronic F-127 (%)	Crodamol GTCC (%)	Acetato de eugenila (%)
NAE1	1	0,33	0,7
NAE2	0,33	1	0,7
NAE3	1	0,33	1,3
NAE4	0,33	1	1,3
NAE5	1	0,33	2,5
NAE6	0,33	1	2,5

*Os valores percentuais estão relacionados ao volume de água de 6 mL.

3.6. Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila

A preparação das nanopartículas lipídicas sólidas foi realizada com o mesmo lipídio líquido Crodamol GTCC e surfactante Pluronic F-127. Com a adição do ácido graxo escolhido para a matriz lipídica das partículas, ácido esteárico. O acetato de eugenila foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pela técnica de homogeneização a quente em ultrassom. O ácido graxo utilizado para esta etapa do trabalho foi o ácido esteárico, com ponto de fusão 69,6 °C, responsável pela formação do revestimento lipídico da nanopartícula. O sistema foi estabilizado pelo uso do surfactante não iônico Pluronic F-127 (Poloxamer 407). As quantidades dos reagentes utilizados para os ensaios estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição das formulações de NLS carregadas com acetato de eugenila.

Reagente	SLN1	SLN2	SLN3
Ácido esteárico (lipídio sólido)	0,4 %	0,4 %	0,4 %
Crodamol GTCC	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Acetato de eugenila	0,1 %	0,25 %	0,5 %
Pluronic F-127	0,3 %	0,3 %	0,3 %
Água	100 mL	100 mL	100 mL

*Os valores percentuais estão relacionados ao volume de água de 100 mL.

Inicialmente, foram realizados testes para determinação das quantidades ideais de ácido esteárico, acetato de eugenila e surfactante. Os três reagentes foram pesados em frasco de vidro, com volume inicial de 10 mL de água destilada. A fase orgânica era composta pelo acetato de eugenila, ácido esteárico e Crodamol GTCC (triacilglicerol dos ácidos caprílico e caprótico) e a fase aquosa pelo surfactante Pluronic F-127.

Os frascos foram dispostos em banho maria para o aquecimento a (72 °C) submetidos à agitação para total fusão do ácido graxo e formação de uma emulsão grosseira. Em seguida, a emulsão foi submetida à sonicação (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W) a uma amplitude de 50% pelo tempo necessário (~2 min) a fim de reduzir o tamanho das partículas à escala nanométrica. Após esse período foram adicionados 90 mL de água destilada (8-10 °C) para que ocorresse a solidificação do ácido graxo e formação das nanopartículas.

3.6.1. Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PdI)

A distribuição do diâmetro das partículas e o índice de Polidispersão (PdI) foram determinados no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC pela técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons ou Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633 nm), da Malvern Instruments. As leituras foram feitas a 20 °C a partir de uma alíquota das nanopartículas (NE e NLS) suspensas em água.

3.6.2. Potencial Zeta

O potencial Zeta fornece potencial elétrico da superfície das partículas e informações sobre a estabilidade das formulações de nanopartículas (NE e NLS) nanoemulsão. Foi determinado pela técnica de Anemometria Laser Doppler associada à microeletroforese usando o equipamento Zetasizer Nano ZS 3600, Malvern Instruments. A análise foi realizada com diluição anterior em água destilada (1:10) a 25 °C. O pH das amostras foi analisado após cada determinação do potencial zeta.

3.6.3. Morfologia das partículas

A caracterização morfológica das nanopartículas lipídicas sólidas foi feita pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em um equipamento da marca JEOL, modelo JEM-1011, com voltagem máxima de aceleração de 100 kV e faixa de magnificação de 50 a 600.000 vezes, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.6.4. Eficiência de encapsulação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila

A eficiência de encapsulação do acetato de eugenila em nanopartículas lipídicas sólidas foi determinada por centrifugação utilizando filtros com membranas de massa molecular de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). A análise foi realizada adicionando 500 µL da dispersão de NLS no filtro Amicon® Ultra em o filtro à centrifugação a 10000 rpm por 20 min. As NLS carregadas com acetato de eugenila ficaram retidas no filtro e a água e o éster livre foi permeado pela membrana. Uma alíquota do permeado foi diluída em etanol e o éster livre foi quantificado por espectroscopia de UV/Vis a 272 nm utilizando espectrofotômetro Hitachi (U-1900). A concentração de éster livre foi calculada utilizando uma curva de calibração indicada pela Equação 5 e a eficiência de encapsulação (EE) do acetato de eugenila foi determinada segundo a Equação 6.

$$Abs = (0,0194 \times C_{ea}) + 0,033 \quad (\text{Eq.5})$$

Onde: *Abs* é a absorvância e *C_{ea}* é a concentração de acetato de eugenila livre (µg.mL⁻¹). Com o coeficiente de correlação de R² = 0,99.

$$EE \% = \frac{(C_{inicial} - C_{livre})}{C_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde: *C_{livre}* é a quantidade (µg. mL⁻¹) de acetato de eugenila livre e disperso na água e não encapsulado determinado pela Equação 5 e *C_{inicial}* é a concentração (µg.mL⁻¹) de acetato de eugenila adicionado inicialmente na emulsão.

3.7. Estudos de liberação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

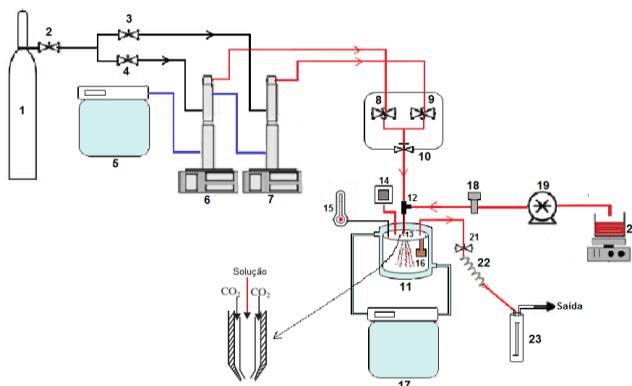
Os ensaios de liberação foram realizados utilizando uma membrana de diálise (MWCO 10 kDa, Spectra Pore, EUA). A membrana foi embebida em água destilada durante 24 h e preenchida com 1 mL da formulação (NLS carregada com acetato de eugenila) seguido por incubação em 30 mL de tampão de fosfato 10 mM (pH 7,4) com etanol a 10% (v/v), água a pH 5,6 a temperatura de 37 °C (RODENAK-KLADNIEW et al., 2017). Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 1 h e a concentração de acetato de eugenila foi medida a 272 nm utilizando um espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu, Japão). Em seguida, o frasco foi reabastecido com 2 mL para manter volume do meio de liberação constante.

3.8. Encapsulação do acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS)

Todos os experimentos de precipitação dos biopolímeros (PHBV) e incorporação do princípio ativo (acetato de eugenila) foram realizados em um aparato experimental baseado na técnica que emprega fluidos pressurizados como anti-solvente (SEDS), conforme mostra a Figura 9 seguindo a método desenvolvida por Franceschi et al. (2009), Priamo et al. (2010) e Boschetto et al. (2014).

Para os experimentos de encapsulação foram utilizados os seguintes reagentes: Dióxido de carbono (CO₂) (White Martins S.A., pureza de 99,8%); Diclorometano (DCM) (FMAia, pureza de 99,5%); Etanol anidro (Merck, pureza 99,9%); Copolímero, Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (Mw) de 196.000 e índice de polidispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A. O copolímero foi submetido a uma pré-purificação, pela sua dissolução em clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) e posterior precipitação em n-heptano P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) para retirada de impurezas.

Figura 9- Esquema do aparato experimental da técnica de coprecipitação e encapsulação empregando fluido supercrítico como anti-solvente.



Fonte: Boschetto et al. (2014)

Conforme apresentado na Figura 11, o aparato experimental para ensaios de encapsulação do acetato de eugenila é constituído por:

- (1) reservatório de dióxido de carbono (CO₂);
- (2) válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check- Valve HIP, Modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar);
- (3) e (4) válvulas de esfera (Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) banho ultratermostático de recirculação (Nova Ética, Modelo 521/2D);
- (6) e (7) bombas de alta pressão (ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL min⁻¹);
- (8) e (9) Válvulas de esfera (Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (10) válvula métrica tipo agulha (HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);
- (11) câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm);
- (12) entrada central coaxial conexão tipo T (Swagelok);
- (13) tubo capilar de sílica fundida;

(14) entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Este está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto 0 a 250 bar, SMAR, Modelo LD 301);

(15) entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado a um indicador de temperatura (Universal, NOVUS, Modelo N 1500);

(16) suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno;

(17) banho ultra termostático de recirculação (Nova Ética, Modelo 512/2D);

(18) válvula de regulação de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (Back Pressure Regulator, GO Regulator, Série BP-66, Modelo 1A11QE151);

(19) bomba de HPLC Digital Série III (Acuflo);

(20) recipiente para solução orgânica na qual o princípio ativo a ser precipitado é dissolvido no solvente orgânico;

(21) válvula métrica tipo agulha (HOKE, Modelo 1315G2Y);

(22) fita de aquecimento (FISATON, Modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21);

(23) Trap de segurança, recheado com algodão.

3.8.1. Preparação das nanopartículas carregadas com acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

As condições experimentais avaliadas foram: pressão de operação de 80 a 100 bar, e concentração de acetato de eugenila entre 5 a 20 mg.mL⁻¹. Todas as condições foram estabelecidas baseadas em dados obtidos por trabalhos realizados anteriormente pelo grupo.

3.8.2. Determinação da eficiência de encapsulação do acetato de eugenila pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

Primeiramente foi realizada a varredura do composto obtendo-se o comprimento de onda onde ocorre a maior absorção no UV-VIS. Após estipulado o valor de comprimento de onda foi construída a curva de calibração utilizando diferentes concentrações do composto em diclorometano. Após a obtenção da curva, foram realizados os cálculos de percentual real (PRE) e eficiência de encapsulação (EE). Para as análises em espectrofotômetro, de massa de amostra coprecipitada foi pesada em balança analítica (AY220 Shimadzu) e adicionados 10 mL de diclorometano. A solução resultante foi analisada em um Espectrofotômetro de UV-VIS. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Supercrítica (LATESC).

Com os valores da massa de cada composto em cada amostra analisada, determinou-se o percentual real de encapsulação (PRE) e a eficiência de encapsulação (EE) para cada condição experimental, através das Equações 7 a seguir (KALOGIANNIS et al., 2006):

$$EE\% = \frac{\% \text{ amostra encapsulada}}{\% \text{ teórico de encapsulação}} \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

Onde: o percentual teórico de encapsulação é a razão entre a massa do composto ativo encapsulado e a soma das massas do acetato de eugenila e PHBV utilizadas nos experimentos do coprecipitação. Este percentual corresponde ao percentual máximo de encapsulação do acetato de eugenila em PHBV.

3.8.3. Caracterização das nanopartículas de PHBV carregadas com acetato de eugenila

A morfologia das partículas do acetato de eugenila encapsulados em PHBV foi realizada por observação visual das micrografias de MEV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com o auxílio de Microscópio Eletrônico marca JEOL, modelo JSM-6390LV (MEV). A partir das micrografias de MEV, procede-se a determinação do tamanho das partículas contendo acetato de eugenila

utilizando o software Size Meter versão 1.1 (Carlson e Bolzan, 2001). O método consiste na avaliação das medidas do comprimento e da espessura (maior medida característica) para cada condição experimental testada.

3.9. Atividade Larvicida

3.9.1. Obtenção dos ovos

Ovos de *Ae. aegypti* foram produzidos em insetário e mantidos secos, aderidos em tiras de papel até o uso, utilizando larvas Rockefeller do vetor (sensível ao temefós) do vetor.

3.9.2. Eclosão das larvas

Como preparação para os ensaios, tiras de papel contendo os ovos foram postas em um recipiente retangular com água e aproximadamente 500 mg de ração para peixe Tetra Color Tropical Granules. O recipiente foi mantido em insetário, com temperatura ($26\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($60\pm 10\%$) controladas, de modo a permitir a eclosão e o desenvolvimento das larvas, por volta de quatro dias, quando larvas de terceiro estágio (L_3) foram coletadas. A seleção das larvas ocorreu baseada no tamanho e características morfológicas. As larvas foram cedidas pela Prof^a Roseli La Corte dos Santos, provenientes do insetário do Departamento de Morfologia, Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Sergipe.

3.9.3. Preparação das soluções estoque

As avaliações larvicidas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita pela Organização Mundial de Saúde e adaptada por Santos *et al.* 2011 com modificações (WHO, 1963; Santos *et al.*, 2011). Uma solução padrão a 20.000 ppm foi preparada pesando-se 20 mg de acetato de eugenila 98% contendo β -cariofileno (1,2%), e α -humuleno (0,8%) em eppendorf e incorporando-se Tween-80 (5 gotas), seguido pela adição de DMSO (0,3 mL) e água desclorada (0,6 mL) para preparar uma solução estoque. Partindo desta solução estoque, foram realizadas séries de diluições em 20 mL de água desclorada de modo a obter soluções finais com concentração variando de 0,0005 a 1 mg.mL⁻¹. Copos descartáveis foram utilizados para evitar contaminação cruzada e, conseqüentemente, reduzir a probabilidade de erro nos testes.

3.9.4. Determinação da atividade larvicida da Nanoemulsão e das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila

A formulações de Nanoemulsão e NLS foram diretamente transferidas para copos descartáveis de modo a preparar soluções com concentrações equivalentes de acetato de eugenila variando de 0,0005 a 1 mg.mL⁻¹.

3.9.5. Exposição das larvas

Vinte larvas foram transferidas para cada copo e expostas às soluções por 24 h, registrando-se o total de mortalidade. Foram feitos testes paralelos, o controle negativo utilizando Tween-80, DMSO e água, na maior concentração aplicada em cada teste. As faixas de concentração dos ensaios de toxicidade foram pré-determinadas por uma curva concentração-resposta de 20 larvas no terceiro estágio.

3.9.6. Análise estatística

A análise do Probit foi conduzida com os resultados da mortalidade coletados após 24 horas de exposição das larvas as diferentes concentrações de teste, tanto para as partículas como para o acetato de eugenila livre. A fim de estabelecer a concentração letal para 50% de mortalidade (CL₅₀) ao intervalo de confiança de 95%. Em todos os ensaios, em que ocorreram morte no controle, os dados foram corrigidos segundo a equação de Abbott's (Equação 9). Foram realizadas análise de variância de ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Um nível de significância de 5% foi estabelecido para a análise (FINNEY, 1971).

$$\%Mortalidade = \left(\frac{C_a - T_a}{C_a} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde: % Mortalidade = taxa de mortalidade de experimento; onde Ca é o número de larvas vivas no controle e Ta é o número de larvas no teste.

Quando a taxa de mortalidade no experimento do controle negativo foi superior a 20%, o teste foi descartado e repetido. A comparação de CL₅₀ dos compostos foi realizada através do intervalo de confiança ao nível de 95% de significância (FINNEY, 1971).

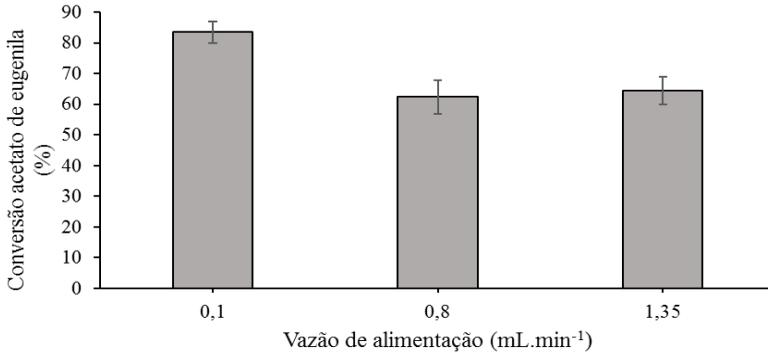
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item estão apresentados os resultados da produção do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado. E a produção das nanopartículas carregadas com o mesmo éster em três diferentes métodos Nanoemulsificação (NE) e Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS). Seguido dos resultados de atividade larvicida do éster livre e encapsulado, visando a comprovação da aplicação das mesmas como potenciais agentes larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

4.1. Efeito da vazão de alimentação na acetilação enzimática do eugenol em reator de leito fixo empacotado (PBR)

O tempo de residência é um dos parâmetros mais importantes para se obter maiores valores de conversão do produto de interesse em reatores em leito fixo empacotado (POPPE et al., 2015; MATTE et al., 2016). Assim, para a síntese do acetato de eugenila através da reação de acetilação do eugenol empregando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador em reator de leito fixo empacotado em modo contínuo, foi realizado um estudo preliminar sobre a vazão de alimentação adequada para a conversão do éster no reator de leito fixo empacotado. Com os valores de vazão de alimentação de 0,1, 0,8 e 1,35 mL.min⁻¹ e a porosidade de 0,55 foram determinados os tempos de residência de 55, 7 e 4 min, respectivamente, com a temperatura de 55 °C e razão molar eugenol: anidrido acético de 1:3. Os valores das conversões variaram entre 62,4 a 83,5%, sendo a maior conversão do éster obtida utilizando a vazão de alimentação de 0,1 mL.min⁻¹, como demonstrado na Figura 10.

Figura 10- Efeito da vazão de alimentação (0,1, 0,8 e 1,35 mL.min⁻¹) na produção de acetato de eugenila em PBR com valores fixos de temperatura (55 °C) e razão molar de eugenol:anidrido acético (1:3).



Os reatores operando em modo contínuo podem apresentar diferentes comportamentos dependendo da solução no interior do leito. Nesse estudo, a vazão de alimentação maior que 1 mL.min⁻¹ ocasionou uma redução da conversão do éster, que pode ter sido provocada por pouca disposição do substrato para a reação. Comportamento verificado nesse trabalho, com a queda de aproximadamente 20% na conversão no ensaio com vazão de 1,35 mL.min⁻¹. Os menores valores de vazão de alimentação implicaram em maiores tempos de residência, o que pode ter provocado o aumento da conversão do éster devido ao maior tempo de contato entre o substrato e a enzima, o que aumenta a transferência de massa (DAHLAN, KAMARUDDIN; NAJAFPOUR, 2005). Esse comportamento é similar ao verificado por Dahlan, Kamaruddin e Najafpour (2005) e Dalla Rosa et al. (2009) na síntese de ésteres através da reação de esterificação catalisada por lipase imobilizada em reatores de leito fixo empacotado, no qual o aumento do tempo de residência ocasionou também o aumento da conversão dos ésteres.

Há poucos estudos com a produção de ésteres de óleos essenciais utilizando a enzima Lipozyme TL IM em reatores de leito fixo empacotado. No entanto, Yang et al. (2014) alcançaram 56,18% na reação de interesterificação para produzir triglicerídeos de cadeia média originados de óleo de soja utilizando as enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM como catalisadores. Sutili et al. (2013) na reação de acetilação do cetal da fructose e ácido palmítico alcançaram o valor de

91,1% utilizando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador e baixos valores de vazão de alimentação em reatores de leito fixo empacotado.

Desta forma, com o conhecimento dos mecanismos da reação em estudo, sabe-se que a autocatálise pode ocorrer, então foram realizados testes nas condições estudadas sem o biocatalisador e observou-se conversões não superiores a 5% em todos os testes (resultados não mostrados). Assim, o valor de conversão de 5% foi descontado para a realização dos cálculos de conversão.

4.2. Otimização da reação de acetilação do eugenol em reator de leito fixo empacotado com enzima Lipozyme TL IM

A otimização da produção de acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado (PBR) foi feita utilizando o valor de alimentação de 0,1 mL.min⁻¹. Assim, um planejamento experimental composto central rotacional CCDR 2² foi realizado a fim de avaliar os efeitos da razão molar óleo de cravo (eugenol): anidrido acético e temperatura na síntese do éster em PBR. A Tabela 7 apresenta a matriz e os resultados dos ensaios do delineamento experimental em termos de conversão de acetato de eugenila real e prevista.

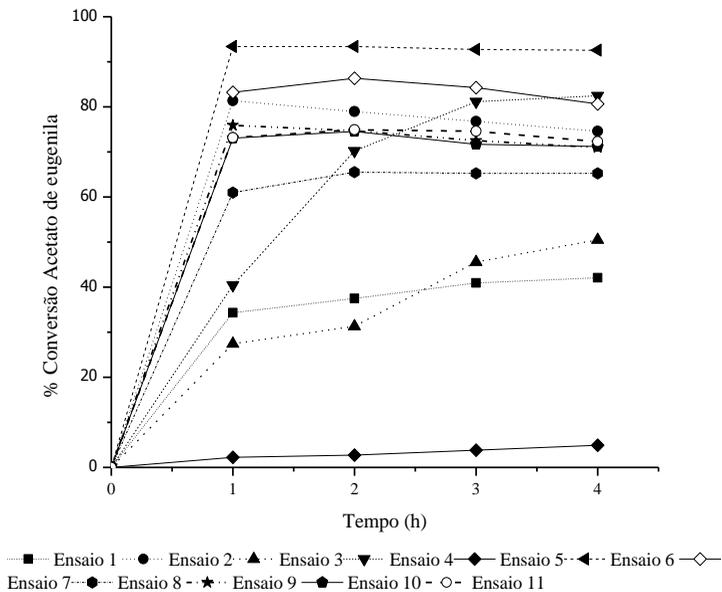
Tabela 7 - Matriz do delineamento composto central rotacional DCCR 2² com os valores reais e codificados e resultados em termos de conversão em acetato de eugenila reais e preditos.

Ensaio	RM	T (°C)	% Conv.		% DR
			Experimental	Prevista	
1	-1 (1:1)	-1 (50)	37,6	34,8	7,3
2	1 (1:5)	-1 (50)	79,0	86,7	-9,7
3	-1 (1:1)	1 (60)	29,4	34,8	-18,7
4	1 (1:5)	1 (60)	77,9	86,7	-11,3
5	-1,41 (1:0,18)	0 (55)	2,9	11,4	-12,2
6	1,41 (1:5,82)	0 (55)	93,1	84,6	9,1
7	0 (1:3)	0 (55)	84,6	73,7	12,8
8	0 (1:3)	-1,41(47,95)	65,3	73,7	-12,8
9	0 (1:3)	1,41 (62,1)	73,6	73,7	-0,10
10	0 (1:3)	0 (55)	73,2	73,7	-0,69
11	0 (1:3)	0 (55)	74,2	73,7	0,68

* RM= Razão Molar (eugenol: anidrido acético); * DR= Desvio relativo

A máxima conversão em acetato de eugenila foi alcançada no ensaio 6 com a média de 93,1% nas primeiras 3 h de reação com 0,1 mL.min⁻¹ de vazão de alimentação, 1:5,82 de razão molar de eugenol: anidrido acético e 55 °C. Os menores valores de conversão foram encontrados no ensaio 3 (1:1 eugenol:anidrido acético, 29,37%) e no ensaio 5 (1:0,18 eugenol:anidrido acético, 10,22%). Todas as reações apresentaram estabilidade após 2 h. A Figura 11 apresenta o efeito da temperatura e da razão molar na produção de acetato de eugenila verificado nos ensaios.

Figura 11- Avaliação do efeito da temperatura e da razão molar na produção de acetato de eugenila em leito fixo empacotado com Lipozyme TL IM.



Em geral, quando a mistura reacional possui baixas concentrações de substrato há menor disposição do doador do grupamento acila para a reação, o que implica na queda na produção do éster até mesmo em elevadas temperaturas (RAHMAN et al., 2011; VADGAMA, ODANETH; LALI, 2015), comportamento visto nesse estudo no ensaio 5. O aumento da temperatura da reação de 50 para 60 °C possui efeito negativo na síntese do éster acetato de eugenila causando a queda na sua conversão, mesmo em ensaios com maior razão molar e

maior disponibilidade de substrato. Essa redução pode ter sido causada devido a desnaturação da enzima (VADGAMA, ODANETH; LALI, 2015). Além disso, a enzima Lipozyme TL IM é estável na faixa de temperatura entre 50-70 °C. Porém, quando utilizada em reatores de leito fixo empacotado a enzima possui maior estabilidade em temperaturas moderadas, entre 50-60 °C (YANG et al., 2014; SUTILI et al., 2013), o que confirma os altos valores de conversão obtidos a temperatura próxima de 55 °C. Damnjanović et al. (2012) também observaram o mesmo comportamento na síntese de geranil butirato utilizando uma lipase imobilizada não commercial AY (Tipo VII, L 1754) e temperatura de 35 °C, obtendo o valor de 78,9% de conversão do éster em 10 h de reação.

Dahlan, Kamaruddin e Najafpour (2005) observaram comportamento similar no estudo do efeito da temperatura na biossíntese de butirato de citronela utilizando lipase imobilizada de *Candida rugosa* em reator de leito fixo empacotado, onde foi observado que temperaturas acima de 50 °C conduziram à queda na conversão do éster. Desta forma, foi possível obter elevados valores de conversão do éster usando temperaturas de reação mais moderadas, condição que favorece a aplicação de reatores de leito fixo em comparação com processos em batelada. Sucessivamente, os dados obtidos a partir do planejamento experimental composto central rotacional para conversão em função da temperatura e da razão molar de eugenol: anidrido acético foram analisados por análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a validade do modelo codificado (Tabela 8).

Tabela 8- Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental Composto Central Rotacional 2².

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F _{calculado}
Regressão	6522,42	5	1304,48	27,03
Resíduo	241,33	5	48,27	
Total	6763,75	10		

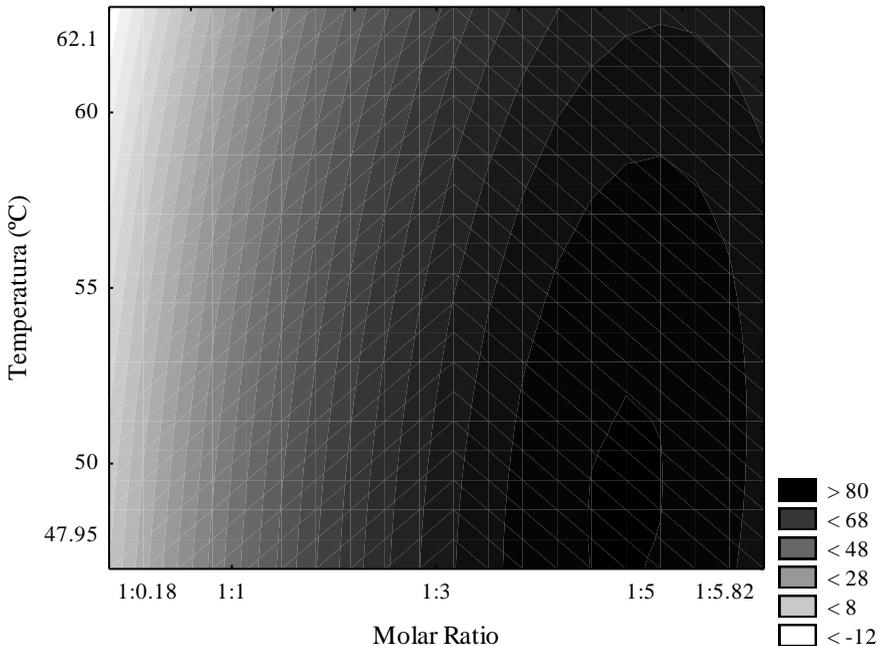
*Coeficiente de regressão: R²=0,96. *F 0,95; 5;5 =5,05, nível de significância p= 95%

Com base na ANOVA, pode-se concluir que o modelo gerado através dos resultados da Tabela 8 é capaz que o modelo é preditivo pois o valor calculado F (F_{calc}) obtido foi 5 vezes maior que o valor tabelado F (F_{tabl}) e um coeficiente de determinação suficientemente satisfatório (0,96). Com esses resultados foi possível gerar o modelo demonstrado

pela Equação 5. Portanto, o modelo codificado expresso pela Equação 9 foi usado para gerar a curva de contorno da Figura 12 e prever os efeitos de condições experimentais na produção de acetato de eugenila (coluna 5 da Tabela 8). Os resultados do planejamento experimental da Tabela 8 sugerem que é conveniente usar a razão molar de eugenol para anidrido acético de 1: 5,82 e temperatura de 55 ° C para obter altas conversões (93,1%) de acetato de eugenila. A Equação 9 mostra o modelo gerado a partir dos resultados do planejamento composto central rotacional para a produção do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com a enzima Lipozyme TL IM.

$$\%AE = 73,71 + 25,94 \times RM - 12,91 \times RM^2 - 4,57 \times T - 1,19 \times T^2 + 1,78 RM \times T \quad (\text{Eq. 9})$$

Figura 12- Curva de contorno da conversão de acetato de eugenila em função da temperatura e razão molar eugenol:anidrido acético.

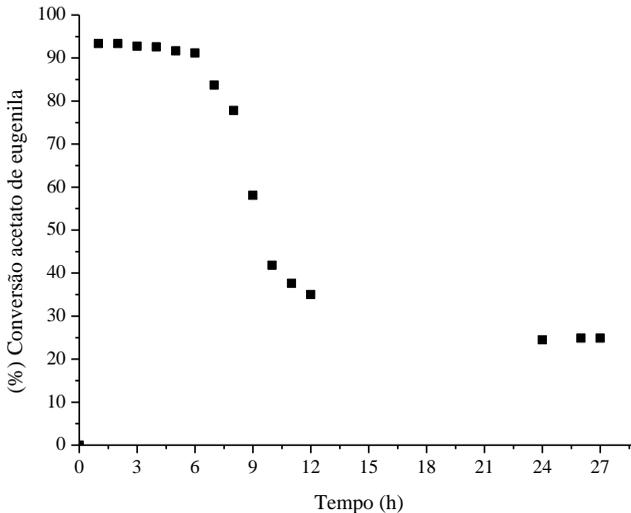


Pela da análise da curva de contorno é possível verificar que os reatores de leito fixo empacotado são uma alternativa para a produção do éster acetato de eugenila. Com a avaliação da vazão de alimentação, razão molar e temperatura, foi possível obter a condição ótima para síntese do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado com a enzima Lipozyme TL IM (SUTILI et al., 2013; LERIN et al., 2015; CHANG et al., 2007).

4.3. Estabilidade operacional da Lipozyme TL IM na produção de acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado (PBR)

A estabilidade operacional da enzima imobilizada em reatores de leito fixo empacotado é um parâmetro importante a ser avaliado para a produção industrial do éster, pois ele influencia diretamente no custo (POPPE et al., 2015). Assim, a avaliação da estabilidade enzimática (Lipozyme TL IM) na reação de acetilação do eugenol foi realizada utilizando as condições ótimas de conversão do éster com vazão de alimentação $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ razão molar (eugenol: anidrido acético) de 1:5,82 por 28 horas de reação. É possível observar na Figura 13, que a conversão do acetato de eugenila diminuiu consideravelmente depois de 9 horas, atingindo menos de 30% após 24 horas de reação.

Figura 13-Avaliação da estabilidade operacional da Lipozyme TL IM na reação de acetilação do eugenol utilizando as condições ótimas de conversão, com vazão de alimentação de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão molar (eugenol: anidrido acético) de 1:5,82 por 28 horas de reação.



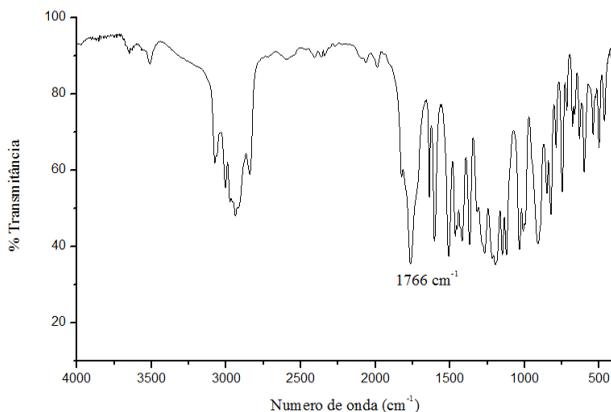
Alguns autores afirmam que a queda na conversão do éster pode estar relacionada com a inibição da atividade da enzima pelo excesso ácido acético e anidrido acético (ROMERO et al., 2007) ou pelo excesso de acetato de eugenila ou deformação do suporte da enzima imobilizada dentro do reator (MATTE et al., 2016). Outros autores afirmam que a facilidade de obstrução do leito, as preferências do fluxo através do leito e a baixa transferência de calor e massa também podem influenciar a perda de conversão de éster (DAHLAN, KAMARUDDIN; NAJAFPOUR, 2005).

4.4. Caracterização do acetato de eugenila

4.4.1. Análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os valores de comprimento de onda obtidos na análise do acetato de eugenila estão representados na Figura 14. É possível observar a presença característica da banda da carbonila do éster ligada com o anel aromático em 1766 cm^{-1} , confirmando a adição do grupamento acila na molécula de eugenol (LOPES; FASCIO, 2004). O espectro obtido nesse estudo é similar ao encontrado por Affonso et al. (2014), na quantificação e caracterização dos principais componentes do extrato etanólico de óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*).

Figura 134- Espectro de infravermelho para a amostra de acetato de eugenila obtido na reação de acetilação catalisada por Lipozyme TL IM.

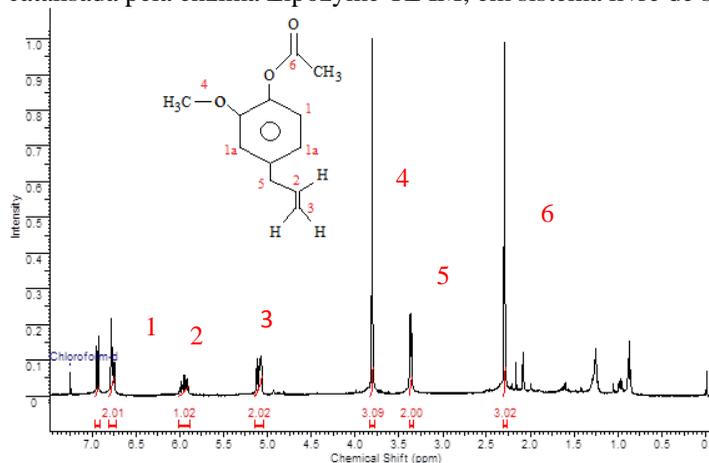


4.4.2. Análise de Ressonância Magnética Nuclear RMN^{-1}H

A Figura 15 apresenta os espectros com seus respectivos deslocamentos dos átomos da molécula de acetato de eugenila. Pode-se observar que os acoplamentos: (1) referem-se aos 3 hidrogênios dos carbonos do anel aromático (os hidrogênios (1a) são equivalentes, portanto, os seus picos se sobrepõem); (2) e (3) refere-se aos acoplamentos dos hidrogênios dos carbonos da dupla ligação; hidrogênio singlete (4) refere-se a metila ligada ao oxigênio; (5) refere-se aos acoplamentos dos hidrogênios do carbono que une o anel aromático com a dupla ligação; singlete (6) refere-se a metila ligada ao carbono do éster,

confirmando, a estrutura molecular do éster e sua obtenção através da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético utilizando a enzima com Lipozyme TL IM como catalisador em sistema livre de solvente.

Figura 15- Espectro de RMN ^1H da amostra obtida através da reação de acetilação do óleo de cravo-da-índia (eugenol) e anidrido acético, catalisada pela enzima Lipozyme TL IM, em sistema livre de solvente.



4.5. Ensaio larvicida

O extrato purificado contendo 98% acetato de eugenila, 1,2% β -cariofileno e 0,8% α -humuleno obtido pela reação de acetilação foi testado para avaliação da atividade larvicida. Os dois primeiros terpenos já foram citados como potenciais larvicidas, sendo o β -cariofileno (1,202 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e α -humuleno (0,018 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) com valores de CL_{50} superiores ao acetato de eugenila (0,107 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (BARBOSA et al., 2012; SILVA et al., 2008; TRINDADE et al., 2015).

Nesse estudo foi obtido o valor de LC_{50} de 0,102 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0,095 a 0,110 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), com intervalo de confiança de 95%, quantidade de acetato de eugenila suficiente para causar a morte de 50% das larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Pandey et al. (2013) e Barbosa et al. (2012) obtiveram valores de LC_{50} de 0,050 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,113 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, em ensaios de toxicidade do acetato de eugenila frente às larvas da mesma espécie de mosquito.

Os terpenos e fenilpropanóides derivados de óleos essenciais têm sido estudados devido ao potencial efeito larvicida, sendo testada a

atividade larvicida de diferentes tipos de óleos essenciais (COSTA et al., 2005), por exemplo *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perry, *Lippia sidoides* Cham e *Hyptis martiusii* Benth contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* com os valores de CL_{50} de 0,0214, 0,0195 e 0,0185 mg.mL⁻¹, respectivamente. Govindarajan et al. (2016) avaliaram a toxicidade do óleo essencial de *Plectranthus barbatus* e seus principais componentes, contra a larva de *Anopheles subpictus*, vetor da malária, *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus*, principal vetor da dengue e causador encefalite japonesa. Os valores de concentração letal de 50 e 90% obtidos foram CL_{50} 0,084, 0,0944 e 0,0872 mg.mL⁻¹ e CL_{90} de 0,165, 0,170 e 0,179 mg.mL⁻¹, respectivamente. No entanto, pode-se verificar que o efeito larvicida dos óleos essenciais não são conferidos ao seu principal componente (ARAÚJO et al., 2016) e sim ao efeito sinérgico dos principais componentes, o que potencializa a sua ação contra a larva. O acetato de eugenila constitui 5% do óleo essencial de cravo-da-índia, e a presença de um anel aromático e uma cadeia lateral com uma dupla ligação alílica torna o composto mais reativo, capaz de atuar sobre as membranas das paredes celulares das larvas (PANDEY et al., 2013), o que favorece a ação larvicida.

Embora alguns valores de CL_{50} sejam inferiores aos obtidos nesse trabalho, observa-se a permanência da atividade larvicida do éster obtido por catálise enzimática comprovando o potencial do uso de enzimas para síntese de substâncias com ação larvicida contra o as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

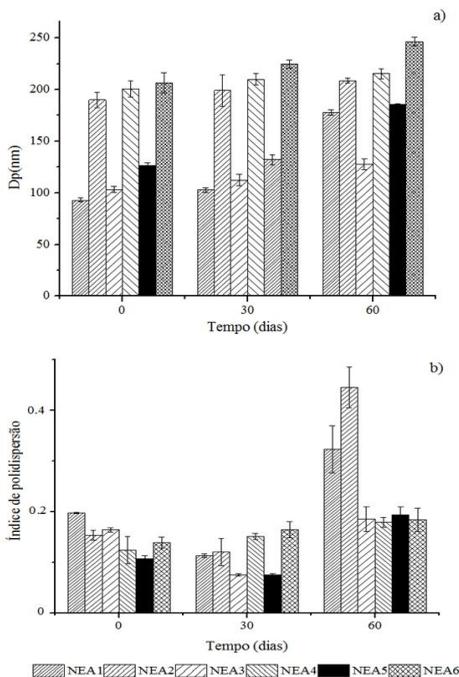
4.6. Encapsulação de acetato de eugenila por Nanoemulsificação (NE)

A Figura 16 mostra os valores de diâmetro de partícula e o índice de polidispersão das formulações de nanoemulsão contendo de 0,7 a 2,5% de acetato de eugenila, 0,33 a 0,5% de Crodamol GTCC, e 0,33 a 0,5% do surfactante não iônico Plutonic F-127. Os valores de diâmetro médio das nanopartículas variaram de $92,9 \pm 1,95$ a $206,4 \pm 9,6$ nm. As formulações que apresentaram maior quantidade de Crodamol GTCC e maior quantidade de surfactante apresentaram os menores valores de diâmetro de partícula.

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que o Crodamol GTCC (lipídeo líquido) é capaz de auxiliar na estabilidade da emulsão. Isso porque ele é um composto considerado ultrahidrofóbico, com baixíssima solubilidade em água, capaz de contrabalançar a pressão de Laplace das gotículas menores pelo aumento da pressão osmótica

evitando a sua degradação difusional (*Ostwald Ripening*), o que acarreta na formação de partículas com diâmetros menores (PERES et al., 2016). Para as formulações avaliadas nesse trabalho foram realizados testes anteriores sem a adição desse lipídeo. Porém, as emulsões formadas não mostraram uma boa estabilidade (dados não mostrados). Com relação aos resultados de índice de polidispersão os valores obtidos foram de $0,107\pm 0,005$ a $0,197\pm 0,001$. Valores abaixo de 0,2 indicam que a distribuição de tamanhos de gotas é relativamente estreita. A estabilidade das formulações das nanoemulsão foram monitoradas a temperatura de 10 °C por 60 dias. A Figura 16 apresenta os valores de diâmetro médio de partícula (Dp) e índice de polidispersão para as formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila.

Figura 16- Diâmetro médio de partícula (Dp) (a) e índice de polidispersão (PdI) (b) para as formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila no dia 0 e após 60 dias.



Durante 60 dias os valores de diâmetro de partícula variaram entre $127 \pm 2,5$ nm a $246,5 \pm 1$ nm, podendo-se observar que ocorreu pouca variação dos diâmetros médios de partícula para as formulações NAE1, NAE3 e NAE5. O maior aumento de diâmetro ocorreu nas formulações contendo maior quantidade de acetato de eugenila (NAE5 e NAE6). Com relação ao índice de polidispersão, as nanoemulsões com menor concentração do éster apresentaram um maior crescimento no valor de Pdl alcançando 0,445 para a NEA2 e 0,323 para NEA1.

A degradação difusional é o principal causador de desestabilização de nanoemulsões, uma vez que haja surfactante suficiente para estabilizar as gotas contra coalescência, isso porque ela é caracterizada pela transferência de massa das gotículas menores para as maiores devido à diferença de pressão de *Laplace*. Assim, as moléculas pequenas se difundem através do meio contínuo para entrar nas gotas maiores, onde a pressão de *Laplace* é menor, favorecendo a transferência de massa, com conseqüente desaparecimento das gotas pequenas e aumento do tamanho das gotículas maiores, ocasionando a desestabilização física do sistema da nanoemulsão (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008, SOLÉ et al., 2012).

Os surfactantes reduzem a tensão interfacial e permitem a formação de um filme em torno de gotículas, evitando a coalescência das partículas por repulsão eletrostática (surfactantes aniônicos ou catiônicos) ou impedimento hístico (surfactantes não-iônicos), permitindo alcançar a estabilidade coloidal do sistema (SOLÉ et al., 2012).

O valor do HLB (Balanço Hidrofílico Lipofílico) do surfactante não-iônico Pluronic F-127 utilizado nesse estudo é 22. Esse sistema numérico é usado para descrever a relação entre as partes solúveis em água e solúveis em óleo de um surfactante, sendo que os valores variam em uma escala de 1 a 30. Surfactantes com maiores valores de HLB permitem a formação de gotículas de óleo dispersas em meio aquoso (emulsões óleo em água), enquanto que os de menores valores são mais indicados para dispersões de água em óleo (WILLIAMS, 2007). Assim, a utilização do surfactante Pluronic F-127 se torna interessante para a aplicação de compostos hidrofóbicos como agentes larvicidas cuja principal aplicação é em meio aquoso, pois além de ser biodegradável é biocompatível (OLIVEIRA et al., 2017).

Com relação à estabilidade das formulações de nanoemulsão, em relação à solução preparada com Tween 80, DMSO, acetato de eugenila e água. Pode-se verificar que o valor do diâmetro de partícula preparada

com surfactante Tween 80 (5 gotas) e DMSO (30%) e água destilada (70%) apresentou os valores de $D_p 280 \pm 7$ nm e $PdI 0,22 \pm 0,04$. Porém, a estabilidade da solução não foi satisfatória ao longo de 60 dias, ocorrendo o depósito das gotículas de acetato de eugenila no fundo do recipiente, que pode ter ocorrido pelo fenômeno de coalescência como descrito por Solé et al. (2012), como pode-se observar na Figura 17.

Figura 17- Formulações de nanoemulsão solução dispersa contendo acetato de eugenila.



Levando em consideração a estabilidade e quantidade de surfactante adicionada às formulações, pois a quantidade de surfactante empregada está diretamente relacionada com o custo, sendo assim, para a estabilidade foram selecionadas as formulações contendo menor quantidade de surfactante Pluronic F-127 para os ensaios de determinação de potencial zeta e atividade larvicida. A medida de estabilidade baseia-se na distribuição de tamanho de partícula (DTP), buscando-se as DTPs mais estreita entre todas as nanoemulsões obtidas, além da evolução do tamanho médio das partículas ao longo do tempo. O potencial zeta está diretamente relacionado com estabilidade coloidal, pois valores muito negativos ou positivos aumentam a repulsão eletrostática e minimizam a coalescência entre as partículas. A Tabela 9 apresenta os valores de potencial zeta para as formulações de nanoemulsão NAE1, NAE2 e NAE5.

Tabela 9- Resultados do Potencial Zeta (mV) para as formulações de nanoemulsão NAE1, NAE2 e NAE5 contendo acetato de eugenila.

Amostra	Acetato de eugenila (%)	Potencial Zeta ± D.P. (mV)	pH
NAE1	0,7	-24,4 ± -1,9	6,8
NAE3	1,3	-24,8± -1,9	6,4
NAE5	2,5	-20,8 ± -1,6	6,0

O potencial zeta é a medida do potencial elétrico da superfície das partículas e nos transmite informações sobre a estabilidade da nanoemulsão. Dentre os fatores que influenciam nesse fator estão o pH, a força iônica e a concentração do sistema (BHATTACHARJEE, 2016). Com relação à concentração, pode-se observar que ocorreu uma pequena diminuição do valor do potencial zeta com o aumento do éster acetato de eugenila. Fenômeno que pode conferir diminuição da estabilidade, como o observado pela avaliação da estabilidade da nanoemulsão durante 60 dias.

Segundo a classificação de Patel e Agrawal (2011), as dispersões de nanopartículas com valores de potencial zeta de $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV e $\pm 20-30$ mV e maior que 30 mV, podem ser classificadas como altamente instável, relativamente estável, moderadamente estável e altamente estável, respectivamente. Assim, as formulações desenvolvidas nesse estudo são consideradas moderadamente estáveis, pois os valores variaram de -20,8 a -24,8 mV. O mesmo foi verificado por Salvia-Trujillo et al. (2015) na preparação de nanoemulsão utilizando o surfactante não iônico Tween 80 e óleos essenciais de capim-limão, cravo-da-índia tomilho e palmarosa.

4.6.1. Atividade larvicida da Nanoemulsão contendo acetato de eugenila

O uso de nanoemulsões contendo substâncias de óleos essenciais vem sendo encontrado na literatura (DUARTE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Neste trabalho pode-se observar que a atividade larvicida do acetato de eugenila foi mantida após a sua incorporação em nanoemulsão contendo Crodamol GTCC e Pluronic F-127. Nesse estudo foi verificado através do teste de t que não houve

diferença significativa no valor de concentração letal (CL) 50% e 90% de morte das larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Os valores de concentração letal de cada formulação de nanoemulsão contendo acetato de eugenila estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10-Valores de concentração letal (CL) 50 % e 90 % de morte das larvas do mosquito *Aedes aegypti* e os intervalos de confiança a 95 % determinados para as formulações de nanoemulsão contendo acetato de eugenila.

% Morte	NAE 1 (mg.mL ⁻¹)	NAE3 (mg.mL ⁻¹)	NAE 5 (mg.mL ⁻¹)
50	0,193 (0,183 a 0,202)	0,208 (0,19 a 0,22)	0,196 (0,18 a 0,2)
90	0,303 (0,280 a 0,335)	0,301 (0,28 a 0,32)	0,274 (0,25 a 0,29)

Além disso, foram realizados ensaios para verificar a toxicidade do Pluronic F-127 e do Crodamol GTCC sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Foi verificada ausência de morte das larvas, provando que o efeito tóxico da nanoemulsão é realmente dado pela presença do acetato de eugenila. Outro ponto que se pode citar é a permanência do efeito larvicida do éster, o que confirma o método como uma alternativa para incorporação de ativos lipofílicos em emulsões óleo em água visando a aplicação de larvicidas.

O uso de nanoemulsões como carregadores de substâncias bioativas de óleos essenciais com propriedades larvicidas foi evidenciado por Oliveira et al. (2017) com nanoemulsão contendo óleo essencial de *Pterodon emarginatus* e Tween 80 (Polisorbato 80) na proporção 1:1, no qual foram obtidas nanoemulsões com diâmetro médio de partícula variando de 128,0 ±6,2 nm a 53,2 ±0,5 nm, capazes de induzir a morte das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

O mesmo foi verificado por Rodrigues et al. (2014) que avaliaram formulações de nanoemulsões contendo óleo essencial de Copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer, Fabaceae). A formulação contendo 5% (m/m) de óleo essencial de copaíba, 5% (m/m) de surfactante e 90% (m/m) de água conduziu a diâmetro de partícula de 145,2 ± 0,9 nm e índice de polidispersão de 0,37 ± 0,009. A atividade larvicida da nanoemulsão foi avaliada com 0,25 mg.mL⁻¹ provocando a morte de 93% das larvas em 48 horas de exposição.

Com base nesses estudos pode-se observar que a nanoemulsão se torna uma alternativa interessante para aplicação de substâncias ativas como os terpenos e terpenóides de óleos essenciais com propriedades larvicidas. Além disso, por ser um método que não utiliza solventes nocivos ao ambiente, se torna ecologicamente correto. Cabe ainda salientar que as substâncias inseticidas e larvicidas empregadas nesse trabalho são totalmente seguras para aplicação no ambiente.

4.7. Encapsulação do acetato de eugenila em Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

A Tabela 11 apresenta os valores de diâmetro de partícula das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) carregadas com acetato de eugenila. Pode-se observar que os valores de diâmetro de partícula obtidos variaram de $209,3 \text{ nm} \pm 2,4$ a $300,0 \text{ nm} \pm 2,5$ e o índice de polidispersão $0,20 \pm 0,0208$ a $0,35 \pm 0,007$. O maior valor de eficiência de encapsulação foi obtido no ensaio contendo a concentração de 0,5 % de acetato de eugenila, 0,4 % de ácido esteárico, 0,2 % de Crodamol GTCC e 0,3 % de Pluronic F-127, com 96,4%. Todas as formulações obtidas de nanopartículas carregadas com acetato de eugenila apresentaram um valor em escala nanométrica. Foi possível observar que com aumento da quantidade da substância ativa, acetato de eugenila, ocorreu uma diminuição do tamanho de partícula e o mesmo ocorreu com o índice de polidispersão, resultado semelhante foi encontrado no estudo de Rodenak-Kladniew et al. (2017) com o estudo da produção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como carreadoras de linalol para o tratamento de células cancerígenas.

Os índices de polidispersão encontrados foram entre 0,2 e 0,35, o que indica a formação de sistemas monodispersos (NENEN; LEMOS SENNA, 2011; RODENAK-KLADNIEW et al., 2017). A análise da estabilidade das nanodispersões lipídicas, baseada em valores de potencial zeta, revelou que todas as amostras de NLS apresentaram valores entre -17 e -19 mV (Tabela 11). Segundo a classificação de Patel e Agrawal (2011), as formulações desenvolvidas nesse estudo pode-se observar que os valores variaram de -17,4 a -19,1 mV, valores dentro da classificação de nanopartículas relativamente estáveis.

Tabela 11- Resultado das eficiências de encapsulação (EE), diâmetro médio (Dp) de partícula e índice de polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (PZ) para as formulações de NLS carregadas com acetato de eugenila.

Ensaio	Dp ± DP. (nm)	PdI ± D.P	PZ ± D.P (mW)	pH	EE (%)
NLS-AE1	271,2 ± 11,2	0,22 ± 0,028	-18,4 ± -0,8	5,5	0
NLS-AE2	300,0 ± 3,1	0,27 ± 0,007	-19,1 ± -1,4	5,3	82,5 ± 1,3
NLS-AE3	293,9 ± 9,3	0,35 ± 0,045	-17,6 ± -1,5	5,1	93,9 ± 4,5
NLS-AE4	209,3 ± 2,4	0,20 ± 0,020	-17,4 ± -1,3	5,0	96,4 ± 1,0

*DP= Diâmetro de partícula; PdI=Índice de Polidispersão, PZ= Potencial Zeta; EE % Eficiência de encapsulação; DV= Desvio Padrão

A quantidade de ácido esteárico e a matriz sólida utilizada para incorporar o princípio ativo foi fixada em 0,4 %, pois o acréscimo na concentração lipídica pode causar o aumento do tamanho das NLS, devido ao aumento da viscosidade da “pré-emulsão”, dificultando a emulsificação na fase aquosa.

O ensaio com maior eficiência de encapsulação contendo 0,5 % de acetato de eugenila foi escolhido para a verificação do efeito da ausência e presença do Crodamol GTCC. A Tabela 12 mostra o efeito do Crodamol GTCC e do Pluronic F-127 no diâmetro de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com acetato de eugenila.

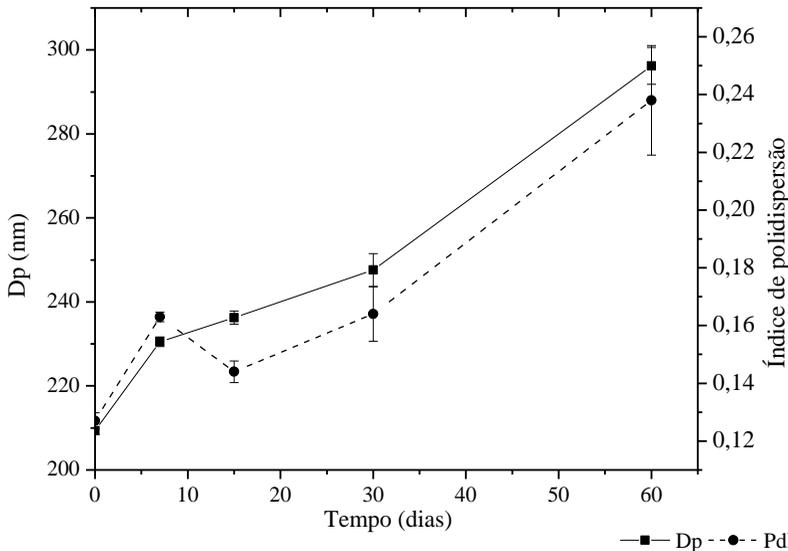
Tabela 12 - efeito do Crodamol GTCC e do Pluronic F-127 no diâmetro de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação das nls carregadas com acetato de eugenila.

Ensaio	Ác. Esteárico (%)	Crodamol CGTCC (%)	Pluronic F-127 (mg)	Dp± D.V	PdI± D.V	% E.E ± D.V
NLS5-AE	0,4	0,2	0,23	285,3 ± 13,4	0,38 ± 0,03	99,4 ± 0,2
NLS6-AE	0,4	0,2	0,30	209,2 ± 1,3	0,13 ± 0,04	96,4 ± 0,1
NLS7-AE	0,4	0	0,30	303,3 ± 11,4	0,27 ± 0,01	96,6 ± 0,2

*DP= Diâmetro de partícula; PdI=Índice de Polidispersão, PZ= Potencial Zeta; EE % Eficiência de encapsulação; DV= Desvio Padrão

Foi verificado que a adição de Crodamol GTCC favoreceu a formação de uma dispersão mais estável do que a amostra sem a adição do lipídeo. Além disso, ocorreu um aumento no diâmetro de partícula da amostra de 209,2 ±1,3 nm para 285,3 ±13,4 nm. A eficiência de encapsulação das amostras com a adição e sem a adição de Crodamol GTCC foram de 96,4 ± 1,0% e 96,6 ± 0,3%, respectivamente, praticamente iguais, considerando o desvio. Ambas as eficiências permaneceram elevadas porque a característica lipofílica do composto ativo faz com que este mesmo tenha maior afinidade pela matriz lipídica (SOUTO et al., 2011). Somado a isto, a adição de Crodamol GTCC e/ou acetato de eugenila aumentam as imperfeições, facilitando acomodação do princípio ativo. Porém, devido à instabilidade de algumas formulações com PdI elevado, o que indica uma DTP muito larga, com a ocorrência da separação das fases no período de 1 a 2 semanas, foi escolhida a amostra NLS-AE4 com a adição de Crodamol GTCC para os ensaios de caracterização, que apresentou o menor PdI. A Figura 18 apresenta a estabilidade da formulação NLS-EA4 por 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Figura 148 - Estabilidade do diâmetro médio (Dp) e índices de polidispersão (PdI) das NLS durante 60 dias de armazenamento.



Garg e Singh (2011) produziram nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com eugenol utilizando a técnica de homogeneização e emulsificação, onde foram avaliadas três diferentes condições, fixando a concentração de 200 mg de eugenol (princípio ativo) e em 1000 mg de Polaxamer 188 (surfactante), 2000 a 4000 mg ácido esteárico e ausência ou presença de Crodamol GTCC. O melhor resultado obtido foram com NLS com diâmetro de partícula de 88 nm, índice de polidispersão de 0,27 e porcentagem de encapsulação de 96,4% utilizando 5 mg/mL, 400 mg de ácido esteárico, 200 mg Crodamol GTCC e 300 mg Pluronic F-127. Nesse estudo também foi verificado que a presença do Crodamol GTCC na formulação interfere na obtenção de NLS de diâmetros reduzidos e solução homogênea, e que o acréscimo na quantidade de matriz lipídica (ácido esteárico) aumenta as dimensões das NLS devido ao aumento na viscosidade da pré-emulsão, tornando mais difícil a emulsificação na fase aquosa.

Nenen e Lemos-Senna (2011) estudaram a produção de NLS carregadas com resveratrol pelo método de difusão do solvente a quente, e observaram que os valores dos diâmetros variaram entre 200 a 230 nm e índice de polidispersão de 0,20 a 0,28, valores similares aos encontrados nesse trabalho.

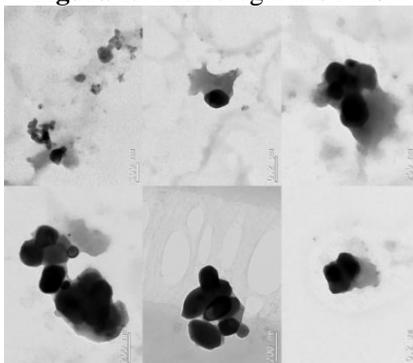
Rodenak-Kladniew et al. (2017) estudaram a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas como carreadores de linalol (LN), que é um monoterpene encontrado em óleos essenciais, que possui atividade antiproliferativa de células cancerígenas. Foi utilizada a técnica de homogeneização e emulsificação utilizando como lipídeos miristato de miristilo, ésteres cetílicos e palmitato de cetila e Pluronic® F68 como surfactante. O tamanho das nanopartículas obtidos foram entre 90-130 nm com índices de polidispersão com valores inferiores a 0,2 e Potencial Zeta de -4,0 mV. As percentagens de encapsulação de LN em NLS foram superiores a 80% para todas as formulações testadas.

Desta forma, a produção de nanopartículas lipídicas sólidas pela técnica de fusão-emulsificação é promissora para veicular compostos bioativos derivados de fontes naturais, e tem alcançado resultados satisfatórios em relação à aplicação dos mesmos na sua forma livre em diversos ramos da indústria química farmacêutica e alimentícia.

4.7.1. Morfologia das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

A morfologia das nanopartículas lipídicas sólidas de acetato de eugenila foram visualizadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A Figura 19 mostra a formação de partículas de acetato de eugenila na faixa nanométrica, tamanho de partícula de 200 nm e com formato esférico.

Figura 19-Morfologia das NLS.



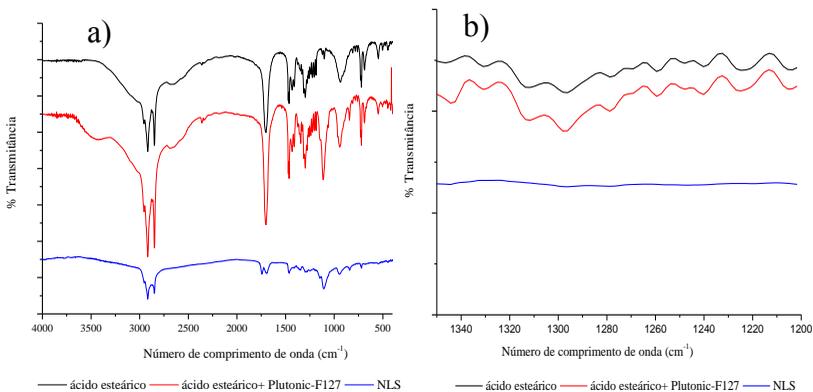
Fonte: AUTOR

4.7.2. Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A cristalinidade de nanopartículas sólidas foi avaliada com o espectro de infravermelhos por análise de FT-IR. Na Figura 20-a pode-se observar um pico na região $1700-1710\text{ cm}^{-1}$, indicando a presença do grupo C=O das moléculas do ácido graxo, além dos picos em 1464 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} indicando a presença de ligação C-O a partir do ácido e a (C-O) da carboxila, respectivamente. Com relação à amostra de NLS pode-se verificar o desaparecimento do pico a 1410 cm^{-1} que pode ser atribuído à presença do surfactante sobre superfície de lipídeos (GARGH; SINGH, 2011). A Figura 20-b apresenta os picos entre 1200 e 1350 cm^{-1} , região que informa sobre grupos CH_2 conformacional presentes no ambiente cristalino das matrizes lipídicas, onde observou-se que o ácido esteárico puro e a mistura ácido esteárico e Pluronic® F-127 apresentaram espectros semelhantes no intervalo entre $1200-1350\text{ cm}^{-1}$, enquanto para a NLS exibiram uma redução acentuada de todos os picos de intensidade.

Estes resultados indicaram uma diminuição da cristalinidade quando o acetato de eugenila foi adicionado à fase orgânica, indicando que uma estrutura menos ordenada foi formada. O mesmo comportamento foi verificado por Gargh e Singh (2011), utilizando a metodologia de nanopartículas lipídicas sólidas empregando como matriz o ácido esteárico juntamente com o Crodamol GTCC e princípio ativo o eugenol oriundo de óleo de cravo-da-índia.

Figura 20 - Análise FT-IR das Nanopartículas Lipídicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila



4.7.3. Atividade larvicida das Nanopartículas Lípidicas Sólidas carregadas com acetato de eugenila

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados apenas com a formulação com maior percentual de encapsulação de acetato de eugenila (96,4%), correspondendo à formulação NLS-EA 4, contendo 0,4 % de ácido esteárico, 0,2 % de Crodamol GTCC e 0,3% mg de Pluronic F-127.

Os valores de CL_{50} e CL_{90} de 0,204 mg/mL com intervalo de confiança ao nível de 95% foram 0,184 a 227,5 mg.mL⁻¹. Além disso, foram realizados ensaios para verificar a toxicidade do Ácido esteárico, Pluronic F-127 e do Crodamol GTCC sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Foi verificada ausência de morte das larvas, provando que o efeito tóxico da nanoemulsão é realmente dado pela presença do acetato de eugenila.

Os estudos com a aplicação de nanopartículas lipídicas sólidas para formulações de larvicida ainda é pouco explorado. Porém, nesse trabalho pode-se observar que a toxicidade do acetato de eugenila, comprovada em trabalhos anteriores, foi mantida após a sua encapsulação, sendo seu efeito verificado em 24 horas de exposição das larvas.

A aplicação da nanotecnologia como alternativa para a incorporação de compostos larvicida e inseticida tem sido relatada na literatura através da síntese de nanopartículas metálicas ou poliméricas. Estudos realizados por Elemike et al. (2017) com nanopartículas de prata carregadas com extrato de folha de *Lippia citriodora* verificaram que a incorporação do extrato em nanopartículas de prata foi eficiente contra as larvas de *Culex quinquefasciatus* (um vetor de filariose linfática). Os valores de CL_{50} e CL_{90} após 24 h de exposição foram 0,412 mg.mL⁻¹ e 0,691 mg.mL⁻¹, respectivamente, para o extrato e CL_{50} e CL_{90} de 0,138 mg.mL⁻¹ e 0,242 mg.mL⁻¹ para nanopartículas de prata, comprovando o aumento da eficácia do efeito larvicida quando o extrato foi incorporado em nanopartículas de prata. O mesmo efeito larvicida das nanopartículas de prata foi verificado por Nalini et al. (2017) contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (vetor da Dengue, Chikugunnya e Zika vírus) e *Anopheles stephensi* (vetor da malária).

Muthukumaran et al. (2015) verificaram o efeito larvicida de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato aquoso de *Gmelina asiática* contra as larvas terceiro estágio de *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, no qual obteve-se os valores de CL_{50} de 0,022 mg.mL⁻¹ e CL_{90} de 0,040 mg.mL⁻¹ para *Anopheles stephensi*;

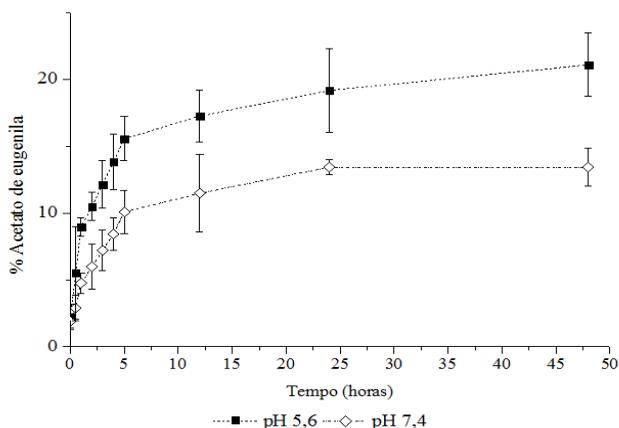
LC₅₀ de 0,025 mg.mL⁻¹ e LC₉₀ de 0,045 mg.mL⁻¹ para *Aedes aegypti* e LC₅₀ de 0,027 mg.mL⁻¹ e LC₉₀ de 0,048 mg.mL⁻¹ para o *C. quinquefasciatus*.

O estudo comprovou que as nanopartículas lipídicas sólidas podem ser empregadas em sistemas aquosos propícios ao desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O que prova a sua ação larvicida e pelo valor ser superior ao do éster livre podemos afirmar que devido a sua incorporação na matriz a liberação da amostra pode ser prolongada o que mantém o ambiente menos disposto ao desenvolvimento do inseto. Além disso, o ácido esteárico e o acetato de eugenila empregados não oferecem nenhum tipo de risco de depósito no meio ambiente na literatura. Assim como proposta surge a possível incorporação das nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com acetato de eugenila em formulações de repelentes e larvicidas já comercializados.

4.7.4. Ensaio de Liberação

O perfil de liberação do acetato de eugenila incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas foi avaliado em meio com pH 7,4 e ligeiramente ácido pH 5,6 (chuva ácida), visando simular a liberação do éster em diferentes valores de pH. Pode-se observar na Figura 21 que nas primeiras horas já ocorre a liberação do acetato de eugenila no sistema. Isso pode ocorrer devido à possibilidade de o éster estar incorporado na superfície da nanopartícula lipídica. O maior percentual de liberação do acetato de eugenila em meio com pH 5,6 foi alcançado em 48 horas (2 dias) no valor de 21,1 % e em meio com pH 7,4 o maior percentual foi de 13,4 % em 48 horas.

Figura 21- Perfil de liberação das NLS carregadas com acetato de eugenila.



Em matrizes hidrofóbicas e lipofílicas o controle de liberação da substância ativa ocorre principalmente por mecanismos de difusão através dos poros ou por erosão, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com o princípio ativo encapsulado. Nesse trabalho foi observado o fenômeno de liberação imediata conhecido como *Bursts effect*, ocasionado por uma quantidade de acetato de eugenila presente na superfície das nanopartículas lipídicas sólidas (MANADAS, PINA; VEIGA, 2002) liberado rapidamente nos primeiros 15 minutos de exposição ao meio. Após esse período o princípio ativo foi liberado lentamente.

Além disso, a presença de lipídeos líquidos bem com lipídeo sólido produziu uma rede cristalina imperfeita, causando alta mobilidade das moléculas carregadas, o que pode ter causado o aumento da difusão do princípio ativo para fora da nanopartícula. Comportamento similar foi observado por Rodenak-Kladniew et al. (2017) na produção de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com linalol.

Outro fator importante é a solubilidade do éster, que nesse estudo foi determinado a partir de uma solução saturada de acetato de eugenila em água destilada agitada por 24 horas. O valor obtido foi de $1,45 \text{ g.L}^{-1}$, podendo considerar então o éster como uma substância pouco solúvel em meios aquosos. Assim, o mecanismo de liberação das nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com acetato de eugenila pode ser explicado pela dissolução do éster no meio por difusão e por dissolução da

substância ativa partir do processo de degradação das partículas (MANADAS, PINA; VEIGA, 2002).

4.8. Encapsulação pelo método de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos-SEDS

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a eficiência de encapsulação do acetato de eugenila em PHBV. O maior valor encontrado foi de 48,7%, no ensaio 1 com pressão de operação de 80 bar e concentração de acetato de eugenila de 5 mg.mL⁻¹.

Tabela 13 - Resultados obtidos para o encapsulação de acetato de eugenila em PHBV pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.

Ensaio	Pressão (bar)	Conc. Acetato de eugenila (mg.mL ⁻¹)	EE (%)
1	80	5	48,7
2	100	5	13,8
3	80	20	25,6
4	100	20	7,0

* EE= Eficiência de encapsulação real;

Pode-se observar que a diminuição da concentração do princípio ativo ocasionou em um aumento na eficiência de encapsulação, ao contrário do aumento de pressão, no qual verifica-se a obtenção de um percentual de encapsulação menor. Comportamento verificado nos ensaios 1 e 2 com a mesma quantidade de acetato de eugenila na solução orgânica, com valor de 48% e 13% de eficiência, respectivamente. Com relação a concentração da substância ativa Boschetto et al. (2014) observaram comportamento semelhante ao encontrado nesse trabalho, obtendo um valor maior de encapsulação de Bixina com a diminuição da concentração do composto ativo e maior concentração do co-polímero PHBV.

Com relação à pressão de operação podemos observar que o aumento da pressão ocasionou na diminuição dos valores de eficiência de encapsulação. As técnicas de encapsulação utilizando fluidos supercríticos baseiam-se na imiscibilidade ou baixa solubilidade do soluto de interesse no CO₂-Sc. O efeito anti-solvente é dado pela completa solubilidade do solvente no fluido supercrítico (COCERO et al., 2009).

Assim, os baixos valores de percentual de encapsulação pode ser atribuído ao caráter apolar do acetato de eugenila, tornando o composto solúvel no CO₂ supercrítico com o aumento de pressão e a temperatura constante, e isso causa o carregamento do composto de interesse com o anti-solvente (JUPPO; BOISSIER; KHOO, 2003). Os ensaios 2 e 4 demonstraram esse comportamento visto que com o aumento da pressão de operação do sistema, de 80 para 100 bar, provocou uma queda no percentual de encapsulação de 13,8% para 7,0%. Isso porque em maiores pressões podem proporcionar um aumento da densidade do CO₂-Sc tornando-o mais solúvel que a substância ativa, causando o carregamento do mesmo diminuindo o percentual de encapsulação (HONG et al., 2007).

Com relação à morfologia das partículas, a Tabela 15 apresenta os valores obtidos para o diâmetro médio das partículas, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e desvio padrão obtidos para os ensaios de encapsulação do acetato de eugenila em PHBV pela técnica de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos. Pode-se verificar que os ensaios que apresentaram maiores concentrações de acetato de eugenila apresentaram maiores valores de diâmetro médio de partícula. O mesmo comportamento foi observado por Yan et al. (2015) empregando a técnica SEDS na encapsulação da baicaleína um flavonóide bioativo encontrado nas ervas *Scutellaria baicalensis* utilizado pela medicina chinesa no tratamento de diversos tipos de câncer.

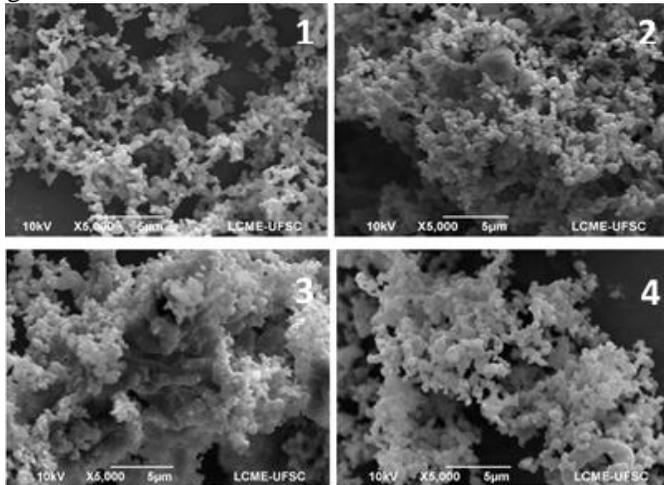
O efeito da variação de pressão sobre o tamanho médio das partículas não foi significativo (dados não mostrados), porém observou-se que quando o valor de pressão foi de 80 para 100 bar o diâmetro médio das partículas aumentou, comportamento este, semelhante ao encontrado por Aguiar et al. (2016) no processo de micronização do resveratrol pela técnica SEDS. A Tabela 14 mostra os valores obtidos do diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$), desvio padrão e o coeficiente de variância (CV) para os ensaios.

Tabela 14 – Os valores de diâmetro médio ($D_{\text{médio}}$), desvio padrão e o coeficiente de variância (CV) para os ensaios.

Ensaio	Pressão (bar)	Conc. Acetato de eugenila (mg.mL ⁻¹)	$D_{\text{médio}}$ (nm)
1	80	5	88 ± 6,35
2	100	5	111 ± 9,21
3	80	20	113± 5,3
4	100	20	109 ± 1,06

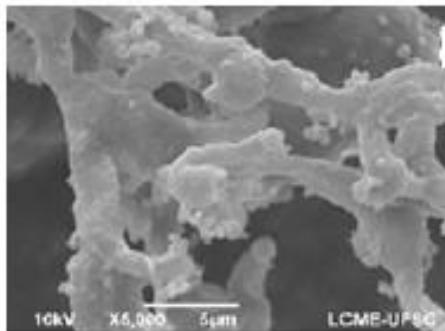
As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em 3 categorias: macro- ($>5000 \mu\text{m}$), micro- ($0,2\text{-}5000 \mu\text{m}$) e nanopartículas ($<0,2 \mu\text{m}$). Assim, como o diâmetro médio das partículas de acetato de eugenila encapsulado apresentaram valores entre 88 e 113 nm podemos classificá-las como nanopartículas (AZEREDO, 2005). A Figura 22 apresenta as morfologias obtidas dos ensaios de encapsulação do acetato de eugenila em nanopartículas de PHBV.

Figura 152 – Partículas de encapsulação de acetato de eugenila empregando técnica SEDS.



Os ensaios com maiores valores de eficiência de encapsulação de acetato de eugenila apresentaram nanopartículas mais esféricas, como mostrado na Figura 22.1 e 22.3. Os ensaios com menor valor de eficiência de encapsulação apresentaram uma estrutura mais fibrosa característica do polímero sem a presença da amostra, mostrada na Figura 22.2 e 22.4, o que confirma a diminuição da concentração do composto encapsulado. A Figura 23 apresenta a estrutura do polímero PHBV micronizado sem a adição da substância ativa por SEDS, o que confirma a modificação da sua estrutura quando submetido ao processo com o composto de interesse.

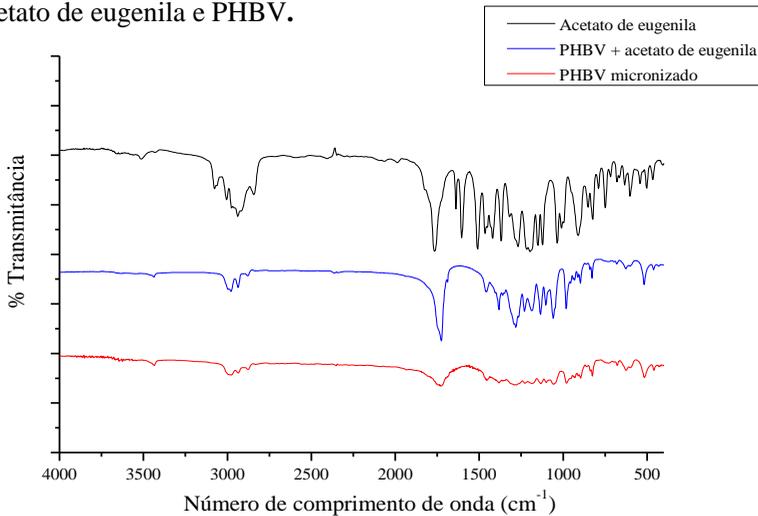
Figura 163-Estrutura do co-polímero PHBV



4.8.1. Análise de espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das cápsulas de PHBV carregadas com acetato de eugenila

Com relação à confirmação da presença do acetato de eugenila encapsulado em nanopartículas de PHBV, a Figura 24 apresenta os espectros obtidos nas análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. O espectro do co-polímero micronizado puro apresentou bandas características das ligações C-H com os valores 2985,29 e 2876 cm^{-1} , da carbonila C=O com o valor de 1725 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} correspondente ao grupamento metila. Além das bandas entre 800 e 980 cm^{-1} que corresponde a vibração de alongamento simétrica da ligação -C-O-C- e entre 1050 e 1150 cm^{-1} características do alongamento assimétrico (FARAGO; RAFFIN; POHLMANN, 2008). Nas amostras carregadas com acetato de eugenila em PHBV, pode-se verificar um leve deslocamento com a banda forte da carbonila do éster ligada ao anel aromático com intensidade de 1725 cm^{-1} , além de duas bandas de estiramento axial de éster em 1181 cm^{-1} (alta intensidade) e 1288 cm^{-1} (média intensidade), a presença do anel aromático está representada nesse espectro com os valores de comprimento de onda bandas do anel aromático entre (3000-3100 cm^{-1}) (LOPES; FASCIO, 2004).

Figura 17 - Espectro de infravermelho obtido das nanopartículas de acetato de eugenila e PHBV.



4.8.2. Atividade larvica das nanopartículas de PHBV carregadas com acetato de eugenila

A determinação da atividade larvica das nanopartículas de PHBV não foi possível de ser realizada devido à lenta dissolução do polímero em água e a lenta liberação do acetato de eugenila se tornando inviável a aplicação das partículas como carreadores de substâncias larvicidas. Foram adicionados 5 mg de amostra em fracos contendo água destilada e verificada a liberação do princípio ativo através da análise da leitura de comprimento de onda em 272 nm UV-vis. Não foi observada nenhuma alteração na absorbância durante sete dias de exposição das partículas no meio.

5. CONCLUSÕES

A síntese em modo contínuo em reatores de leito fixo empacotado utilizando lipase Lipozyme TL IM se mostrou uma alternativa promissora para a obtenção de ésteres de eugenol. Foi possível obter a condição ótima utilizando vazão de alimentação de $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, razão molar de eugenol:anidrido acético de 1:5,82 e temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ alcançando o valor de 93,1% de conversão em acetato de eugenila. O mesmo éster provou ter uma potencial ação larvicida com CL_{50} $0,102 \text{ mg/mL}$ contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

A encapsulação do éster pelos métodos de Nanoemulsificação foi possível com a obtenção da nanoemulsão carregada com acetato de eugenila. Com nanopartículas com diâmetro médio entre $92,9 \pm 1,95$ a $206,4 \pm 9,6 \text{ nm}$ e baixos índices de polidispersão $0,107 \pm 0,005$ a $0,197 \pm 0,0012$. As nanoemulsões comprovaram ser veículos de substâncias com ação larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Com os valores de atividade larvicida de CL_{50} NAE1 $0,193 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, NAE 3 $0,208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, NAE5 $0,196 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com acetato de eugenila demonstrou-se promissora para o transporte do éster como agente larvicida, pois foi alcançado o valor de $96,4 \pm 1,01\%$ de eficiência de encapsulação em partículas com diâmetro de $209,3 \pm 2,46 \text{ nm}$, índice de polidispersão de $0,20 \pm 0,02$, obtendo valores de concentração letal CL_{50} de $0,204 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A encapsulação proposta pela técnica de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos apresentou o valor máximo de eficiência de 48,7% com concentração de acetato de eugenila $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e pressão de operação de 80 bar. Foi possível realizar a caracterização de partículas em escala nanométrica com diâmetros médios entre 88 e 109 nm. Porém, as nanopartículas obtidas não foram eficientes contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Desta forma, foi possível obter o éster acetato de eugenila empregando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador em reator de leito fixo empacotado. E as nanopartículas obtidas pelos métodos de encapsulação Nanoemulsificação e Nanopartículas Lipídicas Sólidas comprovaram ser potenciais carreadores de compostos larvicidas lipofílicos visando a aplicação destas em ambientes aquosos propícios ao desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Estudo de síntese enzimática de outros ésteres de interesse industrial utilizando reatores de leito fixo empacotado;
- Estudo utilizando diferentes enzimas imobilizadas no leito do reator;
- Estudo de variação de escala do reator;
- Produção de nanopartículas com matriz hidrofílica como carreadores de compostos larvicidas;
- Produção de nanopartículas de acetato de eugenila e determinação da sua toxicidade frente a células cancerígenas;
- Produção de nanopartículas de acetato de eugenila utilizando sistemas de baixa energia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.; ABBASZADEH, A. efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Medical**, v. 24, n. 2, p. 51–56, 2014.
- AFFONSO, R. S.; LESSA, B.; SLANA, G.B.C.A.; BARBOZA, L.L.; ALMEIDA, F.V.; LIMA, A.L.S.; SOUZA, F.R. FRANÇA, T.C.C. Quantification and Characterization of the Main Components of the Ethanolic Extract of Indian Cloves. *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1316–1331, 2014.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475–90, 2013.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal of the Controlled Release Society**, v. 128, n. 3, p. 185–99, 200
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007.
- ARAÚJO, A. F. O.; RIBEIRO-PAES, J.T.; DEUS, J.T.; CAVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R.S.; ALVES, P. B.; MACORIS, M. L. G. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n.7, p. 443-449, 2016.
- ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEO ESSENCIAL *Syzygium aromaticum* (CRAVO DA ÍNDIA). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, p. 137–144, 2013.
- AZEREDO, H. M. C. DE. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, p. 89–97, 2005.
- AZUDIN, N. Y.; DON, M. M.; SHUKOR, S. R. A. Production and kinetics of isoamyl acetate from acetic anhydride using *Candida antarctica* lipase B in a solvent-free system. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1057–1062, 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

- BALAJI, A.P.B. B.; ASHU, A.; MANIGANDAN, S.; SASTRY, T.P.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Polymeric Nanoencapsulation of insect repellent: Evaluation of its bioefficacy on *Culex quinquefasciatus* mosquito population and effective impregnation onto cotton fabrics for insect repellent clothing. **Journal of King Saud University - Science**, v.29, n. 4, p. 517-527, 2017.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392–416, 1996.
- BARBOSA, J. D. SILVA, V.B.; ALVES, P.B.; GUMINA, G.; SANTOS, R. L. C.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1478–1483, 2012.
- BAYRAM, Ö. A.; BAYRAM, M.; TEKIN, A. R. Spray drying of sumac flavour using sodium chloride, sucrose, glucose and starch as carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 2, p. 253–260, 2005.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BOSCHETTO, D. L.; ARANHA, E. M.; SOUZA, A. A. U.; SELENE M.A.; SOUZA, G.U.; FERREIRA, S. R.S.; PRIAMO, W.L.; OLIVEIRA, J. V. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 22–29, 2014.
- CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de populares de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 523–527, 2003.
- CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M.; ANUAR, S. H. M.; RAHMAN, M. B. A.; REZAYEE, M. Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 226–231, 2012.
- CHANG, S.; SHAW, J.; YANG, C.; SHIEH, C. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1362–1366, 2007.
- CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of

soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 545–550, 2013.

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 Biotechnology**, v.168, p. 742-751, 2012.

COCERO, M. J.; MARTÍN, ÁNGEL.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546–555, 2009.

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

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMO, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v.15, p.304-309, 2005.

D'AVILA FARIAS, M.; OLIVEIRA, P. S.; DUTRA, F. S. P.; FERNANDES, T.J.; PEREIRA, C. M. P.; OLIVEIRA, S. Q.; STEFANELLO, F. M.; LENCINA, C. L.; BARSCHAK, A. G. Eugenol derivatives as potential anti-oxidants: Is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 733–746, 2013.

DAHLAN. I. A.H. KAMARUDDIN. G.D. NAJAFPOUR. Cytronellyl butyrate synthesis in non-conventional media using packed-bed immobilized *Candida rugosa* lipase reactor. **International Journal of Engineering**. v.18, p. 153-164, 2005.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. **Bioresource Technology**. v.100, p. 5818–5826, 2009.

DAMNJANOVIĆ, J.J.; M.G. ŽUŽA.; SAVANOVIĆ, J. K.; BEZBRADICA, D. I.; DU MIJIN, Z. Z.; BŔSKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N.; Z. D. KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch

- and fluidized bed reactor. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.75, p. 50-59, 2012.
- DE MORAIS, S.M. VILA-NOVA N.S.; BEVILAQUA C.M.L. RONDON F.C.; LOBO C.H.; MOURA A.A.A.N.; SALES A.D. RODRIGUESA. P.R.; FIGUEREIDO J.R.; CAMPELLO C.C.; WILSON M.E.; ANDRADE JR H.F. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 22, p 6250–6255, 2014.
- DEVI, K. P.; NISHA, A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.
- DONSÌ, F.; SESSAA, M.; MEDIOUNIC, H.; MGAIDIC, A.; FERRARIA, G. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1666–1671, 2011.
- DUARTE, J. L.; AMADO, J. R.R.; OLIVEIRA, A.E.M.F.M.; CRUZ, R. A.S.; FERREIRA, A.M.; SOUTO, R. N.P.; FALCÃO, D. Q.; CARVALHO, JOSÉ C.T.; FERNANDES, C. P. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 189–192, 2015.
- EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). EFSA Journal. (2011).
- 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). Essencial oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, p.220-243.
- ELEMIKE, E.E.; ONWUDIWE, D. C.; EKENNIA, A. C.; EHIRI, R. C.; NNAJI, N. J Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations. **Materials Science and Engineering C**, v.75, p.980–989, 2017.
- 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.

- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, n. 10, p. 510-523, 2010.
- FARAGO, P. V.; RAFFIN, R. P.; POHLMAN, A. R.; GUTERRE, S. S.; ZAWADZKI, S.F.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197–212, 2010.
- FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; JACQUES, A. V.; TEDESCO, A. C.; SILVA, M. C. S.; RICCI-JÚNIOR, E., SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Synthesis of ZnPc loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for photodynamic therapy in leukemic cells. **Materials Science and Engineering C**, v.60, p. 458–466, 2016.
- FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 1971.
- FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A.M. ; FERREIRA,S.R.S.; OLIVEIR, J.V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 656–663, 2009.
- FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 39–54, 2002.
- FURTADO, R. F.; DE LIMA, M. G.A.; NETO, M. A.; BEZERRA, J. N.S.; SILVA, M. G.V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843–847, 2005.
- GANGULY, S.; NANDI, S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 1–4, 2015.
- GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 280–288, 2011.
- GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetato with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 788–794, 2005.
- GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.338-344.

- GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. **Ecotoxicology. Environmental Safety**, v.129, p. 85-90, 2016.
- GUAN, S.; LI, YAN, R.; TANG, S.; QUAN, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1558-1564, 2007.
- GÜLÇİN, I.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489-499, 2012.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HONG, H. L.; SUO, Q.L.; HE, W.Z.; LI, C.P. Formation of carotene/proanthocyanidin composite microparticles via the Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) process through prefilming atomization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 20, p. 6630-6634, 2007.
- HORCHANI, H.; SALEM, N.B.; ZARAI, Z.; SAYARI, A. GARGOURI, Y.; CHAÂBOUNI, M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2809-2817, 2010.
- ITABAIANA, I.; DE MARIZ E MIRANDA, L. S.; DE SOUZA, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, n. June 2015, p. 1-9, 2013.
- JAKOVETIĆ, S. M.; LUKOVIĆ, N.D.; BOŠKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N. M.; BEZBRADICA, PICAZO, D.I.; ESPINOSA, R.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Comparative Study of Batch and Fluidized Bed Bioreactors for Lipase-Catalyzed Ethyl Cinnamate Synthesis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p.16689-16697, 2013.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series. 934 (2005) 7-16.
- JUPPO, A. M.; BOISSIER, C.; KHOO, C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 385-401, 2003.

KAKRAN, M.; ANTIPINA, M. N. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 47–55, 2014.

KALOGIANNIS, C.G.; MICHAILOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amoxicillin in poli (L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8738–8743, 2006.

KENTISH, S.; WOOSTER, T.J.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170–175, 2008.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, RJ, 2008.

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

LERIN, A. L.; CATANI, M.; OLIVEIRA, D.; MASSI, A. BORTOLINI, B.; CAVAZZINI, A.; GIOVANNINI P. Continuous ion-exchange resin catalysed esterification of eugenol for the optimized production of eugenyl acetato using a packed bed microreactor. **Rsc Advances**. v. 5, p. 76898–76903, 2015.

LOPES, W. A.; FASCIO, E. M. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L.F.; KLEIN, M.P., AYUB, M. A.Z., RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51–55, 2015.

LOU, Z.; CHEN, J.; YU, F.; WANG, H.; KOU, X.; MA, C.; ZHU, SONG. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 371–377, 2017.

MACHADO, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F.M.; FERREIRA, S. R.S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V.

Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17–21, 2014.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, 2002.

MASON, T. G.; WILKING, J N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. 635–666, 2006.

MATTE, C.R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J.K.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**.v. 127, p. 67-75, 2016.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2297–2316, 2011.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced drug Delivery Reviews**, v. 47, n.2-3, p.165-106, 2001.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 9, p. 907–916, 2011.

MUTHUKUMARAN, U.; GOVINDARAJAN, M.; MOHAN, R.; HOTI, S.L. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gmelina asiatica* leaf extract against filariasis, dengue, and malaria vector mosquitoes. **Parasitology Research**, v.114, p.1817–1827, 2015.

NALINI, M.; LENA, M.; SUMATHI, P.; SUNDARAVADIVELAN, C. Effect of phyto-synthesized silver nanoparticles on developmental stages of malaria vector, *Anopheles stephensi* and dengue vector, *Aedes aegypti*. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2017.

NEDOVIĆ, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NENEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n.3, p 408-413, Jan 2011.

NOVOZYMES. **Enzymes at work**. 2013.

OLIVEIRA, A E.M.F.M.; BEZERRA, D C., DUARTE, J. L. CRUZ, R. A.S. SOUTO, R. N.P.; FERREIRA, R.M.A.; NOGUEIRA, J.; CONCEIÇÃO, E. C.; LEITÃO, S. BIZZO, H. R.; GAMAG, P. E.; CARVALHO, J. C.T.; FERNANDES, C. P. Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p.1–9, 2017.

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.

PAROUL, N.; BIASI, A.; ROVANI, A. C.; PRIGOL, C. DALLAGO, R.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; Oliveira, D. Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 5, p. 583–589, 2010.

PATEL, V.R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 2, 2011

PAVELA, R., 2007. Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on plant origin. **Crop Protection**. v. 29, p. 913–920, 2010.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; LIMA, L. G.G.; SALGADO, A. P.S. P. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PERES, L. B.; PERES, L. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by anorganic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.140, p. 317–323, 2016.

PERRY, R.H.; GREEN, D.W.; MALONEY, J.O. Perry's Chemical Engineers' Handbook. Eighth ed. McGraw-Hill. chapter 7. New York. 2008.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 327–332, 2009.

- POPPE, J.K. R.F. LAFUENTE. R.C. RODRIGUES. M.A.Z. AYUB. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 511-525, 2011.
- PRIAMO, W. L.; DE CEZARO, A. M.; BENETTI, S. C.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S.R.S. In vitro release profiles of β -carotene encapsulated in PHBV by means of supercritical carbon dioxide micronization technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 2, p. 137–143, 2011.
- PRIAMO, W. L.; DALMOLIN, I.; BOSCHETTO, D. L.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Micronization processes by supercritical fluid technologies: a short review on process design (2008-2012) - doi: 10.4025/actascitechnol. v35i4.18819. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 4, p. 695–709, 2013.
- PRIAMO, W. L.; DE CEZARO, A. M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J. V.; Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 103–109, 2010.
- RAHMAN, N. F. A.; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B. High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2168–2176, 2011.
- RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of
- RODENAK-KLADNIEW, B.; ISLAN, G. A.; BRAVO, M. G.; DURÁN, N.; CASTRO, G. R. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.154, p. 123–132, 2007.
- RODRIGUES, E C.R.; FERREIRA, A. M., VILHENA, JESSICA C.E.; ALMEIDA, F. B.; CRUZ, R. A.S.; FLORENTINO, A. C.; SOUTO, R. N.P.; CARVALHO, J. C.T.; FERNANDES, C. P. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p. 699-705, 2014.
- ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**. v.127 p.269- 277, 2007.
- ROUSSAKI, M.; GAITANAROUA, A.; DIAMANTIB, CH.; VOUYIOUKA, S.; PAPASPYRIDES, C.; KEFALAS, P.; DETSIA, A.

- Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 182–187, 2014.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547–556, 2013.
- SANTOS, S. R. L.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; BARBOSA, J.D.F.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Toxic effects on and structure–toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.10, p. 1049-1054, 2010.
- SARI, T.P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R.R.B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M.; ATHIRA, S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 540-546, 2015.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442–449, 2009.
- SCOTTI, L., SCOTTI, M.T., SILVA, V.B., SANTOS, S.R.L., CAVALCANTI, S.C.H., MENDONÇA, A JR, F.J.B. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Medicinal chemistry**. v.9, p.1–10, 2013.
- SEBAALY, C. et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v. 178, p. 52–62, 2015.
- SERRANO-ARNALDOS, M. et al. Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 4, p. 641–649, 2016.
- SERRI, N. A.; KAMARUDDIN, A. H.; TAU LEN, K. Y. A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: Investigation of parameter and kinetics study. **Food and Bioprocess Processing**, v. 88, n. 2-3, p. 327–332, 2010.
- SEVERINO, P. et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- SHMIDELL W; LIMA; A. U; AQUARONE, E.; BORZANI, V. **Biotecnologia Industrial**. v. 2,4 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001

- SHUKRI, R.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1116–1121, 2010.
- 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, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.3, p. 782–795, 2015.
- SINGH, S.; DOBHAL, A. K.; JAIN, A.; PANDIT, J. K.; CHAKRABORTY, S. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: Zidovudine. **Chem.Pharm. Bull.** 2010.
- SHI, F.; ZHAO, J.; YANG, L.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; FENG, N. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. **International Journal of Nanomedicine**, n.7, p. 2033–2043, 2012.
- SKORONSKI, E.; BONETTI, T. M.; JOÃO, J. J.; FÚRIGO JÚNIOR, A. STABILITY OF IMMOBILIZED *Rhizomucor miehei* LIPASE FOR THE SYNTHESIS OF PENTYL OCTANOATE IN A CONTINUOUS PACKED BED. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 03, p. 633–641, 2014
- SMITH, L. B.; KASAI, S. SCOTT, J.G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133 p.1–12, 2016.
- SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, p.133–139, 2012.
- SOUTO, E.B; SEVERINO, P; SANTANA, M.H.A; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1762-1769, 2011.
- STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A. PAPANICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846–1859, 2013.
- SUGUMAR, S.; GHOSH, V.; NIRMALA, M. J.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and

- wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044–1049, 2014.
- SUTILI, F.K.; RUELA, H.S.; LEITE, S.G.F.; MIRANDA, L.S.M.; LEAL, I.C.R. SOUZA, R.O.M.A. Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** n.85-86, p. 37–42, 2013.
- THANGAM, T.S.; K. KATHIRESAN. Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts. **Botanica Marina**, v. 34, p. 433-435,1991.
- TRINDADE, F.T.T.; STABELI, R.G.; PEREIRA, A.A.; FACUNDO, V.A.; SILVA, A. A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts. oil-resin. and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darling* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Braz. J. Pharmacogn.** v.23, p. 464-470, 2013.
- VADGAMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part II: Packed bed reactor (PBR) studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 105–109, 2015a.
- VADGAMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part II: Packed bed reactor (PBR) studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 105–109, 2015b.
- WANG, J.; GU SHUANG-S.; CUI, H.; WU, X.; WU, F. A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 39–47, 2014.
- WILLIAMS. J. J. **Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces**, Michigan, USA 2007.
- XU, X. T.; PORSGAARD, H.; ZHANG, J.; ADLER-NISSEN. HØY, C. Production of Structured Lipids in a Packed-Bed Reactor with *Thermomyces lanuginosa* Lipase. **J. Am. Oil Chemistry Society**. v. 79, p. 561-565, 2002.
- YAN, T.; CHENG, Y.; WANG, Z.; HUANG, D.; MIAO, H.; ZHANG, Y. Preparation and characterization of camptothecin powder micronized by a supercritical antisolvent (SAS) process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 412–419, 2010.
- YANG. H. Y. MU. H. CHEN. C. SU. T. YANG. Z. XIU. Sn-1.3-specific interesterification of soybean oil with medium-chain triacylglycerol catalyzed by Lipozyme TL IM. **Chinese Journal of Chemistry Engineering**. v. 22, p.1016-1020, 2014.

YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287–308, 2005.

ZHAO, H.; LIU, J.; LV, F.; YE, R.; BIE, X.; ZHANG, C.; LU, Z. Enzymatic synthesis of lard-based ascorbyl esters in a packed-bed reactor: Optimization by response surface methodology and evaluation of antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 393–399, 2014.

8. PUBLICAÇÕES ADVINDAS DO DESENVOLVIMENTO DA TESE

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

-SINAFERM 2015



XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

01 a 04 de setembro de 2015
Fortaleza, Ceará, Brasil

EMPREGO DE FLUÍDO SUPERCRÍTICO NO ENCAPSULAMENTO DE ACETATO DE EUGENILA OBTIDO POR SÍNTESE ENZIMÁTICA

Juliana R. Machado¹, Gean P. S. Aguiar¹, Raquel A. Loss¹, Daiane L. Boschetto¹, Gabriela N. Pereira¹, Lorenzo M. P. C. Chaves¹, Haiko Hense¹, Marcelo Lanza¹, José V. de Oliveira¹, Débora de Oliveira¹, Jorge L. Ninow¹.

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - EQA

-ENZITEC 2016



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática
ENZITEC 2016

Síntese enzimática do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo
empacotado

Juliana Ribeiro Machado¹, Priscila dos Santos Oliveira¹, Gabriela Nayana Pereira¹,
Mara Cristina Picoli Zenevicz¹, Débora de Oliveira¹, Jorge Luiz Ninow¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química e Alimentos
Caixa Postal 5040 – 88.040-970 Florianópolis – SC - E-mail: debora@enq.ufsc.br

-SINAFERM 2017

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas

Certificamos que o trabalho intitulado

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EUGENYL ISOBUTYRATE IN PATHOGENIC
MICROORGANISM**

de autoria de

Juliana da Silva Zanatta, Juliana Ribeiro Machado, Lindomar Lerin, Pedro Henrique Hermes de Araújo, Cláudia Sayer, Débora de Oliveira

Foi apresentado na forma pôster no XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, de 3 a 6 de setembro de 2017, realizado em Aracaju - SE, Brasil.

XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas

Certificamos que o trabalho intitulado

**EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EUGENYL ACETATE
NANOEMULSION**

de autoria de

Juliana Ribeiro Machado, Lindomar Lerin, Mara Cristina Picoli Zenevitz, Pedro Henrique Hermes de Araújo, Jorge Ninow, Débora de Oliveira

Foi apresentado na forma pôster no XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, de 3 a 6 de setembro de 2017, realizado em Aracaju - SE, Brasil.

- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENCAPSULAÇÃO DE ACETATO DE EUGENILA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Eng. Alimentos: CAMILA VIEIRA HILLESHEIN

-ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO



Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity



Juliana Ribeiro Machado^a, Gabriela Nayana Pereira^a, Priscilla dos Santos de Oliveira^a, Mara Cristina Zenevitz^a, Lindomar Lerin^a, Rafael dos Reis Barreto de Oliveira^b, Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti^b, Jorge Luiz Ninow^a, Débora de Oliveira^{b,*}

^a Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 880-40-900, Brazil

^b Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

