

Páulia Maria Cardoso Lima Reis

**ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE  
LOURO (*Laurus nobilis* L.) POR EXTRAÇÃO POR FLUIDO  
SUPERCRÍTICO DE EMULSÕES**

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

Orientador: Prof. Dr.-Ing. Haiko Hense

Florianópolis  
2018

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

Reis, Páulia Maria Cardoso Lima  
Encapsulação do óleo essencial da folha de louro  
(Laurus nobilis L.) por extração por fluido  
supercrítico de emulsões / Páulia Maria Cardoso Lima  
Reis ; orientador, Haiko Hense, 2018.  
163 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. Louro. 3.  
Miniemulsão. 4. SFEE. 5. Micropartículas. I. Hense,  
Haiko. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.  
III. Título.

**“ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE LOURO (*Laurus nobilis* L.) POR EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE EMULSÕES”**

Por

**Páulia Maria Cardoso Lima Reis**

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.

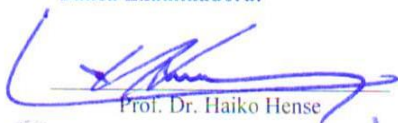


Prof. Dr. Haiko Hense  
**Orientador**



Prof. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
**Coordenadora**

**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. Haiko Hense



p/ Sandra Regina Salvador Ferreira

Prof. Dr. Leandro Danielski  
(videoconferência)



Prof. Dr. Dachamir Hotza



Prof. Dra. Sandra Regina Salvador  
Ferreira



Dr. Gean Pablo Silva Aguiar

Florianópolis, 13 de setembro de 2018.

Este trabalho é dedicado ao meu irmão  
Diego Johannes Cardoso de Souza, *in*  
*memoriam*.

## AGRADECIMENTOS

Sinto-me feliz por ter muito a agradecer nesta jornada de doutoramento. Foram muitos os conhecimentos acadêmicos e de vida compartilhados, desafios individuais e experiências únicas que proporcionaram amadurecimento profissional e pessoal, contribuindo para o desenvolvimento de um novo olhar sobre o mundo, as minhas relações pessoais e sobre mim, como ser humano.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGAL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), agradeço pela acolhida e disponibilidade de parcerias acadêmicas que contribuem para o desenvolvimento da ciência em nosso país.

Ao corpo docente do PPGAL, especialmente ao meu querido orientador, professor Haiko Hense, a quem agradeço pela formação acadêmica consistente, séria e, ao mesmo, tempo aconchegante, que tornaram os desafios da aprendizagem acadêmica alcançáveis e prazerosos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IFSERTÃO-PE) e à equipe da Coordenação de Tecnologia de Alimentos, agradeço pela liberação a essa capacitação acadêmica e, conjuntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do programa Prodoutoral, pelo financiamento da minha estadia e da execução experimental desta tese.

Ao Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Termodinâmica (LATESC), formado por uma equipe fraternal de trabalho e acolhimento caloroso, conduzidos pela professora Sandra Ferreira e pelo professor Marcelo Lanza, agradeço pelo apoio ao desenvolvimento experimental do trabalho, pelas discussões dos empecilhos naturais de uma pesquisa acadêmica e, ainda, pelo convívio harmonioso durante esses 4 (quatro) anos.

À Natália Mezzomo e ao Gean Pablo Aguiar, agradeço pelas orientações e auxílio técnicos indispensáveis para a construção desse trabalho e pela disponibilidade para correções e esclarecimento de dúvidas, em qualquer momento do dia e da noite.

Aos colegas Alcidênio Pessoa, Pollyanna Nogueira da Cruz, Simone Mazzutti, Kátia Andrade, Pedro Henrique dos Santos, Luiz Gustavo Rodrigues, Thatyara Pereira, Ihakri Nunc-nfõonro e Jônatas Lopes, agradeço pelo companheirismo imprescindível para a execução experimental deste trabalho de tese.

Aos Laboratórios: 1 - Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDER), em nome do professor Dachamir Hotza; 2 - Central de Análises, em nome do Leandro Guarezi Nandi; 3 - Controle de Processos (LCP), em nome de Alessandra Menezes; 4 – Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, em nome da professora Deise Baggio e; 5 - Central de Microscopia Eletrônica (LCME), agradeço pela realização de experimentos específicos e fundamentais para o aprofundamento das discussões técnicas deste trabalho.

Ao meu companheiro, Jeferson Reis, à minha filha, Júlia Reis e ao meu filho, Vinícius Reis, agradeço pelo aconchego amoroso do lar, pela compreensão da minha dedicação ao desenvolvimento deste trabalho e pela vida compartilhada. Amo vocês!

À minha mãe, Lúcia Cardoso, às minhas irmãs, Roberta e Laila, e aos meus irmãos, Francisco Lima, Tadeu Lima e Diego J. C. de Souza (*in memoriam*), agradeço por estarem sempre presentes e disponíveis nos momentos felizes e difíceis da minha vida. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui! Amo-os.

Às Forças celestiais que inexplicavelmente nos auxilia nos momentos difíceis, obrigando-nos a sair da inércia dos limites dos nossos conhecimentos, movendo tudo e a todos de um lugar, conhecido ou não, para outro, transformando nossas vidas a cada segundo.

“Ser libre es (...) gastar la mayor cantidad de tiempo de nuestra vida en aquello que nos gusta hacer”.

(José Pepe Mujica, 2012)

## RESUMO

As folhas de louro possuem um óleo essencial rico em monoterpenos oxigenados, sendo o 1,8-cineol o seu componente majoritário. Os óleos essenciais são fonte de compostos bioativos e utilizados por diversas indústrias. No entanto, tais óleos são formados por compostos voláteis, sensíveis à luz UV, a altas temperaturas e, ainda, sofrem oxidação na presença do ar. Por isso, a encapsulação tem sido recomendada para aumentar a proteção desses compostos químicos. Técnicas de nucleação que envolvem calor ou evaporação podem causar danos aos óleos essenciais e, também, deixar uma quantidade significativa de solventes. Com isso, a Extração por Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) surge como uma alternativa ambientalmente segura, não térmica e com bons resultados, tanto em relação à eficiência de encapsulação, quanto no controle do tamanho das partículas. Considerando esse contexto, o objetivo deste trabalho foi encapsular o óleo essencial da folha de louro pelo processo SFEE, analisando as interferências que as variações da concentração do óleo essencial e do tempo de sonicação causam na estabilidade das emulsões, utilizadas no processo de encapsulação, bem como avaliar as influências produzidas pelos parâmetros do processo SFEE na eficiência de encapsulação e na remoção do solvente orgânico e, por fim, caracterizar as partículas obtidas. Para isso, o trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira, foram obtidos os extratos da folha de louro por diferentes métodos, com a finalidade de selecionar o que apresentasse a maior quantidade de 1,8-cineol. Na segunda etapa, os experimentos foram voltados para o estudo da produção de emulsões estáveis e adequadas para serem utilizadas no processo SFEE, variando a concentração do óleo essencial na emulsão (6, 9 e 12 mg/mL) e o tempo de sonicação (2, 4 e 6 min). Na terceira e última etapa, foram estudadas as influências causadas na eficiência de encapsulação pelas variáveis do processo SFEE, além da estabilidade das suspensões e as características morfológica, térmica e antimicrobiana das partículas. As maiores concentrações de 1,8-cineol e de monoterpenos oxigenados foram obtidas do extrato da hidrodestilação. Miniemulsões estáveis foram formadas, por 24 h, com tamanho de gotículas entre 239,5 a 357,00 nm. As maiores concentrações de óleo essencial testadas na emulsão, 9 e 12 mg/mL, sonicadas por 4 min, contribuíram para a diminuição do tamanho das gotículas. O aumento da concentração do óleo essencial na emulsão e os menores níveis de temperatura (35 e 45 °C) e pressão (90 e 100 bar), estudados no processo SFEE, favoreceram a encapsulação do óleo essencial pelo Hi-Cap, alcançando 80 % de eficiência de encapsulação.



Além disso, os parâmetros do processo SFEE propiciaram a remoção do solvente orgânico pelo CO<sub>2</sub> supercrítico, obtendo como resultado um teor residual abaixo de 1 ppm nas partículas. Por fim, micropartículas esféricas em suspensão, com tamanho variando entre 200 e 1000 nm, estáveis em meios de pH pouco ácido ou alcalino, amorfas, resistentes à degradação térmica e com atividades antimicrobianas, foram obtidas pelo processo SFEE.

**Palavras-chave:** 1,8-cineol, miniemulsão, SFEE, micropartículas.

## ABSTRACT

Laurel leaves have an essential oil rich in oxygenated monoterpenes, and 1,8-cineole is the major compound. Essential oils are a source of bioactive compounds and are used by many industries. However, such oils are formed by volatile compounds, UV radiation are fragile, at high temperatures and undergo oxidation in the presence of air. Therefore, encapsulation is recommended to increase the protection of these chemical compounds. Nucleation techniques involving heat or evaporation can cause damages to essential oils and contain large amounts of solvents. Thereby, the Supercritical Fluid Emulsion Extraction (SFEE) emerges as an environmentally safe and non-thermal alternative with good results both in terms of the efficiency of encapsulation and control of the particle size. Considering this context, the objective of this work was to encapsulate of laurel leaves essential oil by the SFEE process, analyzing the interferences that the variations of the essential oil concentration and the sonication time cause in the stability of the emulsions, which are used in the process of encapsulation, as well as to evaluate the influences produced by the parameters of the SFEE process in the efficiency of encapsulation and the removal of the organic solvent and, finally, to characterize the particles obtained. For this, the work was divided into three parts. In the first, the laurel leaves extracts were obtained by different methods, in order to select the one that presented a higher amount of 1,8-cineole. In the second part, the experiments were directed to the study of the production of stable emulsions suitable for use in the SFEE process, varying of the essential oil concentration in the emulsion (6, 9 and 12 mg/mL) and the sonication time (2, 4 and 6 min). The third and last part, the influence of the parameters SFEE process on the efficiency of encapsulation and stability of the suspensions were studied as also morphological, thermal and antimicrobial characteristics of the particles. The highest of 1,8-cineole concentration and oxygenated monoterpenes were obtained from the hydrodistillation extract. Stable miniemulsions were formed, for 24 h, with droplet size ranging from 239.5 to 357.00 nm. The highest essential oil concentrations in the emulsion (9 and 12 mg/mL), sonicated for 4 min, contributed to the reduction of droplets size. The increase of the essential oil concentration in the emulsion and the lower levels studied of temperature (35 and 45 °C) and pressure (90 and 100 bar) in SFEE process, favored the encapsulation of essential oil by Hi-Cap, achieving 80 % efficiency of encapsulation. In addition, the parameters of the SFEE process propitiated the removal of the organic solvent by supercritical CO<sub>2</sub>, resulting in a

residual content below 1 ppm the particles. Lastly, spherical microparticles in suspension, with size varying between 200 and 1000 nm, stable in media pH low acid or alkaline, amorphous, resistant to thermal degradation and with antimicrobial activities were obtained by the SFEE process.

**Keywords:** 1,8-cineole. Miniemulsion. SFEE. Microparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura I - Organograma do documento da tese.....	25
Figura 2.1 - Ilustração da extração do óleo essencial da folha de louro.....	29
Figura 2.2 - a) Estrutura química do isopreno; b) Estrutura química do 1,8-cineol.....	31
Figura 2.3 - Representação de uma emulsão óleo em água (O/W).....	39
Figura 2.4 - Representação da suspensão após o processo SFEE.....	40
Figura 2.5 - Ilustração da encapsulação/coprecipitação por SFEE.....	42
Figura 2.6 - Representação da dupla camada elétrica em relação ao Potencial Zeta em uma suspensão.....	47
Figura 2.7 - Características da estrutura morfológica do amido modificado.....	48
Figura 3.1 - Fluxograma dos experimentos da etapa de extração, identificação de compostos químicos, quantificação do 1,8-cineol e análises da atividade antioxidante e de compostos fenólicos dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração.....	56
Figura 3.2 - Extração por hidrodestilação (HD) da folha de louro.....	57
Figura 3.3 - (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	60
Figura 3.4 - Fluxograma dos experimentos da etapa de análise da estabilidade das emulsões e encapsulação do óleo essencial de louro por SFEE.....	66
Figura 3.5 - Diagrama esquemático do equipamento SFEE.....	70
Figura 3.6 - Fluxograma dos experimentos da etapa de encapsulação do óleo essencial de louro ( <i>Laurus nobilis</i> L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE.....	76
Figure 4.1 - Kinetic assay of laurel leaves at 15 MPa, 45 °C and $8 \pm 2$ g CO <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .....	84
Figure 4.2 – Isotherm curves for the global yield of laurel leaves extracts obtained by Sc-CO <sub>2</sub> .....	86
Figure 4.3 - 1,8-cineole quantification on laurel leaves of extracts by different extraction techniques (Hydrodistillation - HD, Soxhlet - SOX, Ultrasound-assisted extraction - UAE, Supercritical CO <sub>2</sub> - Sc-CO <sub>2</sub> ).....	91

Figure 4.4 - $\alpha$ -Tocopherol percentage of relative area on SOX, UAE and Sc-CO <sub>2</sub> extracts of laurel leaves by different extraction techniques.....	92
Figure 4.5 - Hydrodynamic size distribution of emulsion droplets (Dg) for assay 8 (the lines represent the triplicate of the analysis).....	98
Figure 4.6 - Hydrodynamic size (Dg) of the emulsion droplets as a function of sonication time (t <sub>s</sub> ) and essential oil concentration in the emulsion (C <sub>eo</sub> ).....	99
Figure 4.7 - Influence of C <sub>eo</sub> on efficiency of encapsulation.....	100
Figure 4.8 - Scanning electron microscopy of SFEE particles obtained at 10 MPa and 40 °C: a) particle with oval aspect; b) wrinkled structure of the particle; c) different sizes of the particles.....	103
Figure 4.9 - PXRD of non-processed Hi-Cap and the particles from assay 8.....	104
Figure 4.10 - DSC of laurel leaves oil, Hi-Cap non- process, and particles assay 8.....	105
Figura 4.11 - Diagrama de Pareto referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.....	110
Figura 4.12 - Superfície resposta referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.....	111
Figura 4.13 - Modelo preditivo referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.....	111
Figura 4.14 - Potencial Zeta das suspensões oriundas do processo SFEE.....	113
Figura 4.15 - Potencial Zeta das suspensões 1 e 8 (sem óleo essencial), obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.....	114
Figura 4.16 - Morfologia das partículas da suspensão 1 (TEM).....	115
Figura 4.17 - Ampliação da região da morfologia que destaca o núcleo e o envoltório das partículas da suspensão 1 (TEM).....	116
Figura 4.18 - Padrões de difração de raio-X do Hi-Cap e das partículas da suspensão 1, obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.....	117
Figura 4.19: TGA e DTG do óleo essencial de louro, do Hi-Cap e das partículas, obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.....	118
Figura 4.20 - Placas de petri com os resultados do teste de difusão em ágar para os micro-organismos testados. A = controle positivo (ciprofloxacina (0,05 mg/mL) e para a <i>C. albicans</i> o fluconazol (7,5 mg/mL)); B = controle negativo; C = emulsão (C <sub>eo</sub> = 12 mg/mL) e; D = suspensão 1, C <sub>eo</sub> = 9,6 mg/mL.....	121

Figura 4.21 - Curvas de crescimento do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.....	122
Figura 4.22 - Curvas de crescimento do micro-organismo <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.....	123
Figura 4.23 - Curvas de crescimento do micro-organismo <i>Candida albicans</i> MDM8 para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.....	125
Figura A.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de 1,8-cineol por GC-FID.....	160
Figura B.1: Curva de calibração para determinação da concentração do ácido gálico.....	161
Figura C.1: Curva de calibração para determinação da concentração do óleo essencial da folha de louro por UV-Vis.....	162
Figura D.1: Curva de calibração para determinação da concentração do teor residual do diclorometano.....	163

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Métodos de extração, rendimento e composição química do óleo essencial da folha de louro.....	33
Tabela 2.2 - Aplicações e atividades bioativas do óleo essencial da folha de louro.....	35
Tabela 2.3 - Parâmetros de processo e compostos estudados na encapsulação por SFEE.....	44
Tabela 2.4 - Características das partículas obtidas por SFEE.....	45
Tabela 3.1 - Planejamento experimental da Sc-CO <sub>2</sub> .....	62
Tabela 3.2 - Planejamento do estudo das variáveis na formação de emulsões.....	67
Tabela 3.3 - Parâmetros fixos para formação das emulsões.....	68
Tabela 3.4 - Projetos acadêmicos para construção do equipamento de SFEE.....	69
Tabela 3.5 - Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> + 3 pontos centrais.....	77
Table 4.1 - Extraction yield (X <sub>0</sub> ) of laurel leaves extracts obtained by different extraction techniques (Hydrodistillation - HD, Soxhlet - SOX, Ultrasound-assisted extraction - UAE, Supercritical Fluid Extraction - Sc-CO <sub>2</sub> ).....	85
Table 4.2 - Chemical profile (GC-MS) of laurel leaves extracts obtained by different extraction techniques (Hydrodistillation - HD, Soxhlet - SOX, Ultrasound-assisted extraction - UAE, Supercritical CO <sub>2</sub> - Sc-CO <sub>2</sub> ).....	88
Table 4.3 - Total phenolic compounds (TPC) and antioxidante activity (EC <sub>50</sub> ) of laurel leaves extracts compared to the amount of 1,8-cineole and α-tocopherol.....	94
Table 4.4 - Parameters for emulsion formation and stability.....	97
Tabela 4.5 - Eficiência da encapsulação do processo SFEE.....	107
Tabela 4.6 - ANOVA para avaliação dos efeitos das variáveis (T e P) do processo SFEE.....	109
Tabela 4.7 - Análise de variância para avaliação do teste de Fischer.....	109
Tabela 4.8 - Trabalhos encontrados na literatura sobre a EE por SFEE.....	112
Tabela 4.9 - Tamanho das partículas obtidas por SFEE dos trabalhos encontrados na literatura.....	126
Tabela 4.10 - Teste de difusão em ágar: diâmetro dos halos de inibição formados pela emulsão e pelo controle positivo.....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA -	atividade antioxidante
Abs <sub>amostra</sub> -	absorbância da amostra
Abs <sub>branco</sub> -	absorbância do branco
Abs <sub>controle</sub> -	absorbância do controle
ANOVA -	análise de variância
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C <sub>eo</sub> -	laurel leaves essential oil concentration
CG-FID -	cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-MS -	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
C <sub>oe</sub> -	concentração do óleo essencial de louro
DCM -	diclorometano
Dg -	tamanho hidrodinâmico das gotículas da emulsão
DMSO -	dimetil sulfóxido
Dp -	tamanho das partículas
DPPH -	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC -	calorimetria diferencial de varredura
DTG -	1ª. derivada do TGA
EC <sub>50</sub> -	mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50 % a concentração inicial do radical DPPH
EE -	eficiência de encapsulação ou efficiency of encapsulation
EQA -	Departamento de Engenharia Química e Alimentos
ESC -	extrações supercríticas
F -	teste de Fisher
GL -	graus de liberdade
HD -	hidrodestilação
Hi-Cap -	amido modificado
LATESC -	Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
LCME -	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LCP -	Laboratório de Controle de Processos



LINDEN -	Laboratório Interdisciplinar para Desenvolvimento de Nanoestruturas
MEV -	Microscopia Eletrônica de Varredura
MQ -	média quadrática
P -	pressão
$\rho_{CO_2}$ -	densidade (massa específica) do solvente supercrítico
PdI -	índice de polidispersividade
PDRX -	difração de raio-X de pó
PZ -	potencial zeta
$Q_{(CO_2)}$ -	vazão do gás carbônico supercrítico
$Q_e$ -	vazão da emulsão
Sc-CO <sub>2</sub> -	supercritical fluid extraction with CO <sub>2</sub>
SFEE -	extração por fluido supercrítico de emulsões
SOX -	Soxhlet
SQ -	soma dos quadrados
T -	temperatura
TEM -	microscopia eletrônica de transmissão
TFT -	teor de compostos fenólicos totais
TGA -	análise termogravimétrica
$t_s$ -	tempo de sonicação ou sonication time
UAE -	ultrassom
UFSC -	Universidade Federal de Santa Catarina
UV -	ultravioleta
UV-Vis -	ultravioleta visível
VLE -	equilíbrio vapor-líquido

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....</b>	<b>23</b>
<b>ESTRUTURA DA TESE.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.1 Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2 Específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.1 Folha de louro (<i>Laurus nobilis</i> L.) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.2 Óleos essenciais.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.3 Métodos de extração, atividades e aplicações dos óleos     essenciais .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.4 Formação de nano/micropartículas.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.4.1 Formação da emulsão.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.4.2 Encapsulação por SFEE .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.5 Caracterização das partículas.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1.5.1 Estabilidade das suspensões .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1.5.2 Propriedades morfológicas e de tamanho das partículas .</b>	<b>48</b>
<b>2.1.5.3 Propriedades térmicas das partículas.....</b>	<b>52</b>
<b>2.2 CONTRIBUIÇÕES FINAIS DE CARÁTER INOVADOR.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Extração, identificação de compostos químicos, quantificação do 1,8-cineol e análises da atividade antioxidante e de compostos fenólicos dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração .</b>	<b>55</b>
<b>3.1.1 Aquisição e preparação da matéria-prima .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.2 Extrações a pressão ambiente .....</b>	<b>57</b>

3.1.2.1	<i>Extração por hidrodestilação (HD)</i> .....	57
3.1.2.2	<i>Extração direta em Soxhlet (SOX)</i> .....	58
3.1.2.3	<i>Extração por ultrassom (UAE)</i> .....	58
<b>3.1.3</b>	<b>Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico</b> .....	<b>59</b>
3.1.3.1	<i>Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (Sc-CO<sub>2</sub>)</i> .....	59
3.1.3.2	<i>Experimentos cinéticos – curvas de extração e parâmetros cinéticos</i> .....	61
3.1.3.3	<i>Rendimento global das extrações supercríticas</i> .....	62
3.1.3.4	<i>Densidade (massa específica) do solvente supercrítico (<math>\rho_{CO_2}</math>)</i> .....	62
<b>3.1.4</b>	<b>Análise qualitativa da fração mais volátil e quantificação do 1,8-cineol</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Análises da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos dos extratos</b> .....	<b>63</b>
3.1.5.1	<i>Método do radical DPPH</i> .....	63
3.1.5.2	<i>Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT)</i> .....	64
<b>3.1.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise da estabilidade das emulsões e encapsulação do óleo essencial de louro por SFEE</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Formação das emulsões</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dg) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (PdI)</b> .....	<b>68</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) ....</b>	<b>69</b>
3.2.4.1	<i>Implantação do SFEE no LATESC</i> .....	69
3.2.4.2	<i>Montagem do equipamento de extração com fluido supercrítico de emulsões (SFEE)</i> .....	69
3.2.4.3	<i>Processo de extração com fluido supercrítico de emulsões (SFEE)</i> .....	71
<b>3.2.5</b>	<b>Secagem das suspensões</b> .....	<b>72</b>

<b>3.2.6</b>	<b>Eficiência de encapsulação (EE) do processo SFEE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Teor residual de solvente orgânico (DCM) nas partículas .</b>	<b>73</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Estrutura das partículas .....</b>	<b>73</b>
3.2.8.1	<i>Morfologia e tamanho médio das partículas .....</i>	73
3.2.8.2	<i>Difração de raios-X das partículas (PDRX).....</i>	74
3.2.8.3	<i>Perfil calorimétrico das partículas (DSC).....</i>	74
<b>3.2.9</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3</b>	<b>Encapsulação do óleo essencial de louro (<i>Laurus nobilis</i> L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE .....</b>	<b>76</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Encapsulação por Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE).....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Eficiência de encapsulação (EE) nas suspensões .....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Teor residual de solvente orgânico (DCM).....</b>	<b>77</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Estabilidade das suspensões .....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Morfologia e tamanho médio das partículas (suspensão 1) 78</b>	
<b>3.3.6</b>	<b>Caracterização das partículas da suspensão 1.....</b>	<b>78</b>
3.3.6.1	<i>Estrutura das partículas (PDRX).....</i>	78
3.3.6.2	<i>Estabilidade térmica .....</i>	79
<b>3.3.7</b>	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>79</b>
3.3.7.1	<i>Preparo dos inóculos .....</i>	79
3.3.7.2	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana .....</i>	80
3.3.7.2.1	<i>Método de difusão em ágar .....</i>	80
3.3.7.2.2	<i>Teste de diluição em caldo – Curva de inibição microbiana.....</i>	81
3.3.7.3	<i>Avaliação estatística .....</i>	81
<b>3.3.8</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>.....</b>	<b>83</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>.....</b>	<b>83</b>

<b>4.1 Chemical composition and antioxidant activity of <i>Laurus nobilis</i> L. extracts obtained by different extraction techniques</b> .....	<b>83</b>
4.1.1 Supercritical CO <sub>2</sub> (Sc-CO <sub>2</sub> ) extraction kinetics .....	83
4.1.2 EO extraction yield (X <sub>0</sub> ).....	84
4.1.3 Chemical profile of the laurel leaves extracts .....	87
4.1.4 Quantification of 1,8-cineole.....	90
4.1.5 Total phenolic compounds and antioxidant activity .....	93
4.1.6 CONCLUSION.....	95
<b>4.2 Ultrasound-assisted emulsion of laurel leaves essential oil (<i>Laurus nobilis</i> L.) encapsulated by SFEE</b> .....	<b>96</b>
4.2.1 Emulsions stability .....	96
4.2.2 Influence of C <sub>eo</sub> on efficiency of encapsulation (EE) .....	100
4.2.3 Extraction efficiency of organic solvent .....	101
4.2.4 Mean particles size and morphology .....	102
4.2.5 Powder X-ray diffraction (PXRD).....	103
4.2.6 Calorimetric profile.....	104
4.2.7 CONCLUSION.....	106
<b>4.3 Encapsulação do óleo essencial de louro (<i>Laurus nobilis</i> L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE</b> .....	<b>107</b>
4.3.1 Eficiência de encapsulação (EE) .....	107
4.3.2 Estabilidade das suspensões .....	112
4.3.3 Morfologia da suspensão .....	115
4.3.4 Caracterização das partículas .....	117
4.3.4.1 Estrutura das partículas .....	117
4.3.4.2 Decomposição térmica .....	118
4.3.5 Atividade antimicrobiana .....	119
4.3.6 CONCLUSÃO .....	126
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>127</b>
<b>5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>127</b>

<b>5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>130</b>
<b>6. PRODUÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA.....</b>	<b>130</b>
<b>6.1 Trabalhos apresentados em eventos .....</b>	<b>130</b>
<b>6.2 Artigos submetidos.....</b>	<b>130</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>160</b>
<b>Apêndice A.....</b>	<b>160</b>
<b>Apêndice B.....</b>	<b>161</b>
<b>Apêndice C.....</b>	<b>162</b>
<b>Apêndice D.....</b>	<b>163</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### Por quê?

- O óleo essencial da folha de louro é conhecido pela sua atividade aromática em alimentos e fonte de compostos bioativos;
- Óleos essenciais são amplamente utilizados nas indústrias de cosméticos, perfumaria, química, farmacêutica e de alimentos;
- Óleos essenciais são voláteis e sensíveis ao calor, à luz ultravioleta, à umidade e à oxidação;
- A encapsulação dos óleos essenciais promove proteção aos fatores externos, além de torná-los mais disponíveis em meios hidrofílicos; e
- O processo de encapsulação por fluido supercrítico é uma alternativa *green*, livre de resíduos orgânicos e não faz uso de temperaturas elevadas. Portanto, apresenta-se como uma opção promissora para a encapsulação de compostos voláteis.

### Quem já fez?

- A encapsulação de óleos essenciais pelo método de Extração por Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) não foi encontrada na literatura;
- Encapsulação do óleo de louro ou de seu composto majoritário (1,8-cineol), a partir da utilização de técnicas de alta e/ou ambiente pressões, também não foi encontrada na literatura; e
- O SFEE, método de alta pressão onde o CO<sub>2</sub> comporta-se como antissolvente, apresentou resultados promissores para a encapsulação de outros compostos ativos, como o β-caroteno, capsaicinoides e licopeno, utilizando o Hi-Cap (amido modificado) como agente de encapsulação, e a quercetina encapsulada em Pluronic L64 e lecitina.

### **Hipóteses**

- É possível encapsular o óleo essencial da folha de louro pelo processo SFEE, proporcionando uma maior proteção a essa matéria-prima, sem perdas significativas de seu componente majoritário (1,8-cineol)?
- As partículas obtidas por SFEE são livres de solvente orgânico e com eficiência de encapsulação satisfatória?
- As suspensões formadas pelo processo SFEE são estáveis? e
- As atividades antimicrobianas do óleo essencial da folha de louro permanecem ativas após a encapsulação em Hi-Cap pelo processo SFEE?

### **Como fazer?**

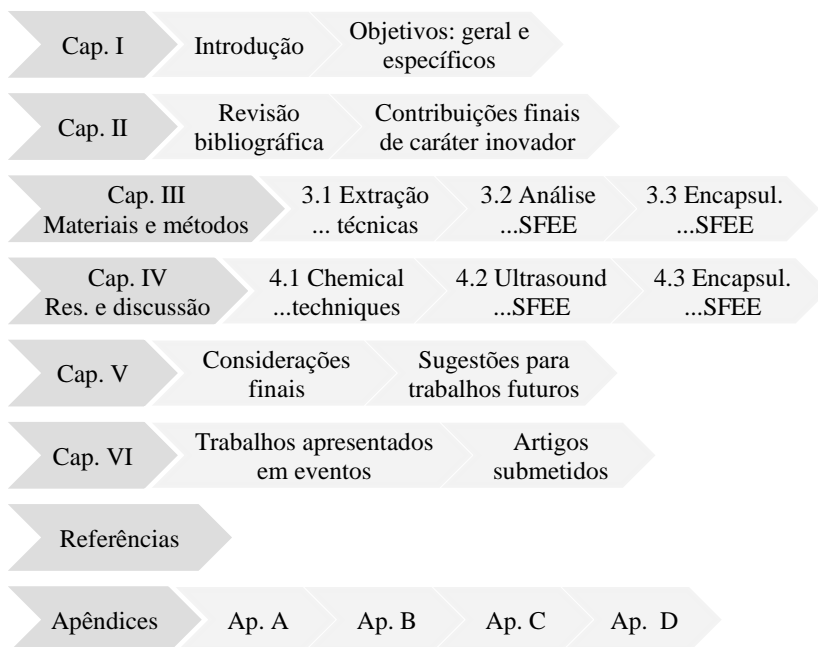
- Obter o óleo essencial da folha de louro pelo método de extração que forneça a maior concentração de 1,8-cineol no extrato;
- Formar emulsões estáveis do óleo essencial da folha de louro com Hi-Cap, por meio de sonda ultrassônica;
- Avaliar a influência das variáveis do processo SFEE com base nas respostas aos parâmetros de eficiência de encapsulação e no teor residual de solvente orgânico;
- Medir a estabilidade cinética das suspensões obtidas do processo SFEE;
- Verificar as propriedades morfológicas e térmicas das partículas, obtidas por SFEE, para conhecimento das suas características; e
- Testar a atividade antimicrobiana das partículas em micro-organismos.



## ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho de tese está organizado de acordo com a organograma abaixo (Figura I). O Capítulo I foi dedicado a uma introdução e aos objetivos do trabalho. No Capítulo II foi realizada uma breve revisão bibliográfica, finalizando-o com as considerações sobre o caráter inovador dos assuntos abordados nesta tese. O Capítulo III foi dividido em 3 seções com as descrições dos materiais e métodos de cada etapa experimental. Os resultados e discussão foram abordados no Capítulo IV, seguindo a divisão citada anteriormente. As considerações finais e sugestões para trabalhos futuros foram descritas no Capítulo V, enquanto que o Capítulo VI traz as produções científicas desenvolvidas ao longo do período do doutoramento. Por fim, houve a disponibilização das referências e dos apêndices com as informações suplementares à construção desta tese.

**Figura I:** Organograma do documento da tese.



## 1.1 INTRODUÇÃO

As folhas de louro, cujo nome científico é *Laurus nobilis* L., são comumente utilizadas no mundo como um agente aromatizante. O óleo essencial dessas folhas é constituído majoritariamente pelo 1,8-cineol, que, em sinergia com outros componentes presentes em menor quantidade, é o principal responsável pelo *flavour* e pelas atividades bioativas (SANTOYO et al., 2006; BANDONI; CZEPACK, 2008; SELLAMI et al., 2012).

Existe uma demanda mundial nas indústrias de processamento por produtos naturais, especialmente a de alimentos. No entanto, a maioria dos compostos é volátil, a exemplo dos aromas utilizados na indústria alimentícia (MARÓSTICA; PASTORE, 2007), o que acaba por dificultar a utilização dos óleos essenciais pelas diferentes indústrias. Em razão disso, a microencapsulação pode ser considerada uma alternativa capaz de proporcionar maior proteção aos componentes químicos dos óleos essenciais, evitando, assim, que ocorram oxidação e perdas nutricionais e de umidade, minimizando-se a degradação e a diminuição dos índices de qualidade dos óleos essenciais (AZEREDO et al., 2005).

Existem diversas técnicas de encapsulação que envolvem altas temperaturas ou evaporação, o que também facilita a perda dos componentes mais sensíveis. Por esse motivo, as técnicas de encapsulação por fluido supercrítico surgem como uma possibilidade promissora, já que são menos agressivas aos principais componentes presentes nos óleos essenciais e ao próprio meio ambiente. Dentre essas, optou-se pela Extração por Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE), que pode ser dividida em duas etapas para sua melhor compreensão: (1.) formação da emulsão e (2.) processo de encapsulação.

A encapsulação ocorre durante a precipitação do composto ativo, causada pela supersaturação do óleo essencial que, por sua vez, é atribuída à remoção do solvente orgânico pelo fluido supercrítico (SANTOS et al., 2012).

Para que o processo SFEE promova a encapsulação, a emulsão, que atua como veículo do composto ativo e do agente de encapsulação, pode ser obtida por meio da técnica de sonda ultrassônica. Por isso, fez-se necessário o estudo dos fatores que afetam a formação dessa nano/miniemulsão (KENTISH et al., 2008; TASCH HOLKEM et al., 2015). Além disso, o controle do tamanho das partículas obtidas pelo processo SFEE pode ser realizado por meio do tamanho das gotículas de

emulsão, sendo uma das vantagens dessa técnica (COCERO et al., 2009; MATTEA et al., 2009).

A encapsulação de um composto lipofílico em um agente de encapsulação hidrofílico, a exemplo do amido modificado (Hi-Cap), proporciona uma maior disponibilidade do óleo essencial, facilitando sua aplicação pelas diversas indústrias. O amido modificado é indicado para a encapsulação de *flavors*, vitaminas e especiarias, além de possuir uma boa resistência à oxidação e apresentar um menor custo (GHARSALLAOUI et al., 2007; MEZZOMO, 2012).

A viabilidade do processo SFEE pode ser avaliada pela eficiência da encapsulação do composto ativo e pela quantificação do solvente orgânico presente nas partículas. Com isso, as variáveis que indicam o comportamento do CO<sub>2</sub> supercrítico diante desses parâmetros necessitam ser estudadas, para que se promova a solubilidade necessária do solvente orgânico no CO<sub>2</sub> supercrítico e se minimizem os arrastes do composto ativo e do agente de encapsulação durante o processo SFEE (LÉVAI et al., 2015).

Os conhecimentos das propriedades morfológicas e do comportamento das partículas perante a degradação térmica conferem embasamento para a realização de alterações no processo de encapsulação, caso essas sejam necessárias, e para a melhoria de funções ou atendimento de especificações requeridas (DENARI; CAVALHEIRO, 2012). Além disso, tais conhecimentos têm sido utilizados como indicativo do processo de encapsulação.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi encapsular o óleo essencial da folha de louro em Hi-Cap (amido modificado) pelo processo SFEE, visando a formação de partículas com quantidade significativa do composto ativo, livre de solvente orgânico e sem perda das atividades bioativas do óleo essencial. Por fim, cabe deixar registrado que este trabalho teve como pretensão adicional a valorização de uma matéria-prima comum no Brasil, a partir da utilização de uma proeminente tecnologia (a supercrítica).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Geral

Encapsulação do óleo essencial da folha de louro em Hi-Cap (amido modificado) pelo processo de extração por fluido supercrítico de emulsões (SFEE).

### 1.2.2 Específicos

- ✧ Obter extratos da folha de louro por diversos métodos, visando à identificação dos compostos químicos e a quantificação do 1,8- cineol, componente majoritário da folha de louro;
- ✧ Formar emulsões e analisar sua estabilidade por meio da mensuração do tamanho hidrodinâmico das gotículas da emulsão e do índice de polidispersividade, durante 24 h;
- ✧ Estudar os efeitos das variações da concentração do óleo essencial e do tempo de sonicação no tamanho hidrodinâmico das gotículas da emulsão;
- ✧ Compreender os efeitos da variação da concentração do óleo essencial da emulsão na eficiência de encapsulação do processo SFEE;
- ✧ Estudar os efeitos das variáveis (pressão e temperatura) do processo SFEE na eficiência de encapsulação e na remoção do solvente orgânico;
- ✧ Verificar a estabilidade cinética das suspensões oriundas do processo SFEE;
- ✧ Caracterizar as partículas obtidas por SFEE quanto aos aspectos morfológicos e quanto à sua resistência à degradação térmica; e
- ✧ Averiguar as atividades antimicrobianas das partículas obtidas por SFEE.

## CAPÍTULO II

## 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Folha de louro (*Laurus nobilis* L.)

A *Laurus nobilis* L. é uma árvore perene nativa da região do Mediterrâneo, cujas folhas secas são utilizadas como um tempero valioso, por agir como agente aromatizante na culinária e na indústria de alimentos (SANTOYO et al., 2006). É conhecida popularmente como louro ou loureiro e possui uma importância econômica local devido ao uso de suas folhas na culinária brasileira (ISHIMURA; TIVELLI; CAMARGO FILHO, 2013).

O maior exportador mundial de folhas de louro e tomilho é o Marrocos, com um mercado de US\$ 7 milhões, no ano de 2014, seguido pela Filipinas. Esse país forneceu ao Brasil 43,715 toneladas de folhas de louro (2014), correspondendo a um impacto de US\$ 117.510,00 na balança comercial (COMTRADE, 2016). No Brasil, os maiores fornecedores da folha de louro estão no estado de São Paulo, especialmente nas cidades de São Roque e Cotia, com forte comercialização no Entrepasto Terminal de São Paulo (ISHIMURA; TIVELLI; CAMARGO FILHO, 2013).

Da folha de louro pode-se extrair um óleo essencial que é caracterizado pela presença predominante do monoterpeno 1,8-cineol, com porcentagens que variam entre 31,4 a 56 % (m/m), ilustrado na Figura 2.1 (PINO; BORGES; RONCAL, 1993), além de outros compostos apreciáveis, como o linalol, transhidrato-sabinene,  $\alpha$ -terpinilo-etilo, metil eugenol, sabineno e eugenol (PINO; BORGES; RONCAL, 1993; FLAMINI et al., 2007).

**Figura 2.1:** Ilustração da extração do óleo essencial da folha de louro.



Fonte: a autora.

Dentro da categoria de óleos essenciais, produtos de perfumaria e toucador, tem-se a subcategoria de misturas de substâncias odoríferas e ou sápicas para as indústrias de alimentos e bebidas, formadas predominantemente por óleos essenciais. Segundo a RDC n. 02, de 15 de janeiro de 2007, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007), essas misturas de substâncias são definidas como aroma ou aromatizantes, com utilização no âmbito das indústrias de alimentos e bebidas para conferir e/ou intensificar o aroma/sabor.

No ano de 2015, o Brasil gastou US\$ 81 milhões com importações de misturas de substâncias odoríferas para as indústrias de alimentos e bebidas (COMTRADE, 2016). Tal dado demonstra o potencial do mercado brasileiro para a aplicação de óleos essenciais e sua importância estratégica para a economia nacional.

Portanto, estudos voltados para o melhoramento das características de qualidade dos óleos essenciais brasileiros são necessários para o desenvolvimento e consolidação das indústrias de extração desse produto ou que deles dependem.

### **2.1.2 Óleos essenciais**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, óleos essenciais são “produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)” e “podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados” (ANVISA, 2007). São originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e de fenilpropanóides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

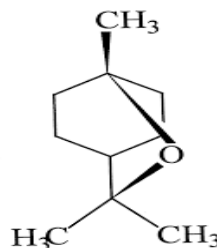
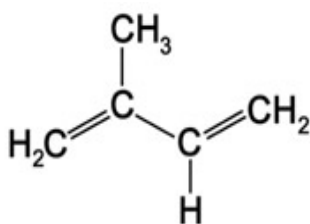
Estudos realizados por Sellami et al. (2012) detectaram a presença de quarenta e sete compostos no óleo essencial da folha de louro, especialmente de monoterpenos oxigenados, sendo que os principais componentes (1,8-cineol, metil eugenol, terpinen-4-ol, linalol e eugenol) sofrem variações em suas concentrações, devido ao método de extração ou ao método de secagem aplicado. Concluiu-se ainda que os melhores resultados, em termos de conteúdo de óleo essencial e seus compostos bioativos, foram conseguidos com a secagem natural em temperatura ambiente.

A diversidade funcional de componentes de óleos essenciais pode ser agrupada em duas séries majoritárias: aromática e terpênica. A série aromática é constituída por derivados do fenilpropano (C6-C3), enquanto

que na série terpênica, quantitativamente mais numerosa e qualitativamente mais variada, há predominância dos monoterpenos e dos sesquiterpenos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

Apesar da grande variedade de terpenos, todos são formados a partir de um pequeno hidrocarboneto, cujo nome canônico é 2-metilbuta-1,3-dieno, e que leva o nome trivial de isopreno, conforme demonstrando na Figura 2.2, item (a, na sequência. Os terpenos podem ser classificados quimicamente como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e sesquiterpenos. São substâncias presentes tanto em plantas quanto em animais, sendo descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas, incluindo as ações antimicrobiana, fungicida, antiviral, antihiperlipidêmica, anti-inflamatória e antiparasitária (PADUCH et al., 2007). O componente majoritário da folha de louro (1,8-cineol) é classificado como um monoterpeno bicíclico e sua fórmula estrutural pode ser vista na Figura 2.2, item (b).

**Figura 2.2:** a) Estrutura química do isopreno; b) estrutura química do 1,8-cineol.



b)

Fonte: <https://www.nist.gov/>.

Os monoterpenos são importantes constituintes dos óleos essenciais e altamente voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água, livres de outros componentes, e utilizados por suas características organolépticas marcantes (BANDONI; CZEPACK, 2008).

### 2.1.3 Métodos de extração, atividades e aplicações dos óleos essenciais

Os métodos mais utilizados para obtenção do óleo essencial são: extração por arraste a vapor e hidrodestilação (KOKETSU; GONÇALVES, 1991; LUQUE DE CASTRO; JIMÉNEZ-CARMONA; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 1999). Contudo, o óleo essencial também pode ser obtido por outros métodos de extração, como por solventes orgânicos, prensagem a frio, extração por alta pressão e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (OKOH; AFOLAYAN, 2011).

Os componentes químicos voláteis ou semivoláteis do óleo essencial são preferencialmente analisados por cromatografia gasosa (CG) devido ao grande poder de separação desta técnica, que permite separar compostos orgânicos com isomeria plana similar, isomeria óptica e homólogos com grande pureza (VILEGAS, 1997).

Na literatura pode-se encontrar trabalhos comparando as extrações convencionais (pressão ambiente) e supercrítica do óleo essencial da folha de louro, apresentados na Tabela 2.1.

Os óleos essenciais também são estudados devido às atividades provenientes da sua composição química. Segundo Azambuja (2009), no Brasil tem-se exemplos de aplicações dos óleos essenciais em diversas áreas:

1. Alimentícia, como fonte de substâncias químicas de atividades biológicas intensas e no controle fitopatogênico (ação fungitóxica) de defesa da planta;
2. Microencapsulação de óleo essencial, por exemplo de laranja, intensificando o *flavour* de balas e doces;
3. Cosméticos, na aromaterapia para tratamento de celulites, acnes, cabelos e perfumaria; e
4. Medicinal, devido às suas propriedades anticoncepcionais e rejuvenescedoras, para uso no tratamento de tireoidismo, aterosclerose e, ainda, no controle das alterações hormonais da gravidez.



**Tabela 2.1:** Métodos de extração, rendimento e composição química do óleo essencial da folha de louro.

Métodos de extração	Rendimentos	% dos Principais compostos químicos Identificação = GC/MS	Autores
Hydrodestilação	2,6 %	<b>1,8-cineol (49,7 %)</b> sabineno (5,6 %) acetato de $\alpha$ -terpinilo (5,3 %) $\alpha$ -pineno (4,5 %) $\beta$ -pineno (3,7 %)	
Arraste a vapor	1,9 %	<b>1,8-cineol (54,2 %)</b> acetato de $\alpha$ -terpinilo (7,6 %) butilbenzeno (5,2 %) $\alpha$ -pineno (3,0 %) sabineno (3,0 %) terpineol (2,4 %)	Ozek; Bozan; Baser (1998)
Supercrítica 80 bar/40 °C	1,34 %	<b>1,8-cineol (43,0 %)</b> hidrato trans-sabineno (10,3 %) acetato de $\alpha$ -terpinilo (10,8 %) álcool 4-isopropilbenzílico (3,1 %) hidrato cis-sabineno (2,9 %)	
Supercrítica 100 bar/50 °C	1,13 %	<b>1,8-cineol (40,2 %)</b> acetato de $\alpha$ -terpinilo (13,8 %) terpine-4-ol (3,3 %) $\alpha$ -terpineol (2,5 %) álcool 4-isopropilbenzílico (2,4 %)	

**Continuação da Tabela 2.1:** Métodos de extração, rendimento e composição química do óleo essencial da folha de louro.

		<b>1,8-cineol (22,84%)</b>	
Hidrodestilação	0,9 %	acetato de $\alpha$ -terpinilo (10,79 %) linalol (10,57 %) metileugenol (9,46 %)	Caredda et al. (2002)
Supercrítica: 1ª. Etapa: 90 bar/50 °C 2ª. Etapa: 150 bar/10 °C (separador)	0,82 %	<b>1,8-cineol (23,51%)</b> linalol (12,46 %) acetato de $\alpha$ -terpinilo (11,36 %) metileugenol (8,09 %)	
Supercrítica: 110 bar/40 °C	0,6 %	<b>1,8-cineol (24,84 %)</b> linalol (14,46 %) terpineol acetato (12,36 %) metil eugenol (10,09 %)	De Corato et al. (2010)
Hidrodestilação	1,43 %	<b>1,8-cineol (33,4 %)</b> linalol (16,0 %) acetato de $\alpha$ -terpinilo (13,8 %) sabineno (6,91 %) metil eugenol (5,32 %)	
Supercrítica: 100 bar/40 °C	1,37 %	<b>linoleato de metila (16,18 %)</b> acetato de $\alpha$ -terpinilo (12,88 %) linalol (9,0 %) eugenol de metila (8,67 %) araquidonato de metila (6,28 %) eugenol (6,14 %); <b>1,8- cineol (2,53 %)</b>	Ivanovic et al. (2010)

Estudos com as atividades dos óleos essenciais são relatados na literatura. Especificamente para o da folha de louro, em diferentes áreas de pesquisa, foram descritos na Tabela 2.2:

**Tabela 2.2:** Aplicações e atividades bioativas do óleo essencial da folha de louro.

<b>Atividades</b>	<b>Autores</b>
Antibacteriana	(CHMIT et al., 2014; DA SILVEIRA et al., 2014; DAMIANI et al., 2014; LUZZI, 2014; MERGHNI et al., 2016; VILELA et al., 2016)
Antifúngica	(PEIXOTO et al., 2017)
Inseticida	(JEMÃÇA et al., 2012)
Antioxidante	(OUCHIKH et al., 2011; DIAS et al., 2014)
Antiviral	(AURORI et al., 2016)
Aplicações alimentares	(AZAMBUJA, 2009; DA SILVEIRA et al., 2014; VILELA et al., 2016)

Óleos essenciais de louro e alecrim foram utilizados para preservação da deterioração em carne de hambúrguer armazenada em temperaturas de 2 e 8 °C. No comparativo, o óleo essencial de louro apresentou melhores resultados para manutenção da cor da carne vermelha e controle do pH nas amostras armazenadas a 2 °C (VILELA et al., 2016).

A atividade antibacteriana de óleo essencial de *Laurus nobilis* L. foi avaliada em linguiça toscana armazenada a 7 °C por 14 dias, demonstrando a capacidade de reduzir a população de coliformes totais e de aumentar a vida de prateleira do produto em mais 2 (dois) dias (DA SILVEIRA et al., 2014).

A encapsulação proporciona ao óleo essencial uma proteção aos seus componentes ativos, visto que são voláteis e sensíveis ao aquecimento, à luz ultravioleta (UV), à umidade e à oxidação. No entanto, técnicas de encapsulação que envolvem altas temperaturas ou evaporação do solvente também podem levar a perdas e à degradação dos óleos essenciais (GUPTA et al., 2016).

### **2.1.4 Formação de nano/micropartículas**

A nano/microencapsulação é definida como um processo em que pequenas partículas ou gotículas de um (ou mais de um) ingrediente ativo, como exemplo as gotículas do óleo essencial de louro, são cercadas por um revestimento ou incorporadas em uma matriz homogênea ou heterogênea, para se obter pequenas partículas com muitas propriedades

úteis (AZEREDO et al., 2005; SAGALOWICZ; LESER, 2010; WANDREY; BARTKOWIAK; HARDING, 2010; TYAGI et al., 2011).

O termo micro e nano partículas é genérico, sendo utilizado de acordo com o tamanho da partícula a que se refere. A terminologia recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) abrange as seguintes expressões: macropartículas (1 a 100  $\mu\text{m}$ ), micropartículas (0,1 a 1  $\mu\text{m}$ ) e nanopartículas (1 a 100 nm) (SLOMKOWSKI et al., 2011).

Em termos de forma e construção, as partículas podem ser divididas em dois grupos: microcápsulas, onde o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do agente de encapsulação; e microesferas, na qual o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz (AZEREDO et al., 2005).

Dentre os motivos para a microencapsulação na indústria de alimentos, podem-se citar: (i) a redução da reatividade do material de núcleo com o ambiente; (ii) a diminuição da velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o meio; (iii) a facilitação da manipulação do material encapsulado; (iv) a promoção da liberação controlada; (v) a capacidade de mascarar sabor e odor desagradáveis; e, ainda, (vi) o de promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia. (SHAHIDI; HAN, 1993).

Existem diversos tipos de materiais de parede (neste trabalho foi utilizado o termo agente de encapsulação), naturais e sintéticos (monômeros e/ou polímeros), porém poucos possuem aprovação para uso na indústria de alimentos. Pode-se mencionar como exemplos de agente de encapsulação que se destacam os carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas, sacarose, celulose e quitosana), as gomas (goma arábica, alginato e carragena), os lipídios (cera, parafina, monoglicéridios e diglicéridios, óleos e gorduras hidrogenados), materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos) e, ainda, as proteínas (glúten, caseína, gelatina e albumina) (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; SILVA; ROSA; MEIRELES, 2015).

A encapsulação de um composto lipofílico, como o óleo essencial da folha de louro, em um agente de encapsulação hidrofílico, tem como principal vantagem torná-lo disponível em meio polar, facilitando sua aplicação pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e química. Além disso, limita a degradação ou perda dos compostos bioativos causada pelo ambiente e por etapas do processamento até o momento do consumo final (GUPTA et al., 2016).

Amido modificado (Hi-Cap 100) é um anidrido succínico de n-octenilo (OSA) derivado do milho ceroso e especialmente adequado para

a encapsulação de aromas, vitaminas e especiarias. Caracteriza-se também por sua excelente resistência à oxidação, pelo menor custo e por atuar como substituto da goma arábica e da gelatina (MEZZOMO et al., 2012). É amplamente utilizado como geleificante, espessante, agente estabilizante e preenchimento em alimentos preparados (GALANAKIS; TORNERG; GEKAS, 2010; JAVANMARD et al., 2012).

Asbahani et al. (2015) relataram que métodos utilizados na encapsulação de óleos essenciais (convencionais ou inovadores) que envolvem aquecimento ou uma etapa de evaporação têm como desvantagem a grande perda de óleos essenciais, como exemplo a secagem por pulverização (spray drying), considerado um dos métodos convencionais mais utilizado pela indústria de alimentos (GHARSALLAOUI et al., 2007). Por outro lado, a encapsulação pode proporcionar muitas vantagens, a exemplo de proteções contra a degradação causada por luz UV ou altas temperaturas e, ainda, contra a oxidação, que tendem a comprometer a atividade bioativa dos óleos essenciais, naturalmente sensíveis.

A evaporação de emulsões é um dos métodos a pressão ambiente mais difundido e consiste na produção de uma emulsão óleo-água (O/W) na qual o solvente orgânico é removido por evaporação. Neste método é possível controlar o tamanho das partículas com as propriedades da emulsão, porém a produção de bolhas de gás durante a evaporação do solvente pode romper a estrutura da emulsão, resultando em baixa eficiência de encapsulação (DE PAZ et al., 2012).

Para superar as desvantagens dos métodos convencionais, como a utilização de consideráveis quantidades de solventes orgânicos, as formações de grandes partículas e de resíduos de solventes, e para abrir espaço à utilização de solventes ambientalmente seguros e de baixo custo (em especial o CO<sub>2</sub> supercrítico), processos com fluidos supercríticos surgem como uma alternativa viável para a encapsulação de substâncias naturais. Graças à sua baixa temperatura crítica (31,1°C), por exemplo, o CO<sub>2</sub> pode ser utilizado para encapsulação de compostos termicamente sensíveis, como os óleos essenciais (COCERO et al., 2009; SANTOS et al., 2012; YIM; KIM; LIM, 2013).

A formação de nano/micropartículas por técnicas supercríticas tem como vantagens: boa distribuição de tamanho de partículas; boa eficiência de encapsulação; alta pureza dos produtos; controle do polimorfismo dos cristais; possibilidade de processar moléculas termossensíveis; processo de um único estágio; formação de nano ou micropartículas; e ser uma tecnologia ambientalmente aceitável (FAGES et al., 2004; BOSCHETTO et al., 2013).

Os métodos de encapsulação supercrítica podem ser divididos de acordo com o comportamento do fluido supercrítico no processo: solvente, antissolvente ou soluto (JUNG; PERRUT, 2001; MARTÍN; COCERO, 2008; MATTEA et al., 2009). Neste trabalho, a formação de partículas foi realizada pelo método de Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE), onde o CO<sub>2</sub> supercrítico comporta-se como antissolvente.

Chattopadhyay; Huff; Shekunov (2006) utilizaram a Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões como um novo método para a encapsulação das drogas indometacina e cetoprofeno, usando como agente de encapsulação os polímeros biodegradáveis ácido poli (lático/glicólico) e Eudragit RS.

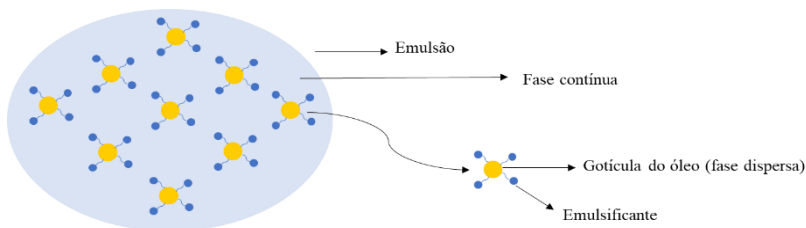
Mattea et al. (2009) propuseram o método SFEE como uma variação do processo SAS, chamado de SAS de emulsões, o qual é constituído por uma fase orgânica (solvente orgânico + composto ativo) e uma fase dispersa ou contínua (água + material de parede), que são estabilizadas por um emulsificante/surfactante. Na sequência, a emulsão entra em contato com o CO<sub>2</sub> supercrítico, que extrai o solvente orgânico, agindo como um antissolvente, e libera o composto ativo encapsulado em suspensão (COCERO et al., 2009; MATTEA et al., 2009).

Esse método apresenta como principal vantagem a possibilidade de controlar o tamanho das partículas por meio da variação de parâmetros que influencia diretamente no tamanho final das gotículas da emulsão (COCERO et al., 2009). Pode-se compreender o processo SFEE em duas etapas: pela formação da emulsão e pelo processo de encapsulação por fluido supercrítico.

#### *2.1.4.1 Formação da emulsão*

Emulsões são definidas como um sistema heterogêneo de pelo menos dois líquidos imiscíveis, constituído de uma fase chamada de contínua e outra de dispersa. A fase dispersa encontra-se distribuída em forma de gotículas no seio da fase contínua. Os diâmetros das gotículas que constituem a fase dispersa variam geralmente de 10 nm a 100 µm, aproximadamente (SLOMKOWSKI et al., 2011). De forma geral, o sistema precisa de agentes emulsificantes ou surfactantes para estabilizar-se, os quais exercem duas funções básicas: a primeira delas é diminuir a tensão interfacial, favorecendo a formação da emulsão, e a segunda evitar a coalescência da fase dispersa, conforme demonstra a Figura 2.3 (BRASIL et al., 2014).

**Figura 2.3:** Representação de uma emulsão óleo em água (O/W).



Fonte: a autora.

As emulsões óleo em água (O/W) são sistemas coloidais amplamente aplicados na encapsulação, solubilização e liberação controlada de compostos bioativos. A aplicação da técnica de ultrassom para a formação de emulsões proporciona grandes vantagens em relação a outras técnicas, principalmente devido à eficiência energética, ao baixo custo de produção, à facilidade de manipulação do sistema e ao melhor controle sobre as variáveis do ultrassom (SILVA et al., 2016).

A formação da emulsão O/W por ultrassom ocorre devido à cavitação. Durante esse processo as bolhas podem colapsar perto da interface dos dois líquidos e o choque resultar em uma mistura eficiente das duas camadas. Posteriormente, podem ser obtidas emulsões muito finas e altamente estáveis, com uma entrada de energia ultrassônica relativamente baixa (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Trabalhos encontrados na literatura afirmam que, dentre os parâmetros que afetam a eficiência da cavitação na formação de emulsão, por sonda ultrassônica, estão o tempo de sonicação (KENTISH et al., 2008), a concentração do emulsificante (KENTISH et al., 2008; AGUIAR et al., 2016a), a relação óleo/água (LEONG et al., 2009; AGUIAR et al., 2016a), a energia de sonicação (SILVA; ROSA; MEIRELES, 2015; AGUIAR et al., 2016a) e as propriedades físico-químicas do óleo (composto ativo deste trabalho) (MAHDI JAFARI; HE; BHANDARI, 2006; KENTISH et al., 2008; LEONG et al., 2009).

Os efeitos do tempo de sonicação e da concentração da fase dispersa na estabilidade das emulsões foram estudados neste trabalho. Os parâmetros utilizados como indicativos da formação e estabilidade das emulsões foram o tamanho das gotículas e o índice de polidispersividade. Tal índice revela a qualidade da dispersão, variando de 0,1 até 1,0.

Valores baixos indicam uma pequena distribuição ou maior qualidade, enquanto que valores próximos de 1,0 são obtidos para amostras de baixa qualidade, ou seja, sistemas polidispersos (JAFARI et al., 2008).

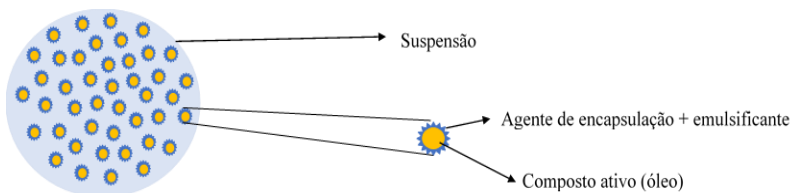
Emulsões com gotas menores implicam maior viscosidade, visto que gotas pequenas apresentam uma alta área superficial por unidade de volume quando comparadas às gotas maiores, tornando as emulsões mais homogêneas (MCCLEMENTS, 2003). Distribuições mais polidispersas resultam em emulsões menos viscosas e, como consequência da redução da viscosidade, ocorre a transferência de massa das gotas menores para as maiores (fenômeno Ostwald ripening), pois em sistemas polidispersos as gotas pequenas preenchem o espaço deixado pelas gotas grandes, favorecendo a junção dessas gotas, contribuindo para a instabilidade da emulsão (BROZE, 1999; MAHDI JAFARI; HE; BHANDARI, 2006).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e, por isto, o uso de emulsificante/surfactante/tensoativo é necessário para estabilizar a fase dispersa e prevenir a separação de fases. Dentre os emulsificantes tem-se os não iônicos, que vêm sendo utilizado cada vez mais e representam mais de 25 % da produção mundial, a exemplo do monooleato de polioxietileno sorbitan (Tween 80), escolhido por este trabalho (FRANZOL; REZENDE, 2015).

Emulsificantes não iônicos não se dissociam em íons em solução aquosa, por isso atraem as moléculas da água de forma tênue (DALVIN, 2011). Estudos a respeito indicam que a concentração mais adequada para esse emulsificante encontra-se em torno 3 % e 5 % em massa, não sendo o aumento da concentração do emulsificante uma garantia de diminuição do tamanho dos glóbulos (FRANZOL; REZENDE, 2015).

Na encapsulação pelo processo SFEE, o solvente orgânico presente na fase dispersa da emulsão é removido pelo CO<sub>2</sub> supercrítico, formando uma suspensão como produto final, ilustrada na Figura 2.4 (MATTEA et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

**Figura 2.4:** Representação da suspensão após o processo SFEE.



Fonte: a autora.



Os estudos publicados indicam que o tamanho das partículas na suspensão, formadas pelo processo SFEE, depende do tamanho das gotículas da emulsão (CHATTOPADHYAY; HUFF; SHEKUNOV, 2006; COCERO et al., 2009; MATTEA et al., 2009) . Por isso, é necessário que na formação da emulsão que será utilizada no SFEE, o tamanho das gotículas seja reduzido ao parâmetro desejado.

Além disso, é necessário garantir que a emulsão esteja estável para ser submetida ao processo SFEE, pois é possível que a dissolução do CO<sub>2</sub> supercrítico na fase dispersa reduza a estabilidade da emulsão. Por isso a avaliação dos efeitos causados pelo comportamento do fluido supercrítico é importante para a otimização do processo de SFEE (COCERO et al., 2009).

#### *2.1.4.2 Encapsulação por SFEE*

Como dito, no processo de encapsulação por SFEE, o CO<sub>2</sub> supercrítico comporta-se como antissolvente, removendo o solvente orgânico da emulsão. Por isso, para que o processo SFEE seja eficiente, é necessário que o solvente orgânico seja miscível no fluido supercrítico, enquanto que o composto ativo e a água, juntamente com o agente de encapsulação, sejam insolúveis ou pouco solúveis no fluido supercrítico (MATTEA et al., 2009; LUTHER; BRAEUER, 2012; AGUIAR et al., 2016a).

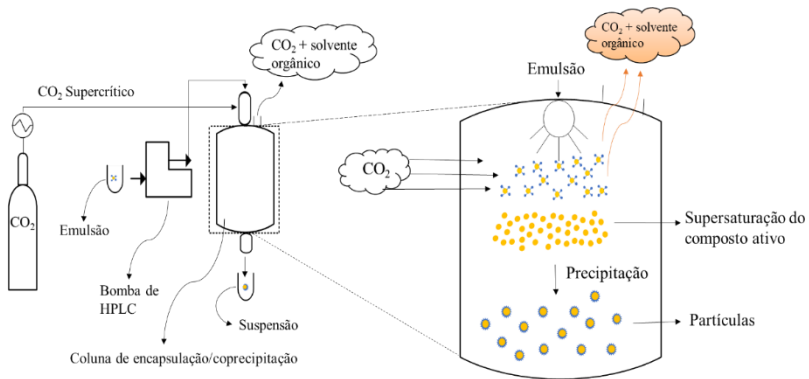
Devido à diferença de solubilidade, o fluido supercrítico extrai por afinidade química o solvente orgânico da emulsão, levando a uma rápida supersaturação do composto ativo e, portanto, a uma rápida precipitação (CHATTOPADHYAY; HUFF; SHEKUNOV, 2006; LÉVAI et al., 2015). Nesse momento, o emulsificante facilita a interação entre o agente de encapsulação e o composto ativo, ocasião em que a encapsulação ou coprecipitação é efetivada, conforme ilustrado na Figura 2.5.

As variáveis do processo SFEE, como pressão e temperatura, estão relacionadas com a capacidade de eliminar o solvente orgânico da emulsão, não desestabilizando o sistema e carreando o mínimo do composto ativo e do agente de encapsulação (MATTEA et al., 2009; AGUIAR et al., 2016a).

A vazão do fluido supercrítico precisa ser o suficiente apenas para saturá-lo com o solvente orgânico, impedindo a remoção do composto ativo que se pretende encapsular. Por outro lado, é necessário minimizar, ao máximo, o teor residual do solvente orgânico. A adequada remoção do solvente orgânico pelo fluido supercrítico, portanto, sofre influência dos

mecanismos de transferência de massa e de equilíbrio de fase (AGUIAR et al., 2016a).

**Figura 2.5:** Ilustração da encapsulação/coprecipitação por SFEE.



Fonte: a autora.

Estudos de equilíbrio de fase entre o fluido supercrítico e o solvente orgânico, como também sobre a solubilidade do composto ativo que se pretende encapsular no fluido supercrítico, garantem que os parâmetros determinados para o processo SFEE, como a temperatura e a pressão, facilitem a solubilidade do solvente orgânico no fluido supercrítico (antissolvente) sem favorecer o arraste do composto ativo (AGUIAR et al., 2016a).

Mattea et al. (2009) observaram o inchamento das gotículas durante a dissolução do CO<sub>2</sub> supercrítico no solvente orgânico e, ainda, que várias partículas pequenas foram produzidas dentro das partículas formadas. Com isso, esses autores propuseram a divisão do processo em duas etapas como estratégia para diminuir a desestabilização da emulsão causada pelo processo SFEE.

O primeiro passo envolve o contato entre a emulsão e o CO<sub>2</sub> para assegurar a saturação da fase dispersa, a fim de obter a precipitação por efeito antissolvente. Um segundo passo proporciona um contato prolongado entre o CO<sub>2</sub> e a emulsão, a fim de eliminar o solvente orgânico remanescente. Este passo pode ser mais lento do que o primeiro, porque uma vez formadas as partículas, a desestabilização da emulsão deixa de ser um problema (MATTEA et al., 2009).

Além da vantagem de modificar o tamanho das partículas por meio do tamanho das gotículas da emulsão, o processo SFEE tanto evita a

exposição do produto a altas temperaturas durante períodos prolongados, quanto diminui a concentração de solventes orgânicos residuais no produto pela alta solubilidade desses últimos em fluidos supercríticos (MATTEA et al., 2009).

Em comparação com a técnica de evaporação de emulsões (descrita na seção 2.1.4), o processo SFEE é capaz de remover o solvente orgânico por uma extração sem transição de fase; evitar a formação de bolhas de gás do solvente orgânico; aumentar a eficiência de encapsulação; e promover a formação de partículas submicrométricas (SANTOS et al., 2012).

Trabalhos anteriores de compostos encapsulados por SFEE, com composto ativo de interesse na indústria de alimentos, foram encontrados na literatura, conforme Tabela 2.3 e 2.4. Um artigo de revisão cita apenas os trabalhos de Mattea et al. (2009) e Santos et al. (2012), como exemplos de encapsulação de ingredientes alimentares pelo método SFEE (FATHI; MARTÍN; CLEMENTS, 2014).

Saldaña, Coimbra e Cardozo-Filho (2015) realizaram uma revisão sobre recuperação, encapsulação e estabilização de bioativos dos resíduos de alimentos utilizando alta pressão, citando o trabalho de Lévai et al. (2016) como único exemplo de encapsulamento pelo método SFEE.

Existem diversos trabalhos com estudos sobre as atividades bioativas do óleo essencial da folha de louro, descritos na Tabela 2.2. Contudo, não foram encontrados trabalhos de encapsulação do óleo essencial da folha de louro, seja pelo método convencional, seja pelo método supercrítico.

**Tabela 2.3:** Parâmetros de processo e compostos químicos encapsulados por SFEE.

<sup>(1)</sup> T/ (°C)	Variáveis do processo SFEE				Solvente orgânico	Composto ativo	Agente de encapsulação	Autores
	<sup>(2)</sup> P/ (bar)	<sup>(3)</sup> V <sub>(em)</sub>	<sup>(4)</sup> V <sub>(CO<sub>2</sub>)</sub>	<sup>(5)</sup> ts (min)				
40	90 a 110	0,5 e 1 mL/min	22,5 g/min	30	Acetato de etila	Capsaicinoides	Hi-Cap	Aguiar et al. (2016a)
40	110	batelada		496 a 581	Acetato de etila	Quercetina	Pluronic L64 e lecitina	Lévai et al. (2016)
50	90 a 130	2,5 a 5,5 cm <sup>3</sup> /min	10 kg/h	10	DCM	β-caroteno e licopeno	Hi-Cap	Santos et al. (2012)
40	100	4 mL/min	4 kg/h	15	DCM	Carotenoides	Hi-Cap	Mezzomo et al. (2012)
35 a 50	80 a 130	0,3 a 1 kg/h	2 a 4 kg/h	180	DCM	β-caroteno	Hi-Cap	Mattea et al. (2009)
35 a 55	80 a 150	1	10		Acetato de etila	Indometacina e cetoprofeno	PVA PLGA e Eudragit RS	Chattopadhyay P., Huff R., Shekunov B. Y (2006)

<sup>(1)</sup>T: temperatura; <sup>(2)</sup>P: pressão; <sup>(3)</sup>V<sub>(em)</sub>: vazão da emulsão; <sup>(4)</sup>V<sub>(CO<sub>2</sub>)</sub>: vazão do CO<sub>2</sub>; <sup>(5)</sup>ts: tempo de secagem (2ª. etapa do SFEE).

**Tabela 2.4:** Características das partículas obtidas por SFEE.

Tamanho das partículas	Resíduo do solvente/(ppm)	Técnica da <sup>(1)</sup> EE	<sup>(1)</sup> EE (%)	Método de secagem	Autores
126 a 137 nm	< 5900 a 24100	HPLC	21,53 a 39,98 Suspensão	liofilização	Aguiar et al. (2016a)
3,4 a 1,1 µm	14 a 200	UV-VIS	70 a 65,7 Suspensão	-	Lévai et al. (2016)
344 a 366 nm	< 10	UV-VIS	89,0 a 34,0 Suspensão	atomização	Santos et al. (2012)
0,8 a 7 mm Pó	-	HPLC	93 Pó	liofilização	Mezzomo et al. (2012)
400 nm	< 10	-	-	liofilização	Mattea et al. (2009)
0,1 a 2,0 µm	< 50	-	-	-	Chattopadhyay P., Huff R., Shekunov B. Y (2006)

<sup>(1)</sup>EE: eficiência de encapsulação.

## 2.1.5 Caracterização das partículas

A caracterização das partículas dá embasamento para a realização de alterações no processo de encapsulação, caso seja necessário, para aperfeiçoamento de funções ou atendimento de especificações requeridas. Além disso, fornecem informações sobre a existência ou não de interações entre o composto ativo e o agente de encapsulação (MATTEA et al., 2009).

A estabilidade das suspensões, tamanho e distribuição das nano/micropartículas, mudanças na cristalinidade, nas massas moleculares, morfologia, porosidade, temperaturas de fusão, de ebulição e de transição vítrea, como também as temperaturas de degradação, são utilizadas para indicarem as especificidades de nano/micropartículas formadas por meio da encapsulação.

### 2.1.5.1 Estabilidade das suspensões

Suspensões são sistemas coloidais formados por uma fase dispersa (partículas) e uma fase contínua, denominada meio de dispersão (aquosa). A agregação entre as partículas constitui um dos pontos críticos no estudo do comportamento e da estabilidade das suspensões (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Partículas finas, como as nano e/ou micropartículas, possuem uma grande relação área superficial/volume e, por isso, facilmente se aglomeram para formar partículas secundárias com o objetivo de reduzir sua área superficial total e, conseqüentemente, minimizar a tensão superficial do sistema (CAO, 2004). Essas partículas se movimentam de forma rápida e aleatória em meio líquido, devido ao impacto das moléculas do líquido (água) contra as partículas (encapsulado), cujo movimento é denominado browniano. Quanto menor o diâmetro da partícula, maior o movimento browniano, aumentando-se a probabilidade de ocorrência de choques entre as partículas (DALTIM, 2011).

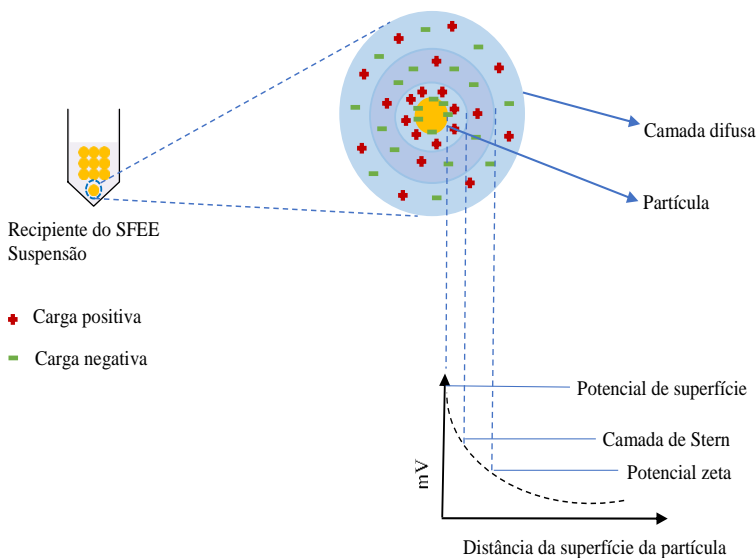
Para que as suspensões sejam estáveis, as forças de repulsão entre as partículas devem ter intensidade e alcance suficientes para superar as forças de atração (forças de van der Waals) entre as partículas. As forças de van der Waals são exclusivamente de atração. A redução dessa interação ou a sua anulação pode ser conseguida pela repulsão eletrostática ou pela manutenção da distância entre as partículas (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Os fenômenos de atração e repulsão entre partículas dispersas em um sistema coloidal podem ser compreendidos por dois mecanismos: 1)

estabilização eletrostática (forças de repulsão eletrostática) e 2) estabilização estérica (adsorção de polímeros) ou, ainda, pela combinação desses dois mecanismos (ORTEGA et al., 1997).

As partículas adquirem cargas elétricas na superfície, quando expostas ao contato com o solvente polar, por dissociação dos grupos químicos presentes na superfície da partícula (estabilização eletrostática) ou adsorção de polímeros (estabilização estérica). Sendo negativa a superfície da partícula, como ilustrado na Figura 2.6, há acúmulo de íons positivos na região da interface partícula-líquido, formando a Camada de Stern. Íons negativos aproximam-se da Camada de Stern e, atraindo íons positivos, formam a camada difusa, onde a concentração de íons é menor. Esse modelo é chamado de dupla camada elétrica, explicado pela teoria do DLVO, desenvolvida independentemente por Derjaguin e Landau e Verwey e Overbeek, no final da década de 40 (JUNIOR; VARANDA, 1999; KAUPPI; ANDERSSON; BERGSTR, 2005; DALTIM, 2011).

**Figura 2.6:** Representação da dupla camada elétrica em relação ao potencial zeta em uma suspensão.



Fonte: a autora baseada em Junior; Varanda (1999) e CaO (2004).

Stern afirmou que há uma distância mínima entre a superfície da partícula e os íons de carga contrária, na qual o potencial elétrico decresce linearmente; em seguida, a diminuição do potencial decai exponencialmente com a distância, passando pela fronteira das camadas de Stern e difusa, região em que o potencial elétrico é chamado de Potencial Zeta (PZ) (DALTIM, 2011). Valores de PZ em (+/-) 25 mV, em valor absoluto e à temperatura ambiente, são geralmente associados a uma suspensão estabilizada eletrostaticamente (MIRHOSSEINI et al., 2008).

A estabilização estérica é consequência da adsorção de polímeros sobre a superfície das partículas, formando uma espécie de capa protetora ao redor delas. Assim, as partículas são mecanicamente impedidas de se aproximarem suficientemente para que entrem no campo de atuação das forças de van der Waals, evitando a aglomeração. É dessa forma que atuam os tensoativos não iônicos e os polímeros em suspensões que possuem cadeias longas e que estão radialmente na superfície das partículas (HOTZA, 1997; ORTEGA et al., 1997; DALTIM, 2011).

A junção dos mecanismos de estabilização eletrostática e estérica é chamada de estabilização eletroestérica. E a magnitude de cada mecanismo depende de diversos parâmetros, como a quantidade de polímero adsorvido na partícula e do grau de dissociação dos grupos químicos (KAUPPI; ANDERSSON; BERGSTR, 2005).

Na prática, a energia de repulsão entre as partículas não garante a estabilidade dessas, principalmente por longos períodos de tempo (JUNIOR; VARANDA, 1999). Além disso, estudos sobre a estabilidade de suspensões, obtidas por SFEE, não foram encontrados dentre os trabalhos apresentados na Tabela 2.4. Por isso, este trabalho também tem como proposta uma avaliação da estabilidade dessas suspensões.

### *2.1.5.2 Propriedades morfológicas e de tamanho das partículas*

A análise morfológica tem sido amplamente utilizada para caracterizar a forma e o tamanho das partículas. Encapsulados têm apresentado características morfológicas semelhantes ao agente de encapsulação que, no caso deste trabalho, foi o amido modificado (Hi-Cap 100).

O amido modificado possui uma região cristalina que está relacionada à dupla hélice da amilopectina, enquanto que a região amorfa, proporcionalmente dominante, pode ser atribuída à amilose (ZOBEL, 1988). Enquanto um sólido cristalino é marcado pela existência de arranjos ordenados e periódicos entre os átomos, formando estruturas periódicas tridimensionais, os amorfos são formados por arranjos



atômicos aleatórios e sem simetria ou ordenação de longo alcance (ASTRATH, 2006).

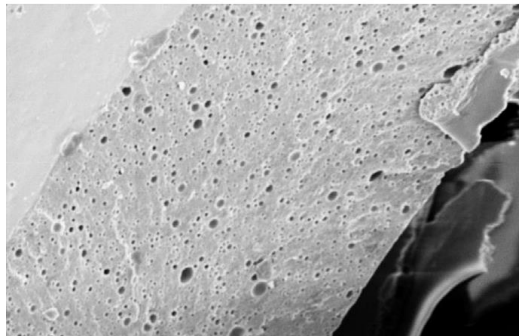
Carotenoides, capsacinoídes e licopeno encapsulados por SFEE em amido modificado apresentaram características de um sólido amorfo, que foram associadas à amilose do agente de encapsulação (SANTOS et al., 2012; DE PAZ et al., 2013; AGUIAR et al., 2016a). Encapsulados em estado amorfo possuem uma dissolução mais rápida, porém não são fisicamente estáveis, sendo necessário a utilização de técnicas para evitar a agregação durante o período de vida útil (ALVES et al., 2012).

Trabalhos encontrados na literatura relataram a morfologia das partículas formadas pela encapsulação em amido modificado por SFEE. Essas possuem formato esférico, ovalado ou folheado, com superfície porosa, crescimento e diferentes tamanhos após o processo de secagem das suspensões, conforme Figura 2.7. O aumento do tamanho da partícula durante a secagem pode ser atribuído à precipitação de amido sobre as mesmas (MEZZOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2012; DE PAZ et al., 2013; AGUIAR et al., 2016a).

O crescimento das partículas também pode estar associado à técnica de secagem. Durante o processo de liofilização ocorre um maior contato das partículas durante o congelamento (estado sólido) e, em alguns casos, elas podem se fundir. A quebra e modificações na morfologia das partículas podem ocorrer devido a baixas temperaturas empregadas para o congelamento das mesmas e, também, pela formação de cristais de gelo, que podem provocar um estresse mecânico na partícula, sendo necessária a adição de crioprotetores antes da liofilização, para conferirem proteção durante o congelamento das amostras (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006).

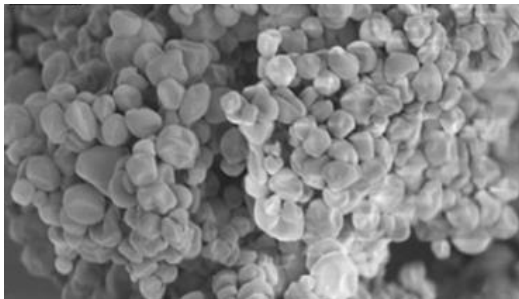
**Figura 2.7:** Características da estrutura morfológica do amido modificado.**Aspectos****Estrutura do amido modificado****Autores**

Poros e crescimento da partícula após secagem.



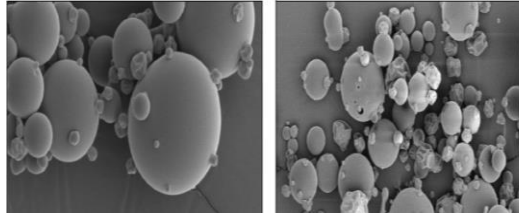
(SANTOS et al., 2012)

Formato esférico, diferentes tamanhos e crescimento após secagem.



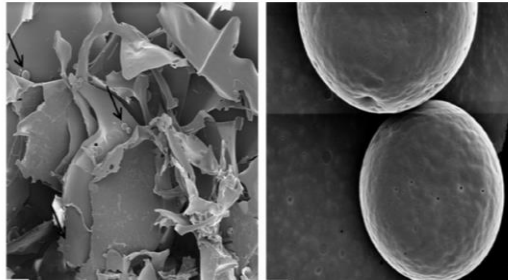
(MEZZOMO et al., 2012)

Formato esférico, tamanhos diversos e presença de poros.



(DE PAZ et al., 2013)

Formatos diferentes (esférico e folheado) e presença de poros.



(AGUIAR et al., 2016a)

---

### *2.1.5.3 Propriedades térmicas das partículas*

O conhecimento das propriedades térmicas pode levar a melhorias nos processos de conservação, transporte, absorção e a diversas aplicações das partículas. Informações sobre a decomposição são úteis para saber quais produtos são voláteis e/ou sobre os resíduos gerados, em relação à sua ação biológica ou ambiental (DENARI; CAVALHEIRO, 2012). Além disso, as propriedades térmicas (pontos de fusão, ebulição e decomposição) das partículas são utilizadas como características que diferenciam o encapsulado (partícula) do composto ativo e do agente de encapsulação, visto que são propriedades intensivas da matéria.

Na literatura foram encontrados diversos trabalhos com informações sobre as propriedades térmicas do amido, como a faixa de temperatura de gelatinização, picos endotérmicos, característicos do ponto de fusão, e exotérmicos, característicos da degradação, com valores dependentes do teor de amilose e amilopectina (FORTE; OLIVEIRA, 2009; WEBER; QUEIROZ; CHANG, 2009; IURCKEVICZ, 2014; CLARINDO, 2015).

O amido modificado utilizado para encapsulação por SFEE do  $\beta$ -caroteno apresentou dois eventos endotérmicos, típicos de polissacarídeos, nas faixas de temperatura de 87 e 225 °C (DE PAZ et al., 2013; DE SOUZA et al., 2015). Já o 1,8-cineol, componente majoritário da folha de louro, possui ponto de fusão em 1,5 °C e ponto de ebulição em 174 °C bem definidos, característicos de compostos cristalinos (COTTON, 2010).

Valores da temperatura inicial de decomposição térmica são importantes à medida que indicam o limite máximo da temperatura de processo ou manufatura térmica de materiais. Estudos sobre a degradação térmica do amido de milho indicaram a existência de 3 etapas de perda de massa. A primeira delas referente à saída de água, em aproximadamente 44 °C, e as demais relativas à degradação do polissacarídeo, em aproximadamente 278 °C e 308 °C (LIMA et al., 2012).

O conhecimento das características das partículas proporciona uma melhor compreensão do processo de encapsulação, dando embasamento para a determinação de parâmetros e especificidades desejadas para uma adequada aplicação das partículas.

## 2.2 CONTRIBUIÇÕES FINAIS DE CARÁTER INOVADOR

Os óleos essenciais, dentre eles o da folha de louro, possuem grande importância econômica, sendo utilizados nas indústrias de perfumaria, cosméticos, alimentos, química e farmacêutica (TRANCOSO et al., 2017). Apesar do uso de óleos essenciais por diversos segmentos, a produção e consumo no Brasil ainda estão fortemente concentrados na indústria de cosméticos, onde o faturamento passou de R\$ 4,9 bilhões (1996) para R\$ 42,6 bilhões em 2015 (ABIHPEC, 2016).

Segundo a base de dados americana United Nations Commodity Trade Statistics Database, o Brasil também é destaque na exportação de óleos essenciais, ocupando a 3ª. posição mundial, com faturamento de US\$ 164 milhões, perdendo apenas para os Estados Unidos e a Índia (COMTRADE, 2016). Porém, apesar da relevância dessa matéria-prima para o mercado brasileiro, há problemas crônicos de produção, como a falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos essenciais, a falta de representatividade nacional e os baixos investimentos governamentais no setor (SOUZA et al., 2010). De maneira geral, as exportações do Brasil são marcadas pelo grande volume, pela competitividade dos preços de mercado e pelo pouco valor agregado, refletindo a baixa adição de tecnologia (FERRAZ et al., 2009).

A encapsulação de óleos essenciais, como o proveniente da folha de louro, pode ser uma opção tecnológica para a valorização e aumento da qualidade do produto, pois protege seus componentes ativos de fatores externos como luz, aquecimento, umidade e oxidação, preservando suas características por um maior tempo. Além disso, permite o uso de agentes de encapsulação hidrofílicos, proporcionando uma maior disponibilidade dos óleos essenciais em meios aquosos e facilitando sua aplicação (GUPTA et al., 2016).

O uso de técnicas de encapsulação não térmicas, a exemplo da tecnologia supercrítica, é uma alternativa atrativa quando se considera que os óleos essenciais são compostos voláteis/sensíveis e que sofrem perdas significativas dos seus componentes bioativos durante a encapsulação pelas técnicas tradicionais.

A encapsulação pela técnica de Extração por Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) tem como vantagem a associação com a técnica de formação de nano/miniemulsão por sonda ultrassônica, possibilitando o controle do tamanho de partículas antes do processo de encapsulação, um dos grandes desafios das técnicas de encapsulação, além de fornecer um produto final livre de solvente orgânico e com alta eficiência de encapsulação (MATTEA et al., 2009).

Há poucos trabalhos com formação de partículas pela técnica SFEE. Considerando apenas a encapsulação de óleos essenciais por antissolvente supercrítico, não foram encontrados estudos sobre o tema. Com isso, este trabalho de tese tem como caráter inovador:

- ⊗ A avaliação da influência da concentração do óleo essencial da folha de louro da emulsão na eficiência de encapsulação pelo processo SFEE;
- ⊗ O estudo dos efeitos das variáveis do processo SFEE na eficiência de encapsulação;
- ⊗ A avaliação da estabilidade cinética das suspensões obtidas por SFEE;
- ⊗ A caracterização das partículas em suspensão formadas por SFEE quanto aos aspectos morfológicos;
- ⊗ A análise da decomposição térmica das partículas constituídas de óleo essencial da folha de louro em Hi-Cap;
- ⊗ A averiguação da preservação das atividades antimicrobianas do óleo essencial da folha de louro nas partículas formadas por SFEE; e, por fim,
- ⊗ A encapsulação de um óleo essencial por um antissolvente supercrítico.

Portanto, este trabalho teve como desafio reunir a técnica de formação de emulsão, por ultrassom, com a tecnologia supercrítica, considerada ambientalmente segura, não-térmica e com boa eficiência, para alcançar a encapsulação de um óleo essencial.

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais, descritos neste Capítulo, e os respectivos resultados e discussão, analisados no Capítulo IV desta tese, foram divididos em 3 etapas:

3.1 Extração, identificação de compostos químicos, quantificação do 1,8-cineol e análises da atividade antioxidante e de compostos fenólicos dos extratos obtidos por diferentes técnicas;

3.2 Análise da estabilidade das emulsões e encapsulação do óleo essencial de louro por SFEE; e

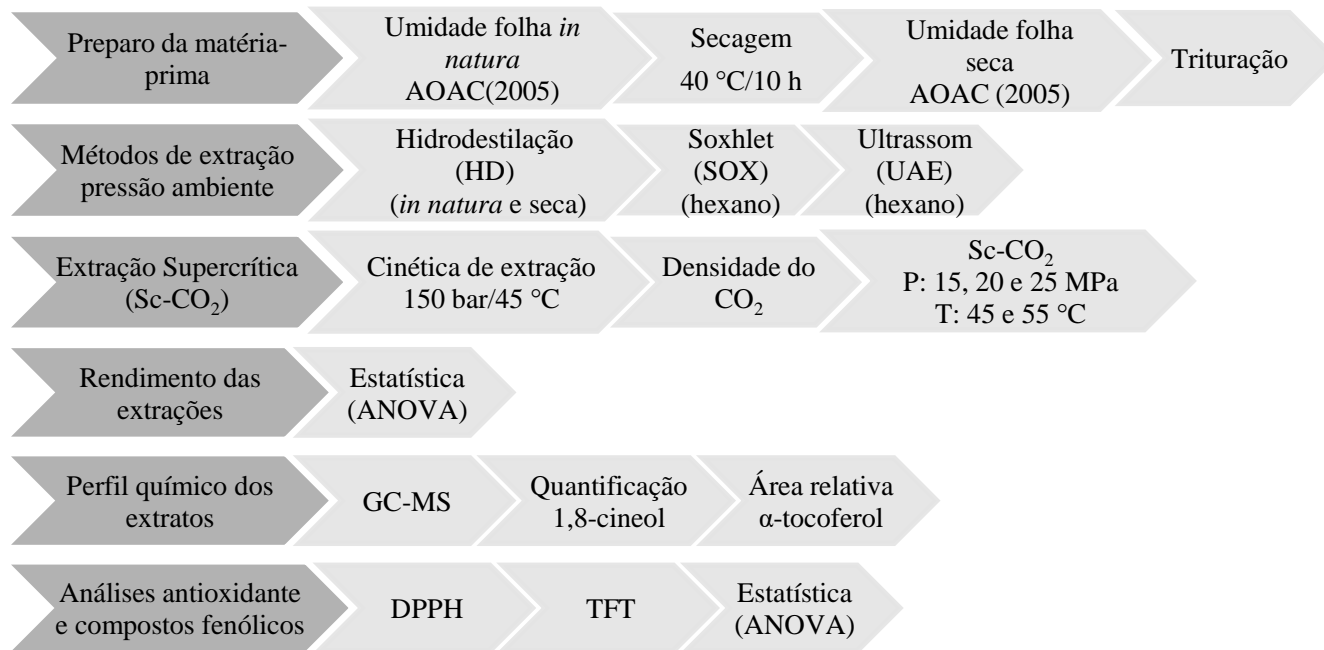
3.3 Encapsulação do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE.

Para cada uma dessas etapas, um artigo científico foi ou será elaborado para publicação. Fluxogramas de cada etapa experimental foram construídos, para uma melhor compreensão, e descritos separadamente.

#### **3.1 Extração, identificação de compostos químicos, quantificação do 1,8-cineol e análises da atividade antioxidante e de compostos fenólicos dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração**

Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Figura 3.1, com o detalhamento seguinte.

**Figura 3.1:** Fluxograma dos experimentos da etapa de extração, identificação de compostos químicos, quantificação do 1,8-cineol e análises da atividade antioxidante e de compostos fenólicos dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração.





### 3.1.1 Aquisição e preparação da matéria-prima

As folhas de louro *in natura* foram adquiridas no comércio local da cidade de Florianópolis/Santa Catarina - Brasil, durante os meses de setembro a dezembro de 2015.

Foi realizada uma análise da umidade da folha de louro *in natura* pela metodologia 925.09 da AOAC (2005), fundamentada nas perdas de umidade e de substâncias voláteis das amostras submetidas a 105 °C. Desidratadas a 40 °C em secador a vácuo (E.L. 003, Odontobrás, Brasil) até atingir uma umidade abaixo de 5 %, as folhas foram, na sequência, trituradas em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

### 3.1.2 Extrações a pressão ambiente

#### 3.1.2.1 Extração por hidrodestilação (HD)

A amostra foi colocada em um balão de fundo redondo, com água destilada em quantidade suficiente para imersão completa da folha de louro (30 g:1L), e conectado em aparelho do tipo Clevenger, conforme Figura 3.2. O sistema foi aquecido até ebulição da água durante 3 h. O extrato foi separado da água por diferença de massa específica e secado com auxílio de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Em seguida, os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador doméstico (CVU30DBBNA, Consul, Brazil), a -18 °C.

**Figura 3.2:** Extração por hidrodestilação (HD) da folha de louro.



Foram realizadas as extrações por hidrodestilação das folhas *in natura* e seca. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.2.2 Extração direta em Soxhlet (SOX)

Os extratos foram obtidos pelo método 920.39C da AOAC (2005), utilizando-se o hexano como solvente, já que o interesse é o óleo essencial do louro, que é constituído por compostos com características apolares. Foram medidos aproximadamente 5 g da amostra em cartucho de papel filtro, inseridos no extrator tipo Soxhlet e preenchido com 150 mL de hexano, correspondente a uma proporção de amostra-solvente 1:30. O sistema foi aquecido até ebulição do solvente por uma manta, durante 6 h. Os extratos obtidos foram rotoevaporados, sob vácuo de 400 mmHg e rotação de 30 rpm, até eliminação completa do hexano. Em seguida, os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador doméstico a  $-18^{\circ}\text{C}$ . O rendimento da extração foi calculado por meio da Equação 3.1:

$$\text{Lipídios ou extrato etéreo por cento m/m} = (100 \cdot N) / P \quad (3.1)$$

Onde:

N = massa em gramas de lipídios;

P = gramas da amostra.

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.2.3 Extração por ultrassom (UAE)

A extração foi adaptada da metodologia de Vinatoru (2001). Mediram-se aproximadamente 5,00 g da amostra e adicionaram-se 150 mL de hexano em um balão, o qual foi submetido por 2 h a um banho indireto em ultrassom (Ultrasonic cleaner, modelo USC-200), de frequência 40 kHz e potência de 60 W. Após o tempo de extração, o sistema foi filtrado e realizou-se a eliminação do solvente por rotaevaporação, como descrito no item 2.2.2.2. Em seguida, os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador doméstico a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.3 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

#### 3.1.3.1 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (Sc-CO<sub>2</sub>)

As condições de operação para extração com fluido supercrítico foram determinadas com base nos resultados dos trabalhos encontrados na revisão de literatura, testando outras condições de processo, como também nos trabalhos desenvolvidos no extrator supercrítico do grupo de pesquisa do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC). A unidade de extração supercrítica, apresentada na Figura 3.3a, foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha, e adaptada para outros procedimentos supercríticos, a exemplo do SFEE, pelo LATESC.

A Figura 3.3b apresenta um esquema detalhado do funcionamento dessa unidade. O equipamento possui um cilindro de CO<sub>2</sub> (I), com pureza de 99,9 %, e um tubo pescador que direciona o solvente para uma linha com controle de pressão pelo primeiro manômetro (II), imersa em banho termostático (III) e programada para manter a temperatura inferior a 0 °C. Com isso, o fluido entra ainda liquefeito na bomba hidropneumática (IV) (M111 Maximator, Niedersachsen, Alemanha), que é alimentada por uma linha de ar comprimido (V), filtrado e mantido na pressão mínima de 1 bar. O ar comprimido controla a pressão de operação desejada, visto que essa opera na razão de 1:130 ( $P_{ar}:P_{sistema}$ ).

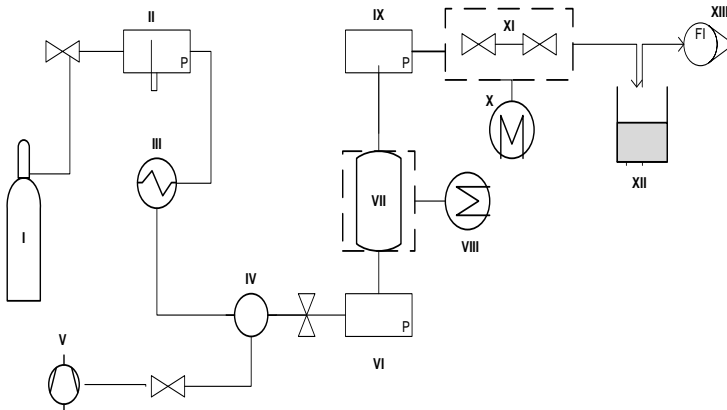
Monitorado por um segundo manômetro (VI) (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10), o CO<sub>2</sub> pressurizado é enviado para o extrator (VII), que consiste em um cilindro de aço inox encamisado de 30,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro, com volume de 95 mL aproximadamente, encamisado por um banho termostático de aquecimento (VIII), ajustado na temperatura desejada de operação. Após a passagem pelo extrator, com pressão controlada pelo terceiro manômetro (IX), o CO<sub>2</sub> pressurizado é encaminhado por uma linha também com banho de aquecimento (X) em temperatura constante de 65 °C, evitando os congelamentos da linha e das válvulas micro/macrométricas (XI) durante a despressurização da mistura soluto/solvente. As válvulas V1 e V2 (XI) são responsáveis por controlar a entrada e o fluxo do CO<sub>2</sub>. O soluto e o CO<sub>2</sub> são direcionados para um coletor (XII), onde ocorre a separação do extrato e do gás carbônico, sendo este encaminhado para um rotâmetro (XIII).

**Figura 3.3:** (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.

a)



b)



I = cilindro de CO<sub>2</sub>; II = manômetro do cilindro de CO<sub>2</sub>; III = banho termostático para resfriamento do CO<sub>2</sub>; IV = bomba para pressurização; V = compressor de ar; VI = manômetro de medição da pressão de entrada; VII = extrator; VIII = banho termostático para aquecimento do extrator; IX = manômetro de medição da pressão de saída; X = banho termostático de aquecimento das válvulas; XI = micro e macro válvulas; XII = coletor do extrato; XIII = rotâmetro.

Fonte: a autora.

### 3.1.3.2 Experimentos cinéticos – curvas de extração e parâmetros cinéticos

Foram realizadas duas condições para a cinética de extração, variando-se a temperatura (40 e 45 °C) e a pressão (100 e 150 bar), com vazão de CO<sub>2</sub> de  $8 \pm 2$  g/min, com o objetivo de determinar o tempo necessário para se atingir a etapa difusional da extração (DCP). Na condição de 100 bar e 40 °C o rendimento da extração foi muito baixo. Por isso, a condição escolhida foi de 150 bar e 45 °C.

Esses parâmetros foram escolhidos com base nos trabalhos publicados de extração supercrítica da *Laurus Nobilis* L. (OZEK; BOZAN; BASER, 1998; CAREDDA et al., 2002; DE CORATO et al., 2010; IVANOVIC et al., 2010), bem como nos resultados dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LATESC/UFSC.

A massa da amostra (12,00 g) foi definida de maneira que o leito de extração apresentasse uma altura de, pelo menos, o dobro do diâmetro do extrator, considerando que esta condição é fundamental para que a dispersão axial fosse desprezada, pois não apresenta influência significativa no processo quando comparada ao efeito de convecção (MARTÍNEZ et al., 2003; MICHIELIN, 2009). As massas dos frascos coletores foram previamente medidas em balança analítica com precisão ao décimo de miligrama (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), sendo a coleta do soluto realizada em intervalos de tempo pré-determinados (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos). As massas do extrato foram determinadas em função do tempo de extração.

Os parâmetros cinéticos foram calculados para avaliação da cinética das extrações (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). As curvas de extração foram divididas em três etapas: a primeira etapa chamada de período de velocidade constante (CER), onde ocorre a transferência de massa por convecção; a segunda etapa nominada de período de taxa decrescente (FER), onde ocorre o início do mecanismo de difusão; e a terceira etapa de difusional (DCP). A velocidade de transferência de massa na etapa CER ( $M_{CER}$ ) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER (realizada com auxílio do software Microsoft Excel), enquanto que a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER ( $Y_{CER}$ ) foi determinada pela razão entre a  $M_{CER}$  e vazão do solvente ( $Q_{CO_2}$ ). Os tempos  $t_{CER}$  e  $t_{FER}$  representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente (BRUNNER, 1994; SOVOVÁ, 1994; CAMPOS et al.,

2005; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; BENELLI et al., 2010).

### 3.1.3.3 Rendimento global das extrações supercríticas

Foram utilizados 12,00 g da amostra e o tempo de extração (2,5 h) foi definido conforme o estudo da cinética de extração no item 3.1.3.2. O rendimento global da extração ( $X_0$ ) foi a razão entre a massa extraível presente na matriz sólida, em uma dada pressão e temperatura, e a massa da amostra utilizada no leito, conforme Equação 3.2:

$$X_0 = \frac{m(\text{extrato})}{m(\text{total})} * 100 \quad (3.2)$$

Onde:

$X_0$  = rendimento global;

m = massa.

A matriz de planejamento experimental das condições de extração é detalhada conforme Tabela 3.1:

**Tabela 3.1:** Planejamento experimental da Sc-CO<sub>2</sub>.

Variáveis	Níveis		
Pressão (MPa)	15	20	25
Temperatura (°C)	45	45	45
	55	55	55

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão.

### 3.1.3.4 Densidade (massa específica) do solvente supercrítico ( $\rho_{CO_2}$ )

A determinação da massa específica do solvente supercrítico foi realizada nas condições de operações por meio da equação Angus, Armstrong, De Reuck (1976). A massa específica do solvente é utilizada para avaliar as influências da pressão e da temperatura na variação da massa específica do solvente e, conseqüentemente, na solubilização do soluto.

### **3.1.4 Análise qualitativa da fração mais volátil e quantificação do 1,8-cineol**

As análises qualitativas e quantitativas dos extratos obtidos foram realizadas por cromatografia gasosa (GC), sendo a identificação dos compostos químicos por GC acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a quantificação do 1,8-cineol, principal composto da folha de louro, feita por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (GC-FID), em frascos de headspace, adaptando-se as metodologias de Caredda et al. (2002) e Ivanovic et al. (2010).

Utilizou-se o cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C); com coluna capilar HP-5MS (Agilent Technologies), com fase estacionária composta por 5 % fenil e 95 % dimetilsiloxano (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme); e hélio como gás de arraste (1 mL.min<sup>-1</sup>).

As condições cromatográficas foram: aquecimento programado 60 - 280 °C a 3 °C/min seguido de 30 min sob condições isotérmicas. O injetor foi mantido a 250 °C. O hélio foi o gás de arraste com vazão de 1,0 mL/min; a amostra (1  $\mu\text{L}$ ) foi injetada por *Split* a uma taxa de 1:20. As condições do detector do espectro de massa (MS 5975C) foram as seguintes: 70 eV de energia de ionização e analisador de massas quadrupolar operando com varredura na faixa de 35 a 550 u para o modo SCAN. A identificação dos compostos extraídos das amostras foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (NIST 11) e com dados retirados da literatura revisada. As amostras (extratos) foram diluídas em diclorometano na concentração de 100 ppm. Os resultados cromatográficos do GC-MS foram expressos em percentagens da área relativa, em função do tempo de retenção (tR).

A quantificação do 1,8-cineol foi feita por meio dos percentuais de área, obtidos pela integração dos cromatogramas correspondentes (FID) e da curva de calibração do padrão do 1,8-cineol (marca: Sigma-Aldrich, 99 % de pureza), conforme Apêndice A.

### **3.1.5 Análises da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos dos extratos**

#### *3.1.5.1 Método do radical DPPH*

A análise da atividade antioxidante foi realizada em acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Nesse método, concentrações crescentes (15, 30, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) dos extratos

da folha de louro foram adicionadas a uma solução etanólica de DPPH 0,3 mmol/L. Após 30 min ao abrigo da luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro em 517 nm. A concentração das amostras necessárias para captar 50 % do radical livre DPPH ( $EC_{50}$  – concentração efetiva) foi calculada por análise de regressão linear. Os resultados encontrados, em triplicata, de concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) para os extratos analisados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.5.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT)

Os compostos fenólicos totais dos extratos da folha de louro oriundos das extrações supercríticas foram determinados por meio do método de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006).

Para a construção da curva analítica de ácido gálico preparou-se uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido gálico em água destilada. Em balões volumétricos de 100 mL, foram diluídas alíquotas da solução estoque para a obtenção de frações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 350 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferidos para estes 100  $\mu$ L de cada uma das frações, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin Ciocalteu. Após 30 s e antes de 8 min após a adição do reativo, foram adicionados 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram aferidos com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 2 h para que a reação ocorresse.

A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro. A curva analítica de ácido gálico foi representada por meio do gráfico de absorbância versus concentração de ácido gálico (mg/L), apresentada no Apêndice B. Os extratos da folha de louro avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. na fração final de 1667 mg/L, seguindo-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva analítica de ácido gálico. Os valores de absorbância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva analítica, enquanto que o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da Equação 3.3:

$$\text{TFT (mg EAG/g)} = \frac{\text{EAG} \cdot 1000}{D_{\text{extrato}}} \quad (3.3)$$



Onde:

EAG = equivalente em ácido gálico, obtida através da curva analítica (mg GAE/L);

D = diluição da amostra (mg extrato/L).

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de EAG/g de extrato, como média  $\pm$  desvio padrão.

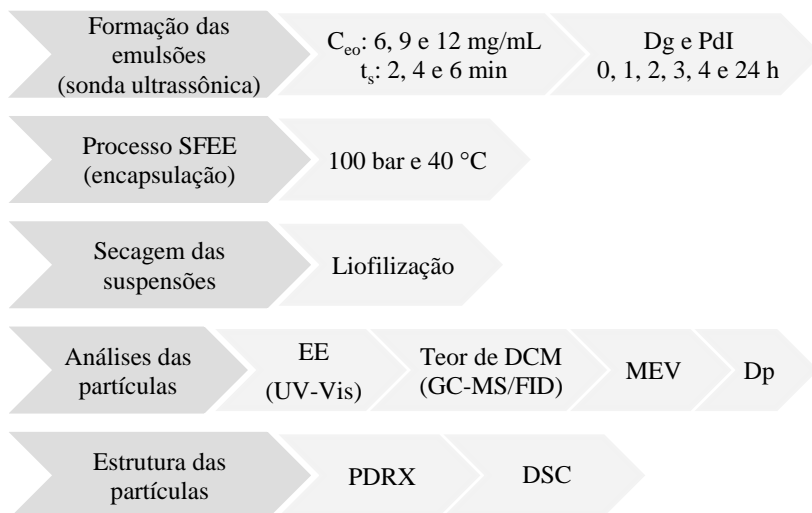
### **3.1.6 Análise estatística**

Os resultados dos rendimentos dos extratos foram avaliados pelo método de Comparação Múltipla e, havendo diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

### 3.2 Análise da estabilidade das emulsões e encapsulação do óleo essencial de louro por SFEE

Esta etapa foi desenvolvida conforme Figura 3.4, detalhada na seqüência.

**Figura 3.4:** Fluxograma dos experimentos da etapa de análise da estabilidade das emulsões e encapsulação do óleo essencial de louro por SFEE.



#### 3.2.1 Materiais

Para desenvolvimento da pesquisa foram utilizados os seguintes materiais:

- Óleo essencial da folha de louro, obtido por hidrodestilação, conforme item 3.1.2.1 supra. Esse extrato foi escolhido por apresentar a maior concentração do composto majoritário da folha de louro (1,8-cineol);
- Hi-Cap 100 (amido modificado), doado pela Ingredion Brasil Ingredientes Ltda (lote DBI-6644);
- Emulsificante Tween 80 United States Pharmacopeia (U.S.P.), fabricado por Oxiteno da Synth;
- Os solventes diclorometano PA (DCM com 99,9 %) e o dimetil sulfóxico (DCMSO 99,9 %), adquiridos da Qhemis/Brasil; e

- Para agir como antissolvente supercrítico no processo de SFEE, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) com 99,9 % na fase líquida, fornecido pela White Martins S. A./Brasil.

### 3.2.2 Formação das emulsões

Inicialmente foi realizado um estudo para avaliar os efeitos das variáveis da formação da emulsão em sua estabilidade. A escolha das variáveis estudadas foi baseada nos estudos do Grupo de Pesquisa *High Pressure Process Research Grup* (Valladolid, Espanha) (MATTEA et al., 2009; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; DE PAZ et al., 2013; LÉVAI et al., 2015).

Foram variadas a concentração do óleo essencial (C<sub>oe</sub>) e o tempo de sonicação (t<sub>s</sub>), conforme Tabela 3.2, obtendo-se como resposta o diâmetro hidrodinâmico das gotículas da emulsão (D<sub>g</sub>) e o índice de polidispersividade (PdI), avaliados 0, 1, 2, 3, 4 e 24 h, os quais foram utilizados como indicativo do alcance da estabilidade.

**Tabela 3.2:** Planejamento do estudo das variáveis na formação de emulsões.

Experimentos	<sup>1</sup> C <sub>eo</sub> (mg/mL)	<sup>2</sup> t <sub>s</sub> (min)	C <sub>(Hi-Cap)</sub> /C <sub>eo</sub>
1	6	2	5
2	6	4	5
3	6	6	5
4	9	2	3,3
5	9	4	3,3
6	9	6	3,3
7	12	2	2,5
8	12	4	2,5
9	12	6	2,5

<sup>1</sup>C<sub>eo</sub> = concentração do óleo essencial na emulsão; <sup>2</sup>t<sub>s</sub> = tempo de sonicação.

A relação solvente/água (S/W), a concentração do amido modificado (Hi-Cap), a microponeta de titânio e os parâmetros de funcionamento da sonda ultrassônica (marca Ultronique, modelo QR500) foram fixados conforme descrito na Tabela 3.3. O agente emulsificante

Tweet 80 U.S.P. foi utilizado para manter uniforme a fase dispersa na fase contínua das emulsões.

**Tabela 3.3:** Parâmetros fixos para formação das emulsões.

Relação S/W (DCM/água)	C <sub>(Hi-Cap)</sub>	Tweet 80	Parâmetros sonda ultrassônica		
			Potência	Frequência	Amplitude
15/85 (v/v)	30 mg/mL	1,2 mg/mL	500 W	20 kHz	70 %

Para cada experimento foram preparados 50 mL de emulsão em três etapas: (1) dispersão do Hi-Cap em água destilada (utilizando um agitador magnético por 15 min) + dispersão do óleo essencial da folha de louro em diclorometano (utilizando um agitador magnético por 15 min); (2) junção das duas dispersões e acréscimo do Tween 80 U.S.P., agitados por mais 15 min; (3) submissão do sistema à sonda ultrassônica com uma camisa refrigerada para minimizar o calor gerado pelo equipamento.

Assim que as emulsões foram preparadas, realizou-se a medição do diâmetro hidrodinâmico das gotículas (Dg) e o índice de polidispersividade (PdI), em triplicata.

### 3.2.3 Determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dg) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (PdI)

A estabilidade das emulsões foi avaliada pela determinação do diâmetro hidrodinâmico das gotículas (Dp) e pelo índice de polidispersividade (PdI), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando-se do equipamento Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltda) alocado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A avaliação foi feita durante 24 h (0, 2, 4, 6 e 24 horas), as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como diâmetro hidrodinâmico (média  $\pm$  desvio padrão) das gotículas.

Com a estabilidade das emulsões alcançada, realizou-se o processo de extração com fluido supercrítico de emulsões (SFEE), com o objetivo de determinar o experimento que reúne as melhores características de encapsulação, para posterior estudo das variáveis (temperatura e pressão).

### 3.2.4 Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)

#### 3.2.4.1 Implantação do SFEE no LATESC

A implantação da tecnologia de Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) é resultado de iniciativas de trabalhos e projetos acadêmicos orientados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira, descritos na Tabela 3.4:

**Tabela 3.4:** Projetos acadêmicos para construção do equipamento de SFEE.

Ano	Atividade acadêmica	Projeto (número)	Membros
2012	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Capes – UFSC/Universidade de Valladolid. Projeto:	1498-10-0	Natália Mezzomo Sandra R. S. Ferreira María Jose Cocero Ángel Martín
2014	Encapsulamento de compostos bioativos através do processo de emulsão em meio supercrítico.	CNPq Universal 473153/2012-2	Natália Mezzomo Sandra R. S. Ferreira
2015	Projeto de pós-doutorado do programa PNPd.	23038.007787/2011-70	Natália Mezzomo Sandra R. S. Ferreira

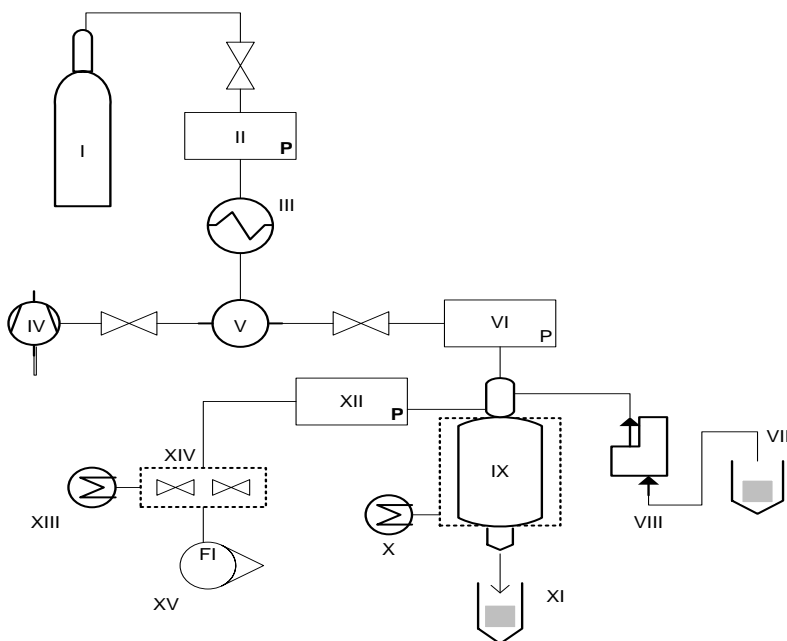
Houve, também, a publicação do primeiro trabalho, intitulado: “Encapsulation of grape pomace extract in modified starch using SFEE process”, no 7th Green Solvents Conference, em Dresden/Alemanha, em 2014, sob a autoria de Natália Mezzomo, Daniela Alves Oliveira, M. Angonese, S. R. Rosso-Comim e Sandra Regina Salvador Ferreira. No ano de 2015, foi realizada uma melhoria no equipamento de SFEE por meio de projeto financiado pelo Programa Nacional de Pós-doutorado da CAPES (PNPD), conforme Figura 3.5.

#### 3.2.4.2 Montagem do equipamento de extração com fluido supercrítico de emulsões (SFEE)

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o diagrama esquemático descrito na Figura 3.5. O funcionamento do equipamento de SFEE inicia com o (I) fornecimento de CO<sub>2</sub> em cilindro, com 99,9 % de

pureza, através de um tubo pescador que direciona o solvente por uma linha com controle de pressão, (II) imersa em banho termostático (III) para manter a temperatura inferior a  $-5^{\circ}\text{C}$ , o que faz com que o fluido entre ainda liquefeito na (V) bomba hidropneumática (M111 Maximator, Niedersachsen, Alemanha), que é alimentada por uma linha de (IV) ar comprimido, filtrado e mantido à pressão mínima de 1 bar. O ar comprimido controla a pressão de operação desejada, visto que essa opera na razão de 1:130 ( $P_{\text{ar}}:P_{\text{sistema}}$ ).

**Figura 3.5:** Diagrama esquemático do equipamento SFEE.



I = cilindro de  $\text{CO}_2$ ; II = manômetro do cilindro de  $\text{CO}_2$ ; III = banho termostático para resfriamento do  $\text{CO}_2$ ; IV = compressor de ar; V = bomba para pressurização; VI = manômetro de medição da pressão de entrada; VII = recipiente com emulsão; VIII = bomba de HPLC; IX = coluna de coprecipitação/encapsulamento; X = banho termostático para aquecimento da coluna; XI = coletor da suspensão; XII = manômetro de medição da pressão de saída; XIII = banho de aquecimento; XIV = micro e macro válvulas; XV = rotâmetro.

Fonte: a autora.

Na sequência, um segundo manômetro (VI) (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10) monitora o CO<sub>2</sub> pressurizado, que é injetado através de um tubo concêntrico, de forma descendente, para a coluna de encapsulação/coprecipitação (IX), que consiste em um cilindro de aço inox encamisado de 62,00 cm de comprimento e 2,40 cm de diâmetro, com volume de 280,50 mL, aproximadamente, encamisado por um banho termostático de aquecimento (X) ajustado na temperatura desejada de operação e com uma válvula posicionada na parte inferior da coluna, para retirada da suspensão ao término do processo (XI).

A emulsão é injetada por um tubo concêntrico (VII), na forma de *spray*, através de uma bomba de cromatografia líquida (HPLC) (VIII), para dentro da coluna de encapsulação/coprecipitação (IX) onde o CO<sub>2</sub> supercrítico encontra-se com a emulsão e a encapsulação ocorre formando a suspensão.

O CO<sub>2</sub> + solvente da emulsão (DCM) são encaminhados por uma linha com pressão controlada (XII), imersos em um banho aquecido (XIII), que possui temperatura constante de 65 °C, evitando o congelamento da linha e das válvulas micro/macrométricas (XIV) durante a despressurização da mistura soluto/solvente.

As válvulas V1 e V2 (XIV) são responsáveis por controlar a entrada e o fluxo do CO<sub>2</sub> supercrítico, que é direcionado, juntamente com o solvente da emulsão, para um rotâmetro (XV). Após a despressurização do sistema, a suspensão é coletada da coluna de encapsulação/coprecipitação.

#### *3.2.4.3 Processo de extração com fluido supercrítico de emulsões (SFEE)*

A temperatura (T) e pressão (P) do funcionamento do SFEE foram selecionados para que o CO<sub>2</sub> atue como antissolvente, retirando o DCM e evitando a perda do óleo essencial da fase dispersa da emulsão, por isso as informações sobre equilíbrio vapor-líquido em alta pressão (VLE) dos sistemas binários de DCM/CO<sub>2</sub> foram utilizadas para definir essas condições de operação do SFEE.

Segundo Corazza et al. (2003), uma mistura de DCM/CO<sub>2</sub> a 40 °C com fração molar de CO<sub>2</sub> de 0,9301 tem como pressão crítica 7,43 MPa (74,3 bar), ou seja, condições de operações acima de 40 °C e 74,3 bar mantêm o sistema em fase supercrítica. Considerando que nessas condições a água é muito pouco solúvel em CO<sub>2</sub> supercrítico, enquanto que o DCM é completamente solúvel, a condição de 100 bar e 40 °C foi escolhida para aplicação do processo de SFEE (KING et al., 1992;

LEEKE; GASPAR; SANTOS, 2003). As taxas de fluxo da emulsão ( $Q_e$ ) e do  $CO_2$  ( $Q_{CO_2}$ ) foram mantidas constantes ( $Q_e = 1\text{ mL/min}$  e  $Q_{CO_2} = 1\text{ kg/h}$ ).

O  $CO_2$  supercrítico foi injetado na coluna de encapsulação/coprecipitação até o alcance do equilíbrio da vazão na pressão e temperatura determinadas para o processo. Em seguida, a emulsão foi direcionada para a coluna de encapsulação/coprecipitação por meio da bomba de cromatografia líquida (HPLC), com controle da vazão até que toda a amostra (50 mL) fosse processada. Por fim, foi mantido o fluxo do  $CO_2$  supercrítico por 30 min, para garantir a remoção do solvente orgânico (DCM) residual.

Após a remoção do solvente orgânico da emulsão pela técnica SFEE, ocorreu a formação de uma suspensão, na qual as partículas do óleo essencial da folha de louro + Hi-Cap estão em fase aquosa. As suspensões foram colhidas em frascos de vidro âmbar e estocadas em refrigeração a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.5 Secagem das suspensões**

Para a secagem das suspensões, as amostras foram colocadas em placa de petri de vidro e congeladas em ultra freezer a  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  (Nuair, EUA) durante 24 h. Em seguida, foi realizada a secagem das amostras por 24 h em liofilizador (Modelo L101, Liotop, Brasil), por aproximadamente  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ .

Após a liofilização, as partículas foram lavadas com o diclorometano, por aproximadamente 2 min, filtradas e secadas em temperatura ambiente, para fins de retirada do óleo essencial da folha de louro que não tivesse sido encapsulado e de avaliar suas características. O material seco foi armazenado em frasco âmbar, com uma barreira de algodão, em dessecador com sílica.

### **3.2.6 Eficiência de encapsulação (EE) do processo SFEE**

As partículas obtidas foram diluídas em dimetil sulfoxido PA e homogeneizadas por 10 min. em ultrassom (Ultronique, Q3.0/37A, Brasil). Em seguida, realizou-se a absorbância em UV/VIS espectrofotômetro a 270 nm (Perkin Elmer Lambda10), conforme metodologia de Angadi et al. (2002). O Dimetil sulfoxido (DCMSO) foi utilizado como branco e o cálculo da massa encapsulada realizado por meio da correlação entre a curva analítica do óleo essencial de louro em DCMSO com diferentes concentrações, de acordo com a Equação 3.4:



$$C_{eo} = \frac{(\lambda - 0,0966)}{0,088} \quad R^2 = 0,99 \quad (3.4)$$

Onde:

$C_{eo}$  = concentração do óleo essencial na amostra;

$\lambda$  = absorvância da amostra.

A eficiência de encapsulação (Equação 3.5):

$$EE = \frac{C_p}{C_{eo}} \cdot 100 \% \quad (3.5)$$

Sendo:

EE = eficiência de encapsulação;

$C_p$  = concentração do óleo essencial nas partículas;

$C_{eo}$  = concentração do óleo essencial na emulsão.

### 3.2.7 Teor residual de solvente orgânico (DCM) nas partículas

A identificação de resíduos do solvente diclorometano (DCM) nas partículas produzidas foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas (GC-MS), em cromatógrafo a gás (GC modelo 5975C InertMSD marca Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas com coluna DB624 (30 m x 0,45 mm x 2,55  $\mu$ m), em frasco via headspace. As condições de operação foram adaptadas do método descrito por Gudat; Firor; Bober (2007) e por Aguiar et al. (2016b). A quantificação do resíduo de solvente foi realizada por cromatografia gasosa – detector de chama de ionização (GC-FID), utilizando-se as mesmas condições de funcionamento do GC-MS.

### 3.2.8 Estrutura das partículas

#### 3.2.8.1 Morfologia e tamanho médio das partículas

A morfologia das partículas foi determinada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (marca JEOL, modelo JSM6390LV, Japão), realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram fixadas em um suporte metálico por meio de uma fita adesiva de carbono dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo. A visualização foi realizada em aumentos de 100 a 10000 vezes, com uma tensão de 10 kV.

Foi determinado o tamanho médio das partículas ( $D_p$ ) utilizando-se a versão 1.1 do software Meter (MACHADO JR et al., 2014), expressando-o juntamente com o desvio padrão.

### *3.2.8.2 Difração de raios-X das partículas (PDRX)*

A estrutura morfológica das partículas foi avaliada por meio dos padrões de difração de raios-X das partículas (PDRX). Esses foram recolhidos a partir do difractômetro de Phaser D2 (Bruker)  $\theta$ - $\theta$ , com uma fonte de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) operando a 30 kV e 10 mA, utilizando-se um contador de cintilação 1-dimensional detector LYNXEYE. Os dados de difração da partícula foram recolhidos sob ângulo  $2\theta$ , variando entre 5 e 50 ° a cada 0,5 s, contando-se o tempo de cada etapa (AGUIAR et al., 2017).

Foram determinados os padrões de difração de raios-X do agente de encapsulação (Hi-Cap) e das partículas obtidas pelo experimento 8, visto que esse reuniu os melhores resultados obtidos pelas análises anteriores.

### *3.2.8.3 Perfil calorimétrico das partículas (DSC)*

As análises do perfil calorimétrico foram realizadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) efetuadas em equipamento apropriado (Perkin-Elmer, Jade, modelo 400, Massachusetts, EUA). Foram utilizados  $6 \pm 1$  mg tanto das amostras puras (óleo essencial e Hi-Cap), quanto das partículas obtidas do experimento 8.

Inicialmente foi removido o histórico térmico do Hi-Cap e das partículas do experimento 8, iniciado a partir de uma primeira corrida de aquecimento de -15 a 300 °C, seguido de resfriamento de 300 a -15 °C, à taxa constante de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Os dados foram retirados da segunda corrida de aquecimento realizada nas mesmas condições descritas. Para o óleo essencial da folha de louro, a análise foi realizada na faixa de -15 a 80 °C, com as mesmas condições aplicadas para o Hi-Cap e as partículas do experimento 8. As análises foram realizadas em atmosfera inerte, com uma vazão de nitrogênio de 20 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas de fusão ( $T_f$ ) do óleo essencial e de transição vítrea ( $T_g$ ) do amido modificado (Hi-Cap) e das partículas (exp. 8) foram obtidas por meio dos picos encontrados.

Os resultados foram analisados no software Pyris DSC, obtendo-se como resposta as temperaturas de fusão (óleo essencial da folha de louro), de transição vítrea e de decomposição (Hi-Cap e partículas do exp. 8).

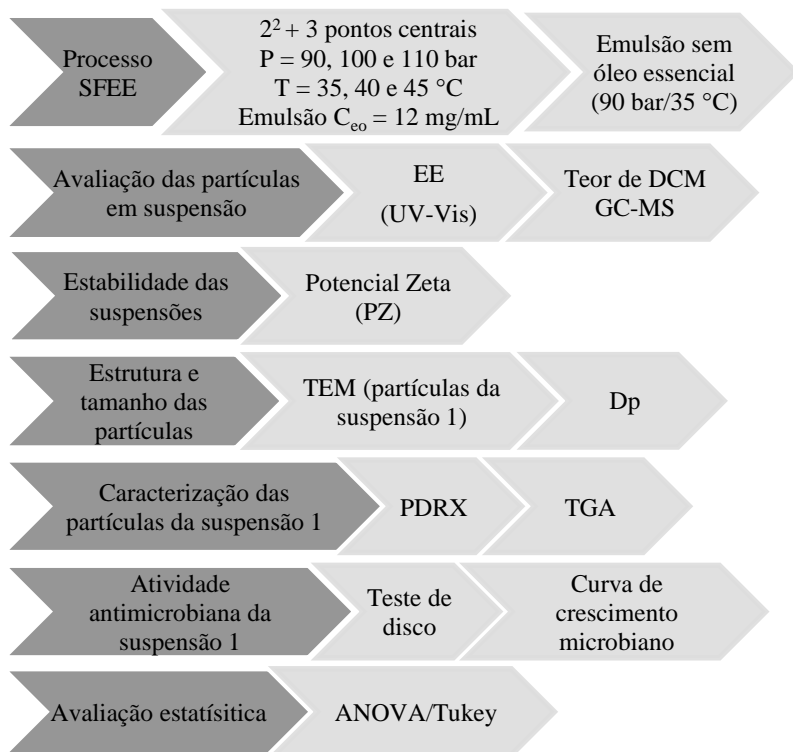
### **3.2.9 Análise estatística**

Os resultados do tamanho hidrodinâmico das gotículas das emulsões ( $D_g$ ), os índices de polidispersividade (PdI) e a eficiência de encapsulação dos experimentos foram avaliados pelo método de Comparação Múltiplas e, havendo diferença estatística, aplicou-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

### 3.3 Encapsulação do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE

Na Figura 3.6 tem-se as etapas da última parte experimental deste trabalho, descrito em seguida.

**Figura 3.6:** Fluxograma dos experimentos da etapa de encapsulação do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE.



### 3.3.1 Encapsulação por Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)

Para estudos sobre a influência dos parâmetros do processo, foram variadas a pressão e a temperatura, por meio de um planejamento fatorial  $2^2 + 3$  pontos centrais (Tabela 2.5), e mantendo-se constantes as vazões da emulsão e do  $\text{CO}_2$  supercrítico ( $Q_e = 1\text{ mL/min}$  e  $Q_{\text{CO}_2} = 1\text{ mL/min}$ ), tendo como variável resposta a eficiência de encapsulação (EE).

**Tabela 2.5:** Matriz do planejamento fatorial  $2^2 + 3$  pontos centrais.

Experimentos	Temperatura/(°C)	Pressão/(bar)
1	35	90
2	45	90
3	35	110
4	45	110
5	40	100
6	40	100
7	40	100

Os níveis das variáveis foram definidos de acordo com os estudos de equilíbrio de fase a alta pressão para uma mistura binária entre o DCM e o  $\text{CO}_2$ , realizados por Corazza et al. (2003). Nessas condições foi considerado que a água é pouquíssima solúvel em  $\text{CO}_2$  supercrítico, enquanto que o DCM é completamente solúvel.

Por reunir boas características, a miniemulsão ( $C_{eo} = 12\text{ mg/mL}$  e 4 min de ts) obtida do experimento 8 da seção 3.2, foi a escolhida para realização dos experimentos SFEE.

Também foi formada uma emulsão sem a presença do óleo essencial da folha de louro para estudos de comparação da estabilidade das suspensões e da atividade biológica, processada a 90 bar e 35 °C. Os experimentos foram conduzidos no equipamento descrito no item 3.2.4.2.

### 3.3.2 Eficiência de encapsulação (EE) nas suspensões

De acordo com a metodologia descrita na seção 3.2.6.

### 3.3.3 Teor residual de solvente orgânico (DCM)

Realizado como descrito na seção 3.2.7.

### **3.3.4 Estabilidade das suspensões**

A determinação da estabilidade das suspensões foi realizada por meio do Potencial Zeta (PZ) utilizando-se o Stabino Control 2.00.23 – particle matrix, equipamento acoplado ao Nanoflex localizado no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN) da UFSC. Foram transferidos 10 mL de cada suspensão para uma célula cilíndrica de teflon. Em seguida, o equipamento foi ajustado para medição do PZ sob o efeito de diferentes valores de pH, variando de um pH ácido para um pH alcalino (3,0 para 10,0).

O resultado foi expresso em um gráfico da variação do Potencial Zeta em função da faixa de pH.

### **3.3.5 Morfologia e tamanho médio das partículas (suspensão 1)**

A morfologia das partículas da suspensão 1 (escolhida por apresentar a maior EE) foi avaliada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em um equipamento da marca JEOL (JEM-1011), com voltagem máxima de aceleração de 100 kV e magnificação até 600.000 vezes, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. A amostra foi diluída até um teor de sólidos de 0,5 % e gotejada sobre uma grade de cobre de 300 mesh/m<sup>2</sup> recoberta com carbono. As grades contendo amostra foram secas em temperatura ambiente por 72 horas e, em seguida, foram analisadas sob tensão de 80 kV.

Foi determinado o tamanho médio das partículas ( $D_p$ ) da suspensão 1 utilizando-se a versão 1.1 do software Meter (MACHADO JR et al., 2014), expressando-o juntamente com o desvio padrão.

### **3.3.6 Caracterização das partículas da suspensão 1**

Para realização da caracterização das partículas foi preciso secar a suspensão 1, conforme item 3.2.5.

#### *3.3.6.1 Estrutura das partículas (PDRX)*

A análise foi realizada de acordo com o *item 3.2.8.2.*

### 3.3.6.2 Estabilidade térmica

As decomposições térmicas das partículas obtidas da suspensão 1, do óleo essencial da folha de louro e do Hi-Cap foram estudadas por meio de análise termogravimétrica (TGA). O equipamento utilizado foi o STA 449 F3 Júpiter, Netzsch, localizado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC.

As análises foram realizadas com 10 mg de cada amostra. Foi utilizada uma faixa de temperatura de 20 a 500 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio 20 mL/min.

### 3.3.7 Atividade antimicrobiana

As análises das atividades antimicrobianas da emulsão e das partículas da suspensão 1 (SFEE 90 bar e 35 °C) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFSC), com o objetivo de constatar a atividade antimicrobiana das partículas devido à presença do óleo essencial da folha de louro no encapsulado.

#### 3.3.7.1 Preparo dos inóculos

O estudo foi desenvolvido com as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 e de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028), todas pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde doada pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Foi utilizada também cepa da levedura *Candida albicans* ATCC 10231, doada pelo Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

As cepas das bactérias foram mantidas a -80°C em criotubos, contendo 1 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e 25 % de glicerol. Para uso, as cepas foram cultivadas em ágar tripticase de soja (TSA) e mantidas a 4°C. Para a preparação da cultura experimental, as cepas foram reativadas por 24h em BHI a 35 °C. Em seguida, foram submetidas à diluição em água peptonada 0,1 % para obtenção da concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. A contagem foi confirmada por meio de plaqueamento de ágar PCA.

Já a cepa da levedura *Candida albicans* ATCC 10231 foi mantida a 4 °C e cultivada em tubo contendo ágar, caldo Sabouraud e solução salina 0,9 %. Para o experimento, a cepa foi reativa por 48 h em BHI a 35

°C. Em seguida, foi submetida à diluição em água peptonada 0,1 % para obtenção da concentração de  $10^8$  UFC/mL. A contagem também foi confirmada por meio de plaqueamento de ágar PCA.

### 3.3.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de papel, como teste preliminar. Após a detecção do potencial antimicrobiano, foi feito um cultivo em caldo para a realização da curva de inibição microbiana, a fim de verificar se a concentração testada era inibitória para as diferentes cepas testadas, ou seja, se apresentavam efeitos bactericida, bacteriostático, fungicida e/ou fungistático.

#### 3.3.7.2.1 Método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi realizado pela técnica de plaqueamento em superfície, com discos de papel filtro (9 mm) em meio de cultura sólido com placas de Petri, contendo Ágar Müeller-Hinton, previamente inoculado com os micro-organismos testes, na concentração de  $10^5$  UFC/mL, segundo a metodologia preconizada na Norma M2-A8 (ANVISA, 2003).

Os discos foram impregnados com um volume de 10  $\mu$ L da emulsão e das partículas da suspensão 1 com concentrações de óleo essencial de 12 mg/mL e 9,6 mg/mL, respectivamente, as quais foram previamente esterilizadas por meio de filtro PTFE de 0,45  $\mu$ m (VertiClean™).

O cloridrato de ciprofloxacina (0,05 mg/mL) e o fluconazol (7,5 mg/mL) foram utilizados como controles positivos para as bactérias e levedura, respectivamente, enquanto a emulsão e suspensão sem o composto ativo foram usadas como controle negativo para ambas. O teste foi realizado em duplicata com duas repetições.

Os halos foram medidos em mm com auxílio de um paquímetro (Starrett, 125 MEA, Brasil) e os resultados da medição utilizados como indicador da ação antimicrobiana da emulsão. A análise foi feita a partir da presença ou da ausência de um halo de inibição de crescimento microbiano em torno do disco, cujo diâmetro varia tanto de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado, quanto pela sensibilidade da bactéria.

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão.



### 3.3.7.2.2 Teste de diluição em caldo – Curva de inibição microbiana

O teste de diluição em caldo foi realizado em frascos contendo 20 mL de caldo nutriente, inoculados com uma alçada dos micro-organismos testes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva), *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (Gram negativa) e a levedura *Cândida albicans* ATCC 10231. Todos foram incubados por 1,5 h a 35 °C em estufa bacteriológica (Marca FANEM), resultando em uma concentração inicial de 10<sup>5</sup> UFC/mL, conforme recomendado pela Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, Norma M7-A6 (NCCLS, 2005).

As partículas da suspensão 1 foram acrescentadas a um frasco de caldo nutriente com C<sub>oe</sub> de 1,2 mg/mL, previamente esterilizada em filtro de 0,45 µm. Um segundo frasco foi acrescido do cloridrato de ciprofloxacina (0,05 mg/mL), como controle positivo, enquanto que em um terceiro frasco foi colocada a suspensão sem o óleo essencial da folha de louro, como controle negativo. Especificamente para a *Candida albicans* ATCC 10231, foi utilizado o fluconazol (7,5 mg/mL) como controle positivo, mantida a suspensão sem o óleo essencial da folha de louro como controle negativo. Todos os frascos foram incubados a 35 °C, durante 48 h, em banho Dubnoff microprocessado com agitação (Quimis, mod. 0226M2).

Para a contagem dos micro-organismos, as amostras foram incubadas por meio de plaqueamento em superfície em ágar PDA, nos tempos 0, 2, 4, 6, 24 e 48 h de incubação, a 35 °C por 24 h para as bactérias testes e por 48 h na mesma temperatura para a levedura, em duplicata com 2 repetições.

### 3.3.7.3 Avaliação estatística

Os resultados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ), com auxílio do software Statistix 8. Nos casos de resultado com uma diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância.

### 3.3.8 Análise estatística

Os efeitos das variáveis do SFEE (pressão e temperatura) na eficiência de encapsulação foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ), com o

auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). Em caso de diferença significativa, ao nível de 5 % de significância, deu-se continuidade aplicando o teste de Tukey, o qual avaliou as diferenças entre os pares de tratamentos.

O Gráfico de Pareto e a Superfície Resposta foram construídos pelo software Statistica 7.0 para análise da influência da temperatura e pressão sobre a eficiência de encapsulação e determinação da região de otimização do processo. O delineamento experimental foi determinado conforme seção 3.3.1.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados e Discussão deste trabalho foram divididos em três etapas, conforme a divisão realizada nos Materiais e métodos (Capítulo III). Assim, foram organizados e intitulados da seguinte forma:

4.1 Chemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. extracts obtained by different extraction techniques;

4.2 Ultrasound-assisted emulsion of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) encapsulated by SFEE; e

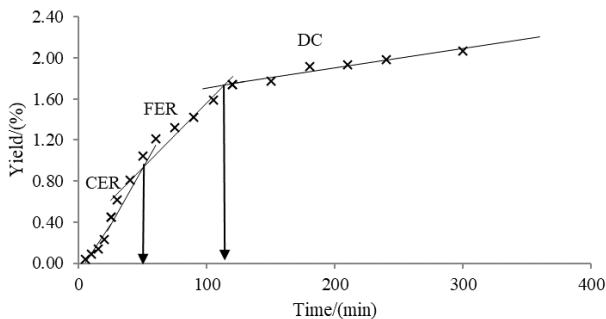
4.3 Encapsulação do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE.

#### 4.1 Chemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. extracts obtained by different extraction techniques

##### 4.1.1 Supercritical CO<sub>2</sub> (Sc-CO<sub>2</sub>) extraction kinetics

The Sc-CO<sub>2</sub> extraction kinetics curve was performed with the objective of determining the period required to perform the maximum extraction, that is, the time necessary to reach the diffusional period of the extraction. **Figure 4.1**, shows the yield extraction ( $X_0$ ) against extraction time for the Sc-CO<sub>2</sub> performed at 15 MPa and 45 °C, lower operating levels tested for supercritical extractions. The shape of the extraction curve indicates that at different stages of the extraction, ‘constant extraction rate’ (*CER*) period, ‘falling extraction rate’ (*FER*) period, and diffusional period (*DC*), characterized by the dominance of a specific or combined mass transfer mechanisms (SOVOVÁ, 1994). As can be observed, the constant extraction rate (*CER*) ends at 62.9 min and the falling extraction rate (*FER*) occurs between 62.9 and 112 min. The time for laurel leaves extraction was fixed at the diffusion-controlled period, at 150 min (2.5 h).

**Figure 4.1:** Kinetic assay of laurel leaves at 15 MPa, 45 °C and  $8 \pm 2 \text{ g CO}_2\cdot\text{min}^{-1}$ .



CER = constant extraction rate period; FER = falling extraction rate period; DC = diffusional period.

#### 4.1.2 EO extraction yield ( $X_0$ )

As can be observed at **Table 4.1**, SOX and UAE, with hexane, presented the highest yield, 7.5 and 6.0 %, respectively. The common high yield of the SOX method is due to high temperature, process time, solvent recycle, and solvent-solute interactions that contribute to enhancing the extraction. However, as a disadvantage, solvent residue could be retained in the final product due to incomplete removal (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

UAE presented a yield extraction higher than HD and Sc-CO<sub>2</sub>. This behavior was probably due to the ultrasonic waves that improve extraction efficiency. Moreover, the UAE reduces extraction temperature, being beneficial to botanical materials which are sensitive to temperature (VINATORU, 2001). However, the extracts could present solvent residue retained due to use of hexane, as for SOX.

**Table 4.1:** Extraction yield ( $X_0$ ) of laurel leaves extracts obtained by different techniques extraction (Hydrodistillation - HD, Soxhlet - SOX, Ultrasound-assisted extraction - UAE, Supercritical  $\text{CO}_2$  - Sc- $\text{CO}_2$ ).

Extraction techniques	$\rho \text{ CO}_2^1$ ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	Temperature ( $^\circ\text{C}$ )	Pressure (MPa)	( $X_0$ ) (%)
HD (dried)		100	ambient	$1.5 \pm 0.1^d$
HD (fresh)		100	ambient	$0.2 \pm 0.1^e$
SOX-hexane		60	ambient	$7.5 \pm 0.2^a$
UAE-hexane		ambient	ambient	$6.0 \pm 0.2^b$
	747.7	45	15	$2.2 \pm 0.1^{cd}$
	654.7	55	15	$1.5 \pm 0.1^d$
Sc- $\text{CO}_2$	816.9	45	20	$2.2 \pm 0.1^{cd}$
	755.3	55	20	$2.4 \pm 0.1^e$
	859.2	45	25	$2.8 \pm 0.1^e$
	811.4	55	25	$2.9 \pm 0.2^e$

<sup>1</sup>Angus; Armstrong; De Reuck, 1976; Different superscript letters mean groups statistically different ( $p < 0.05$ ) in each column.

Hydrodistillation is the simplest technique for EO recovery (OKOH; AFOLAYAN, 2011). Furthermore, the method is established by the International Organization for Standardization of Technical Committee (ISO/TC 54), and it allows better control of the quality of essential oils (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2007). The fresh and dry laurel leaves presented a moisture content of  $43.0 \pm 0.2$  % (w/w) and  $4.4 \pm 0.1$  % (w/w), respectively. The sample preparation effect (drying) on the HD extraction efficiency can be observed at **Table 4.1**. The extraction yield was higher for dried laurel leaves (1.5 %) than to fresh sample (0.2 %), the decrease in moisture content favors the increase of the concentration of the essential oil in the surface of laurel leaves (ANDRADE, 2000), facilitating the extraction process, besides guaranteeing the repeatability of the procedure .

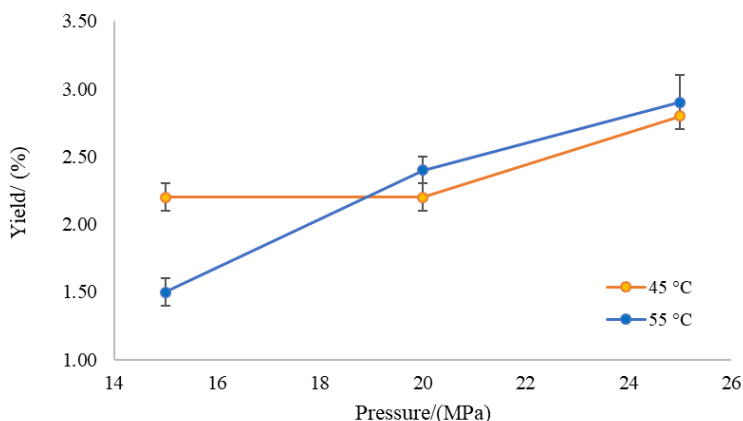
The HD extraction yield values found by Ivanovic et al. (IVANOVIC et al., 2010) and by Simsen and Lobo (SIMSEN; LOBO, 2012) are similar to the one obtained in this work, while lower than those verified by Dantas and Sfredo (DANTAS; SFREDO, 2015).

Sc- $\text{CO}_2$  have been considered as an alternative method for essential oil extraction. The Sc- $\text{CO}_2$  extraction yield varied from 1.5 to 2.9 %, being similar to  $X_0$  of HD dried leaves ( $p < 0,05$ ), to the Sc- $\text{CO}_2$  extracts, obtained at 15 MPa and temperatures of 45 and 55  $^\circ\text{C}$  as well at 20 MPa and 45  $^\circ\text{C}$ . However, it is smaller when compared to  $X_0$  obtained in the condition of 25 MPa, at 45 and 55  $^\circ\text{C}$ . Like  $X_0$  of HD results, the data from this work for  $X_0$  obtained by Sc- $\text{CO}_2$  was higher than verified in the

literature (OZEK; BOZAN; BASER, 1998; CAREDDA et al., 2002; DE CORATO et al., 2010; IVANOVIC et al., 2010). The difference in the yields obtained can be explained by the natural difference of the raw material, since the essential oils are part of the plant metabolism and, therefore, they are in constant fluctuation, besides the external factors, like moment of the development, growth or schedule and plant harvest day, in addition, the moisture of the raw material (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

CO<sub>2</sub> solvation power depends on its density, which increasing pressure at constant temperature and decreasing with the temperature at constant pressure (BRUNNER, 1994). This behavior can be observed in **Table 4.1**, with the increase of the extraction yield at higher pressures under isothermal conditions (45 °C or 55 °C). Otherwise, a temperature increase at constant pressure provides two opposite effects: reduction of solvent (CO<sub>2</sub>) power due to density decrease; while also increases solutes vapor pressure, facilitating its transfer to the supercritical phase (BRUNNER, 1994). The Sc-CO<sub>2</sub> yields presented in **Table 4.1** and **Figure 4.2** suggest that the crossover-region was reached. At 15 MPa, a negative effect of temperature is noticed on X<sub>0</sub>, what is caused by the reduction of solvent density. Otherwise, at 20 and 25 MPa, the yield increases at higher temperatures, indicating the predominance of solute vapor pressure in the solubility (BRUNNER, 1994).

**Figure 4.2.** Isotherm curves for the global yield of laurel leaves extracts obtained by Sc-CO<sub>2</sub>.



### 4.1.3 Chemical profile of the laurel leaves extracts

In order to evaluate the effect of extraction methods in the chemical profile, an analytical procedure was applied to detect differences in extract procedures by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Table 4.2** presents the compounds identified from the various laurel leaves extracts. As it can be observed, 23 compounds were identified in the essential extractions of laurel leaves.

Oxygenated monoterpenes were the major class in HD, SOX, and UAE extraction methods, i.e, 1,8-cineole and D-limonene, besides other monoterpenes as eugenol, methyl eugenol, acetyl eugenol, 3-carene and aromatic hydrocarbons, like  $\alpha$ -pinene, **Table 4.2**. The HD extract is rich in monoterpenes, with 86 % of the compounds identified, as expected, while the SOX extract has only 21 %. the UAE extract obtained 61 % of monoterpenes, being superior to the SOX extract, in one more characteristic.

The EO composition can vary according to climate, plant age, soil composition and the plant organ from which the oil was extracted (BURT, 2004; WASEEM; LOW, 2015). Although the major compounds in EO can vary, several studies have shown that the major compounds of laurel leaves EO are oxygenated monoterpenes, corroborating with the results of this work (OZEK; BOZAN; BASER, 1998; CAREDDA et al., 2002; IVANOVIC et al., 2010).

On the other hand, the Sc-CO<sub>2</sub> extracts had a high concentration of  $\alpha$ -tocopherol, 3-tetradecyn-1-ol, and D-limonene, compounds that act in synergy with other compounds, such as hydrocarbons, in the antioxidant activity (MARTEAU et al., 2014).

The 1,8-cineole only was identified in Sc-CO<sub>2</sub> extracts at 20 MPa, it is possible that volatilization of this component occurred under conditions of temperature and pressure studied in the supercritical extraction, because essential oils, in general, are very soluble in compressed carbon dioxide and their solubility increases a result of the rapid rise of the density of the carbon dioxide (RICHTER; SOVOVÁ, 1993; FRANCISCO; SIVIK, 2002).

**Table 4.2:** Chemical profile (GC-MS) of laurel leaves extracts obtained by different extraction techniques (Hydrodistillation - HD, Soxhlet – SOX (hexane), Ultrasound-assisted extraction – UAE (hexane), Supercritical CO<sub>2</sub> - Sc-CO<sub>2</sub>).

Chemical Compounds	RT <sup>1</sup> (min)	Relative area (%) <sup>2</sup> of extracts									
		HD dried	HD fresh	SOX hx	UAE hx	Sc-CO <sub>2</sub> 15 MPa 45 °C	Sc-CO <sub>2</sub> 15 MPa 55 °C	Sc-CO <sub>2</sub> 20 MPa 45 °C	Sc-CO <sub>2</sub> 20 MPa 55 °C	Sc-CO <sub>2</sub> 25 MPa 45 °C	Sc-CO <sub>2</sub> 25 MPa 55 °C
		3,5,5-Trimethylhexyl acetate	3.09					4.5			
2,5,5-Trimethyl-2-Hexene	3.25			10.2	6.2	19.7	5.4	9.1	8.3	11.4	10.3
3,5,5-Trimethyl-2-Hexene	3.36		0.1		1.7	5.6	1.5	2.6	2.2	3.2	2.6
α-Pinene	5.32	2.70	0.6								
Pyrrolidine	5.54			2.0	1.3	4.3		1.9		2.4	2.2
1-Isopropyl-4-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene	6.32	8.3						4.1			
β-Pinene-(1S)-(-)	6.42	3.1	1.1					1.1			
<b>1,8-Cineole (eucalyptol)</b>	<b>8.05</b>	<b>41.4</b>	<b>18.0</b>	<b>4.50</b>	<b>5.3</b>			<b>11.9</b>	<b>2.9</b>		
3-Carene	10.46	18.4	15.8	7.1	7.6						
D-Limonene	20.67	21.6	32.4	9.1	9.7	4.5		4.4	4.5	6.6	7.4
Eugenol	20.98		1.0		2.7						
Methyleugenol	22.98	4.5	13.1		1.4	1.3				2.6	
Dodecamethyl pentasiloxane	27.04			5.1							



Acetyeugenol	27.88			34.1							
3-Amino-2-phenazinol	33.44		5.2	2.1			1.6				
1,1,1,5,7,7,7-Heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	39.06		4.2				2.7				
3-Tetradecyn-1-ol	50.51		1.8	1.9	13.2			11.4		14.8	16.4
2,4-Undecadien-1-ol	50.53						15.9		25.9		
3-methyl-4-methylidenebicyclo[3.2.1]oct-2-ene	52.30							7.3			
10.12-Octadecadiynoic acid	52.31						10.4				
N-[2,6-dimethyl-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]-1,1,1-trimethyl silanamine	60.48		4.9	2.2							
Hexadecamethyl heptasiloxane	63.95		8.2	2.3			8.5				
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	<b>79.60</b>		<b>3.5</b>	<b>8.0</b>	<b>39.0</b>	<b>30.0</b>	<b>31.5</b>	<b>51.40</b>	<b>38.0</b>	<b>47.0</b>	
Total (%)	-	100.0	82.1	65.8	86.5	92.1	76.0	85.3	95.2	79.0	85.9
Others (%)	-	-	17.9	34.2	13.5	7.9	24.0	14.7	4.8	21.0	14.1

<sup>1</sup>Retention time; <sup>2</sup>Peak area relative to internal standard peak area in total chromatogram (GC–MS).

On **Table 4.2**, we found high relative area perception of  $\alpha$ -tocopherol in the Sc-CO<sub>2</sub>, varying from 30 to 51.4 %. It was observed that the increase in temperature, at constant pressure, increased the percentage relative area of  $\alpha$ -tocopherol by 20 and 25 MPa, indicating that the extraction of this component was favored by the increase in the vapor pressure, whereas the increase of pressure, at constant temperature, was only favorable at 55 °C. The best result for extraction of  $\alpha$ -tocopherol was at 20 MPa and 55 °C.

$\alpha$ -tocopherol is a fat-soluble antioxidant naturally present in foods of plant origin, especially in those with dark green coloration, as laurel leaves. This compound was identified in the laurel leaves by others authors (DEMO et al., 1998; GÓMEZ-CORONADO; BARBAS, 2003; GÓMEZ-CORONADO et al., 2004; OUCHIKH et al., 2011; DIAS et al., 2014), can be the laurel leaves a source for extracting of this component.

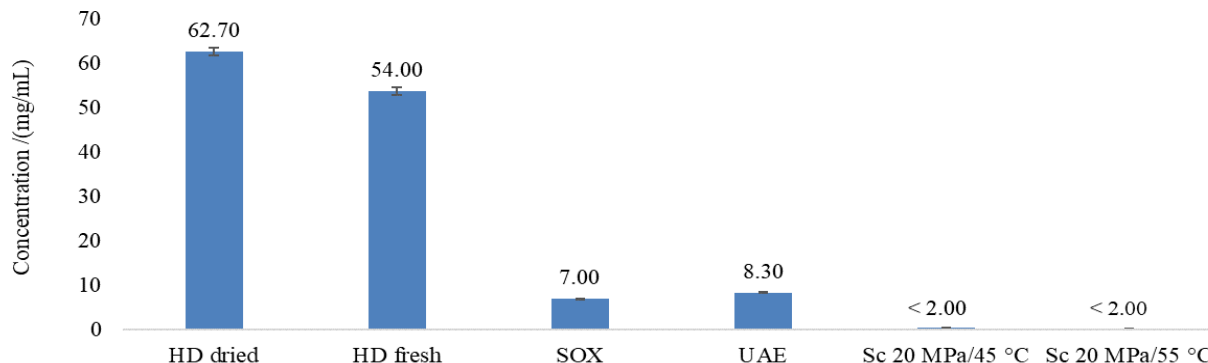
A comparison of the chemical composition of the Sc-CO<sub>2</sub> extracts and HD, SOX and UAE extracts revealed significant differences. Ivanovic et al. (IVANOVIC et al., 2010) also found that the extracts from the Sc-CO<sub>2</sub> had a lower amount of 1,8-cineole in comparison to that of hydrodistillation and more than two times lower concentration of monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes in comparison to HD, similar to this work.

As can be observed at **Table 4.2**, D-limonene is identified in all extracts. This compound is the main precursor of carvone, a terpene ketone with odoriferous and herbal properties widely used by the food industry on food flavoring, cakes, confectionery, and liquor factory (EHLERT et al., 2013).

#### 4.1.4 Quantification of 1,8-cineole

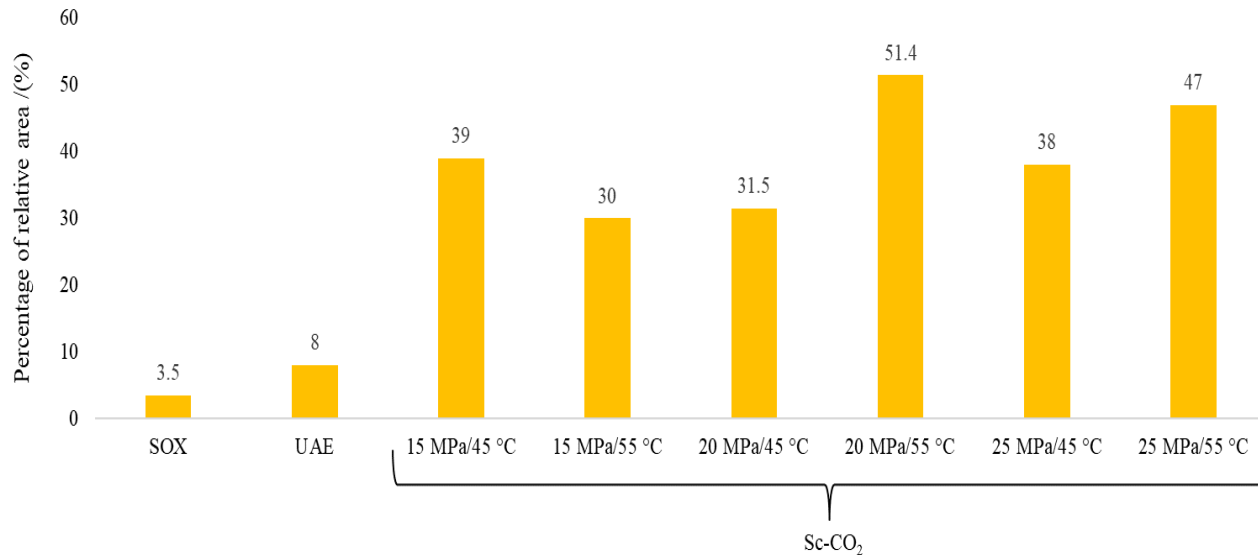
**Figure 4.3** shows the determined content of 1,8-cineole present in laurel leaves extracts from HD, SOX, UAE and Sc-CO<sub>2</sub> extractions. As it can be observed, a higher amount of 1,8-cineole was obtained at HD extraction. The 1,8-cineole content of dried laurel leaves (62.70 mg.mL<sup>-1</sup>) was higher than fresh sample (54.00 mg.mL<sup>-1</sup>), confirming the importance of drying for a higher yield. These results correspond to a yield of 0.09 and 0.01 % (m/m), respectively, considering the amount of raw material (laurel leaves) used in the extraction.

**Figure 4.3:** 1,8-cineole quantification on laurel leaves of extracts by different extraction techniques (Hydrodistillation - HD, Soxhlet - SOX, Ultrasound-assisted extraction - UAE, Supercritical CO<sub>2</sub> - Sc-CO<sub>2</sub>).



The UAE and SOX extractions presented the 1,8-cineole concentration of 8.30 mg.mL<sup>-1</sup> and 7.00 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively, with yield, approximately, of 0.05 % (m/m), **Figure 4.3**. Therefore, there is no difference between these methods when considering 1,8-cineole. The quantification of  $\alpha$ -tocopherol in these extracts is 3.5 and 8.0 % in relative area, respectively, as can be observed at **Figure 4.4**. The UAE extract obtained higher quantification of  $\alpha$ -tocopherol when compared to SOX. Extracts obtained by probe sonication of tocopherol contents of Tunisian *Laurus nobilis* vegetative organs were quantified, with the highest amount of tocopherol found in the leaves, corroborating the results of this work (OUCHIKH et al., 2011).

**Figure 4.4:**  $\alpha$ -Tocopherol percentage of relative area on SOX, UAE and Sc-CO<sub>2</sub> extracts of laurel leaves by different extraction techniques.



The Sc-CO<sub>2</sub> extract obtained at 55 ° C and 20 MPa presented 51.4 % in the relative area of  $\alpha$ -tocopherol, indicating the predominance of this component in more than 50 % of the identified compounds, followed by the extract obtained at 55 ° C and 25 MPa.

$\alpha$ -Tocopherol is a group belonging to vitamin E, predominant in olive, wheat germ, and sunflower oils (KARMOWSKI et al., 2015). The antioxidant activity of vitamin E is due to its ability to donate phenolic hydrogen to lipid-free radicals and to retard autocatalytic lipid peroxidation process. Several studies suggest that vitamin E may contribute to lower the risks of specific chronic and degenerative diseases such as Alzheimer, age-related macular degeneration, some types of cancer, cataracts and ischemic heart disease (BAKHOUCHE et al., 2015).

Therefore, the GC/MS results show that the different extraction techniques interfered in the characteristics and quantities of the chemical compounds obtained from the laurel leaves.

#### 4.1.5 Total phenolic compounds and antioxidant activity

**Table 4.3** shows the determination of total phenols content (TPC) and total antioxidant activity (DPPH method) of laurel leaves extracts, as well as the percentage of relative area of 1,8-cineole and tocopherol. The EC<sub>50</sub> values from DPPH assay represent the required concentration for an antioxidant to scavenge 50 % of initial DPPH free radical concentration. The results were compared to the synthetic product butylated hydroxytoluene (BHT), used as standard.

The SOX and UAE extracts have amounts of 1,8-cineole and  $\alpha$ -tocopherol relatively balanced and presented the best results for both the TPC and the EC<sub>50</sub>, being the ones closest to the results obtained for the BHT, synthetic antioxidant commonly known. The other extracts presented similar TPC results, with no significant difference between low and high pressure techniques.

Temperature and pressure conditions on Sc-CO<sub>2</sub> showed no significant effect on the TPC of the extracts. The extraction of polar compounds, such as phenolics, in supercritical extraction is favored when a polar cosolvent is used, since these are less soluble in CO<sub>2</sub> (TSAO; DENG, 2004; DÍAZ-REINOSO et al., 2006). The TPC values of the extracts ranged from 21.5 ± 5.0 to 47.0 ± 00 mg GAE.g extract<sup>-1</sup>. TPC value of *Laurus nobilis* L. obtained by Ouchikh et al. (OUCHIKH et al., 2011) was 20.94 ± 0.97 mg GAE/g supercritical extract, similar to those found by this work.

**Table 4.3:** Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity ( $EC_{50}$ ) of laurel leaves extracts compared to the amount of 1,8-cineol and  $\alpha$ -tocopherol.

Extraction techniques	Relative area 1,8-cineole (%)	Relative area $\alpha$ -tocopherol (%)	TPC <sup>(1)</sup> (mg GAE/g extract)	$EC_{50}$ <sup>(2)</sup> ( $\mu$ g/mL)	
HD <sup>(dried)</sup>	41.4	-	22 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	-	
SOX-hexane	4.5	3.5	28 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	60 $\pm$ 4 <sup>f</sup>	
UAE-hexane	5.3	8.0	47 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	28 $\pm$ 1 <sup>g</sup>	
Sc-CO <sub>2</sub>	15 MPa 45 °C	-	39.0	25 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	258 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>
	15 MPa 55 °C	-	30.0	21 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	270 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
	20 MPa 45 °C	11.9	31.5	28 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	145 $\pm$ 8 <sup>e</sup>
	20 MPa 55 °C	2.9	51.4	24 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	226 $\pm$ 3 <sup>bc</sup>
	25 MPa 45 °C	-	38.0	28 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	179 $\pm$ 3 <sup>de</sup>
	25 MPa 55 °C	-	47.0	29 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	196 $\pm$ 17 <sup>dd</sup>
	BHT <sup>(3)</sup>	-	-	69 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 1 <sup>h</sup>

<sup>(1)</sup>TPC: Total phenolic compounds; <sup>(2)</sup> $EC_{50}$ : effective concentration; <sup>(3)</sup>BHT: butylhydroxytoluene. Different superscript letters mean groups statistically different ( $p < 0.05$ ) in each column.

The HD extract, which has the highest amount of 1,8-cineole and does not have  $\alpha$ -tocopherol, did not provided a promising result for TPC. The result found for the  $EC_{50}$  was very high, so it was disregarded. While Sc-CO<sub>2</sub> extracts showed a better result for  $EC_{50}$ , especially the extract containing both 1,8-cineole and  $\alpha$ -tocopherol, obtained at 45 °C and 20 MPa. These results corroborate with the understanding that the antioxidant activity is strengthened by the synergy between chemical compounds.

Although phenolic compounds are the main natural antioxidants, they are not the only class of substances that contribute to antioxidant performance of natural products (CHEYNIER, 2012). The  $EC_{50}$  values of the Sc-CO<sub>2</sub> extracts show a moderate antioxidant potential compared to de BHT (14  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), ranged from 145.0  $\pm$  8.0 to 270.5  $\pm$  6.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

Furthermore, a positive effect of the pressure in the antioxidant potential was verified in the data from **Table 4.3**.

According to Dias et al. (DIAS et al., 2014),  $EC_{50}$  values of laurel leaves obtained by infusion methods and by solvent extraction ranged from 90 to 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , similar to those found for Sc- $\text{CO}_2$  extracts.

The results of this work indicate that higher isolated concentrations of 1,8-cineole and  $\alpha$ -tocopherol did not contribute to the increase of the antioxidant activity. However, extracts with absence of 1,8-cineole and presence of  $\alpha$ -tocopherol presented antioxidant activity. Therefore, laurel leaves extracts with a richer variety of composition profiles are more promising for bioactive activity.

#### 4.1.6 CONCLUSION

The results demonstrated that the extraction method affects the yield, chemical composition, phenolic compounds and antioxidant activity of laurel essential oil. In terms of extraction yield, SOX presented the best result and UAE extract the greater antioxidant activity, confirming the importance of the synergy of chemical components.

In relation to the extract composition, Sc- $\text{CO}_2$  extracts revealed significant differences from HD, SOX and UAE extracts. The extract obtained by hydrodistillation presented the highest amount of 1,8-cineole and oxygenated monoterpenes.

On the other hand, the process parameters used for the supercritical fluid extraction favored the extraction of  $\alpha$ -tocopherol. However, no correlation between the relative area of  $\alpha$ -tocopherol and antioxidant activity was verified.

These findings also suggest that the leaves of *Laurus nobilis* L. can represent a valuable source of several bioactive compounds, both for biomedical, cosmetic or pharmaceutical applications, as well as to be used as food ingredients.

## 4.2 Ultrasound-assisted emulsion of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) encapsulated by SFEE

### 4.2.1 Emulsions stability

The stability of the emulsions is evaluated by the hydrodynamic size of the emulsion droplets (Dg) and polydispersity index (PdI), evaluated at time 0 and at 24h, as described in **Table 4.4**. As presented in section 2.4, Dg and PdI were observed at 0, 1, 2, 3, 4 and 24 hours of emulsion. Considering the final storage values (24 h), Dg ranged from 239.5 to 357.0 nm, indicating the formation of oil-in-water miniemulsions (O/W). The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) defines miniemulsion when droplets diameters of the dispersed phase lay between 50 nm and 1  $\mu\text{m}$  (SLOMKOWSKI et al., 2011).

High-quality miniemulsions were produced with laurel essential oil, which were evaluated by the PdI, reaching values from 0.20 to 0.36 (24 h). Also, from time 0 to 24 h, for all assays, very low variations in PdI ( $p < 0.05$ ) were detected (**Table 4.4**). This data (PdI) reveals the homogeneity of the dispersion (miniemulsion). Values close to 0.1 indicate dispersion with low distribution, while measurements near 1.0 indicate low quality emulsions (polydispersed system) (JAFARI et al., 2008), that is, the low PdI values from the present work represent an homogeneous system (AGUIAR et al., 2016a; REÁTEGUI et al., 2017). Otherwise, polydispersed systems with high PdI form unstable emulsions (not homogeneous) due to the aggregation of smaller droplets into larger droplets, resulting in phase separation (TADROS et al., 2004; LEONG et al., 2009).



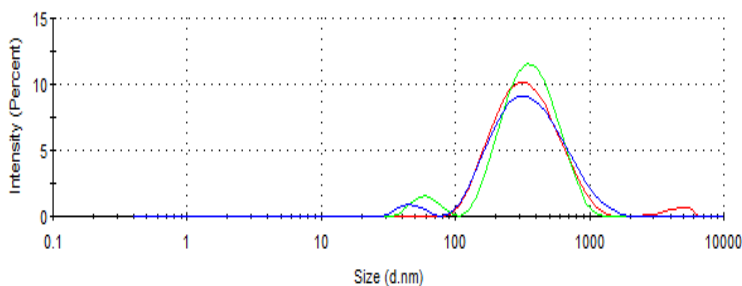
**Table 4.4:** Parameters for emulsion formation and stability.

Emulsions	<sup>(1)</sup> C <sub>eo</sub>	<sup>(2)</sup> t <sub>s</sub>	<sup>(3)</sup> Dg (nm)	<sup>(3)</sup> Dg (nm)	<sup>(4)</sup> PdI	<sup>(4)</sup> PdI
	(mg/mL)	(min)	0 h*	24 h*	0 h**	24 h**
1	6	2	210.0 ± 2.0 <sup>f</sup>	239.5 ± 2.0 <sup>h</sup>	0.204 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.213 ± 0.002 <sup>a</sup>
2	6	4	317.0 ± 2.0 <sup>c</sup>	287.0 ± 3.0 <sup>e</sup>	0.202 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.254 ± 0.009 <sup>b</sup>
3	6	6	308.0 ± 3.0 <sup>cd</sup>	297.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.282 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.235 ± 0.009 <sup>a</sup>
4	9	2	315.0 ± 2.0 <sup>c</sup>	318.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.392 ± 0.058 <sup>a</sup>	0.298 ± 0.044 <sup>a</sup>
5	9	4	297.0 ± 6.0 <sup>d</sup>	291.0 ± 3.0 <sup>de</sup>	0.273 ± 0.033 <sup>a</sup>	0.255 ± 0.016 <sup>a</sup>
6	9	6	249.0 ± 3.0 <sup>e</sup>	256.5 ± 1.0 <sup>g</sup>	0.297 ± 0.019 <sup>b</sup>	0.214 ± 0.003 <sup>a</sup>
7	12	2	465.0 ± 9.0 <sup>a</sup>	357.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	0.380 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.365 ± 0.035 <sup>a</sup>
8	12	4	259.0 ± 6.0 <sup>b</sup>	279.0 ± 1.0 <sup>f</sup>	0.257 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.281 ± 0.012 <sup>b</sup>
9	12	6	250.0 ± 2.0 <sup>e</sup>	312.0 ± 2.0 <sup>c</sup>	0.199 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.256 ± 0.001 <sup>b</sup>

<sup>(1)</sup>C<sub>eo</sub> = laurel essential oil concentration; <sup>(2)</sup>t<sub>s</sub> = sonication time; <sup>(3)</sup>Dg = hydrodynamic size of the emulsion droplets expresses as mean value with standard deviation; <sup>(4)</sup>PdI = polydispersity index; \*Equal letters do not differ significantly (p<0.05); \*\* Equal letters do not differ significantly (p<0.05) on the same line.

Additionally, **Figure 4.5** represents the  $D_g$  distribution with particle size for the emulsion produced by assay 8 (triplicate analysis). Although the  $D_g$  distribution is bimodal (two peaks), the reference particle size was defined by the largest peak, which represents the highest amount of particles within this  $D_g$  (LINAK et al., 2002), confirming the low dispersibility of the droplet sizes (PDI results) presented in **Table 4.4**.

**Figure 4.5:** Hydrodynamic size distribution of emulsion droplets ( $D_g$ ) for assay 8 (the lines represent the triplicate of the analysis).



The miniemulsions produced by assays 2, 3, 5 and 7 showed low  $D_g$  reduction after 24 h of sonication when compared to the initial  $D_g$ , with small PDI variation ( $p < 0.05$ ) between 0 and 24 h (**Table 4.4**), indicating homogeneous emulsions (ZENG; XIN; ZHANG, 2017). This behavior may have occurred due to the incomplete solubilization of the oil in the emulsifier at time 0 min, probably because the equilibrium between the hydrophilic and lipophilic groups was not reached to ensure complete saturation of the molecules of the materials (SILVA et al., 2016). It is also possible that the oil fraction that initially had a larger droplet size and therefore was not so well stabilized could have segregated from the emulsion and, as a result, leaving only the initial fraction with smaller droplet size.

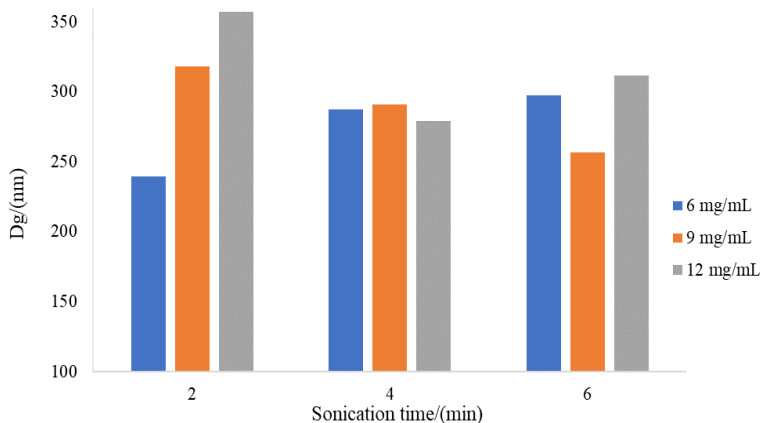
Otherwise, the assays 1, 4, 6, 8 and 9 showed small enhancement in  $D_g$  after 24 h, although with very low PDI variation with time ( $p < 0.05$ ), still configuring formulations with high stability.

According to Solans et al. (2005), emulsions with reduced droplet size are obtained after complete solubilization of the oil phase in the emulsifier. The same behavior was detected for emulsions of Copaiba oleoresin, stabilized with modified starch and produced by ultrasonic

probe, at 2, 4, 6 and 8 min, with no phase separation after 24 h, indicating high stability (REÁTEGUI et al., 2017).

The effect of  $t_s$  and  $C_{eo}$  in  $D_g$  is observed in **Figure 4.6**. At  $C_{eo}$  of 6 mg/mL we observe an increase in  $D_g$  with enhancing  $t_s$ , with the best result at  $t_s$  of 2 min providing  $D_g$  of 297 nm. This behavior, with enhancing sonication time, may have occurred due to a particle reassembly, a phenomenon known as "overprocessing". It means that for the lower  $C_{eo}$ , the smaller  $t_s$  was sufficient to provide cavitation effect in order to reduce the size of the emulsion particles (SILVA et al., 2016).

**Figure 4.6:** Hydrodynamic size ( $D_g$ ) of the emulsion droplets as a function of sonication time ( $t_s$ ) and essential oil concentration in the emulsion ( $C_{eo}$ ).



At  $C_{eo}$  of 9 mg/mL, the increase in  $t_s$  favored the reduction of  $D_g$ , as expected, although, no considerable particle reduction was detected with increasing  $t_s$ . It means that, at this concentration, the relation  $C_{eo}/C_{Hi-Cap}$  (3:10) favored the effects of cavitation. Leong et al studied the effect of oil concentration on the average droplet diameter of emulsions and noted that an optimum oil weight fraction of 2.5 % (wt) generating the smallest particle size, occurring increasing average droplet diameter of emulsions in other oil concentrations.

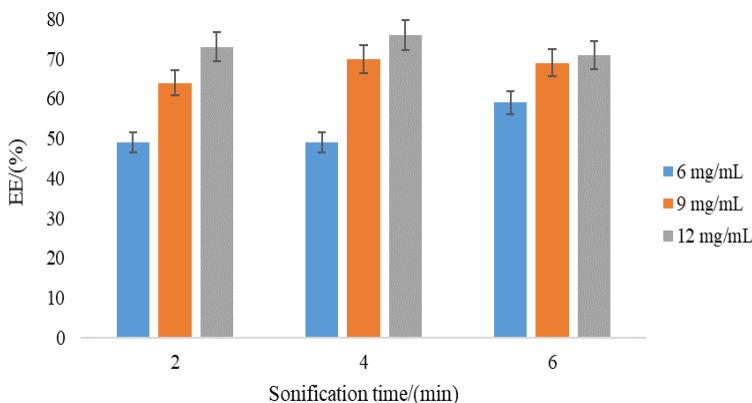
For the higher  $C_{eo}$  (12 mg/mL) the  $t_s$  of 4 min was the most adequate for the decrease of  $D_g$ , it was observed that the  $t_s$  of 2 min was not sufficient for the occurrence of cavitation effects, and for  $t_s$  of 6 min occurred "overprocessing", although, with a low variation in  $D_g$  (from 4

to 6 min). Probably, at high emulsion concentrations, other factors may take place, such as physicochemical properties of the essential oil and the modified starch, making it difficult to observe the effect of process variables. Therefore, based on Dg values, the sonication time suggested is 4 min, which provides good Dg for all emulsion concentrations. Similar results were found by Levaí et al. (2015) (LÉVAI et al., 2015) for the production of quercetin aqueous suspensions by SFEE, with 4 min as the optimum emulsification time, with larger droplet sizes, for either low emulsification time (incomplete system homogenization) or high emulsification time (increase droplet size probably due to particle coalescence or temperature effects).

#### 4.2.2 Influence of $C_{eo}$ on efficiency of encapsulation (EE)

The miniemulsions were formed to encapsulate laurel essential oil in Hi-Cap by SFEE, and the effect of  $C_{oe}$  on the efficiency of encapsulation (EE), determined by the 1,8-cineole, was observed. The EE results, obtained varying  $C_{oe}$  for different sonication time, varied from  $48.9 \pm 2.4$  % to  $75.5 \pm 3.8$  %, as shown in **Figure 4.7**.

**Figure 4.7:** Influence of  $C_{eo}$  on efficiency of encapsulation.



The increase in  $C_{eo}$  from 6 to 9 mg/mL favored EE, for all  $t_s$ , while from 9 to 12 mg/mL no significant difference ( $p < 0.05$ ) was detected, except for  $t_s$  of 2 min. The EE enhancement with  $C_{eo}$  (from 6 to 9 mg/mL)

was probably caused by the higher essential oil availability for the nucleation inside the droplets and/or to the supercritical CO<sub>2</sub> saturation with the organic solvent. From 9 to 12 mg/mL, no significant difference in EE was probably caused by reaching the encapsulation limit at 9 mg/mL. Therefore, the results suggest that, to provide high EE, the C<sub>eo</sub> of 9 or 12 mg/mL are the adequate concentrations for the CO<sub>2</sub> flow rate (1 mL/min: 1 kg/h) applied in the present work.

Similar results were found for the production of quercetin suspensions by SFEE, with precipitation mainly depended on the initial quercetin concentration, which is determinant for an antisolvent precipitation (LÉVAI et al., 2015).

#### 4.2.3 Extraction efficiency of organic solvent

The removal of the organic solvent (DCM) from the emulsion, without eliminating the active compound and the encapsulating agent, favored the entrapment, and this step (supercritical drying) is a challenge for the SFEE viability. Also, the extraction capacity of supercritical CO<sub>2</sub> is attributed to its high solvation power and diffusion coefficient, low surface tension and viscosity, associated with the limit of the saturation concentration of the solute (DCM) in the CO<sub>2</sub> (BRUNNER, 1994b). Therefore, it is necessary higher affinity of the organic solvent with supercritical CO<sub>2</sub>, compared to the active compound (1,8-cineole) and the entrapment agent (Hi-Cap), to allow the solute encapsulation.

After SFEE, the DCM residual content from the encapsulated particles was below 1 ppm, for all assays. This result was achieved by SFEE at 100 bar and 40°C, warranting DCM-CO<sub>2</sub> system at supercritical phase, as presented by Corazza et al. (CORAZZA et al., 2003). This low residual content is also attributed to the drying step of the SFEE (30 min, as presented in section 2.5), which was larger than that used by other authors (MEZZOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2012), enabling high DCM removal.

This residual DCM amount is below the limit steadied by several regulatory agencies, for instance, 400 ppm for United States Pharmacopoeia, while for the Brazilian “National Sanitary Surveillance Agency” (ANVISA), of the Pharmacopoeia of the Republic of China, for the European Pharmacopoeia, and by the International Conference on Harmonization (ICH), the DCM limit is 600 ppm (ELVASSORE; BERTUCCO; CALICETI, 2001; AGUIAR et al., 2016b). Similar results, with 1 ppm of residual solvent concentration, were also obtained for co-precipitation of *trans*-resveratrol in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate) (PHBV) (DAL MAGRO et al., 2017), using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique.

#### 4.2.4 Mean particles size and morphology

The mean particles size ( $D_p$ ), measured after freeze-drying for all suspensions, varied from 38 to 90  $\mu\text{m}$ . The  $D_p$  results from the freeze-dried suspensions was in the magnitude order of  $\mu\text{m}$ , compared to  $D_g$  in nm (**Table 4.4**). The increase in  $D_p$  compared to  $D_g$  was significant ( $p < 0.05$ ) for all assays, probably due to Hi-Cap solidification, which is water soluble. Therefore, the increase in  $D_p$  was probably caused by a significant fraction of the solid Hi-Cap solubilized in water suspension, enabling the irreversible fusion of the particles, during to the suspension drying (solidification step), and resulting in particles aggregation (ABDELWAHED et al., 2006). This enhancement observed in  $D_p$ , after freeze-drying, does not contribute to droplet size measurements obtained by SFEE because is due to the particles aggregation during suspension drying. Studies found in the literature suggest that the suspension particle size is dependent on the hydrodynamic size of the emulsion droplets (CHATTOPADHYAY; HUFF; SHEKUNOV, 2006; MATTEA et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

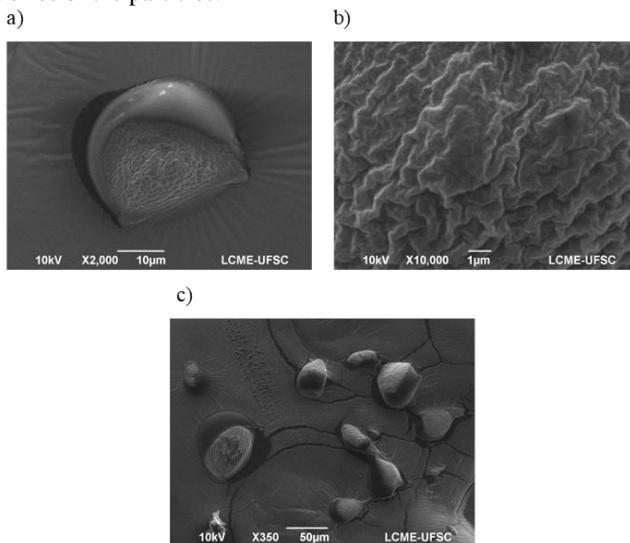
Similar result was reported by Mattea et al. (MATTEA et al., 2009), by scanning electron microscopy of freeze-dried particles of  $\beta$ -carotene encapsulated in Hi-Cap 100. The authors attribute the increase in the particle size during freeze-dried to starch precipitation. Aguiar et al. (2016a) also observed the increase in freeze-dried particles obtained by pepper oleoresin encapsulation in Hi-Cap, by SFEE.

Scanning electron microscopy was performed for the freeze-dried suspensions, and the results are showed in **Figure 4.8**. The characteristics of the particles are similar for all samples, with oval aspect, wrinkled and compact (without pores). This feature is probably attributed to the encapsulation agent (Hi-cap), indicating that the dried particles entrapped the essential oil inside the Hi-cap.

Works found in the literature describe similarity the morphological characteristics between the particles and the encapsulating agent (REZENDE et al., 2003; SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; DE PAZ et al., 2013; SILVA et al., 2016). Particles with morphological structures without pores guarantee a small permeability to gases, higher protection and retention of volatile compounds, such as 1,8-cineole (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005).

Considering the variables studied, assay 8 presented the best results in terms of EE. Therefore, the freeze-dried particles from assay 8 were selected for further analysis to describe its characteristics, indicating the effectiveness of the encapsulation process of the laurel essential oil in Hi-Cap. The analysis of PXDR and DSC are presented in the sequence.

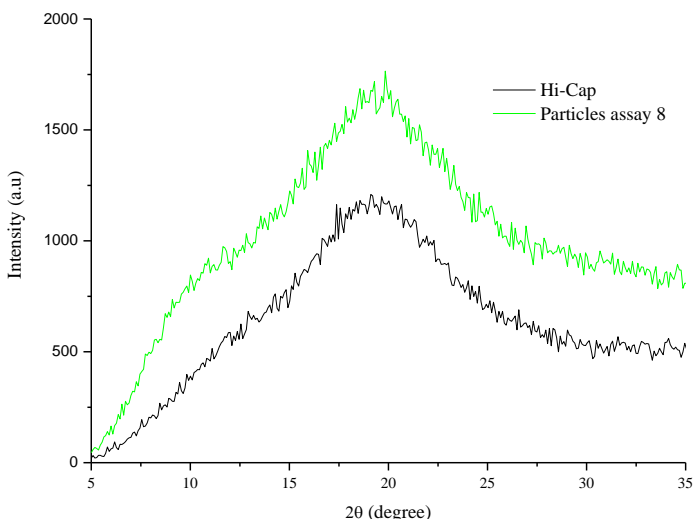
**Figure 4.8:** Scanning electron microscopy of SFEE particles obtained at 10 MPa and 40 °C: a) particle with oval aspect; b) wrinkled structure of the particle; c) different sizes of the particles.



#### 4.2.5 Powder X-ray diffraction (PXRD)

**Figure 4.9** shows the PXRD profile of freeze-dried particle from assay 8, compared to non-processed Hi-Cap. Both samples have amorphous aspect due to the broad peak pattern, with different intensities. The starch granules, formed by amylose and amylopectin, can be arranged in a semicrystalline structure forming a matrix of starch granules with alternating amorphous (amylose) and crystalline (amylopectin) material, which is known as the growth rings (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015).

**Figure 4.9:** PXRD of non-processed Hi-Cap and the particles from assay 8.



In the amorphous region, the molecules are distant from each other, facilitating water penetration, resulting in increased solubility and lower thermal stability (BILIADERIS, 1992). Therefore, compounds in the amorphous or partially crystalline form promote a fastest therapeutic effect due to the increase in its dissolution rate, providing higher absorption (SUN et al., 2012).

The studies by Mezzomo et al. (2012) and by Santos et al. (2012), which used Hi-Cap as an encapsulation agent for different active compounds, resulted in encapsulated products with amorphous characteristic, corroborating with the particles produced by this work.

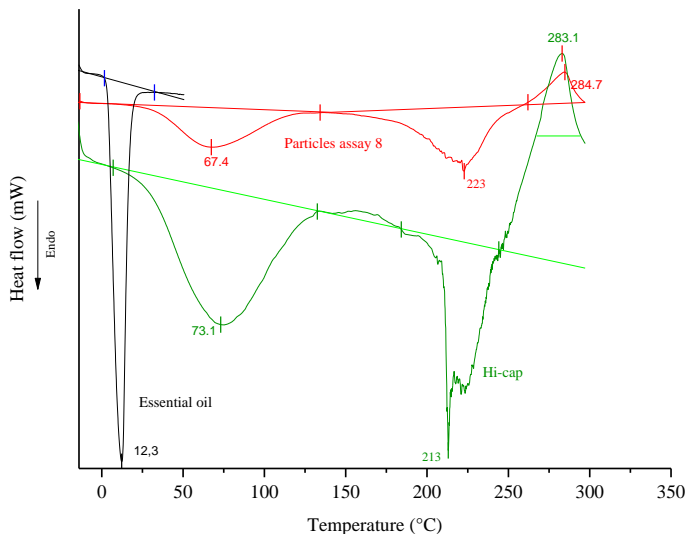
#### 4.2.6 Calorimetric profile

Differential scanning calorimetry (DSC) combined with PXRD analysis support the evaluation of the encapsulation process. The DSC analysis was performed for the samples of laurel essential oil, Hi-Cap and the produced particles from assay 8, with the results presented in **Figure 4.10**. The endothermic event (DSC profile) for the laurel essential oil indicates a melting point at 12.3 °C. Otherwise, for the Hi-Cap, two endothermic events were detected, at 73.1 and at 213 °C, and an exothermic event at 283.1 °C. The first Hi-Cap event is characteristic of



starch gelation point followed by the second event, characteristic of its decomposition. The exothermic peak is due to starch pyrolysis and depolymerization (MATSUGUMA et al., 2009).

**Figure 4.10:** DSC of laurel essential oil, Hi-Cap non- process, and particles assay 8.



The DSC behavior presented by the freeze-dried particles (assay 8), with events detected at 67.4, 223.0 and 284.7 °C, show variation compared to essential oil and Hi-Cap samples. The absence of the event at 12.3° C (essential oil peak) suggest an effective entrapment of the active compound in Hi-Cap by the SFEE. The same behavior and conclusion was provided by Mezzomo et al. [20] and by Santos et al. (SANTOS et al., 2012), which explain that the absence of DSC peak for the active compound, in SFEE particles, suggests an effective entrapment of the active compound in the encapsulating agent. Similar results were found by Dal Magro et al (DAL MAGRO et al., 2017) for the co-precipitation of *trans*-resveratrol in PHBV by SEDS method.

#### 4.2.7 CONCLUSION

Stable miniemulsions of laurel essential oil in modified starch were obtained by means of an ultrasonic probe. The highest laurel essential oil concentration, with 4 min of sonication time, reduced the hydrodynamic size of the emulsion droplets. The efficiency of encapsulation of the SFEE process was favored by the increase in laurel essential oil concentration. The freeze-drying process caused the particle agglomeration, with particle size increase compared to emulsion droplet size. The final dried particles have amorphous characteristics and the encapsulating agent was able to protect the laurel essential oil during thermal analysis. Therefore, laurel essential oil was properly encapsulated in modified starch by the SFEE. This result represents a progress toward the use of an alternative method (SFEE), to encapsulate a highly volatile mixture (laurel essential oil), protecting this bioactive component.

### 4.3 Encapsulação do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.), caracterização e atividade antimicrobiana das partículas obtidas por SFEE

#### 4.3.1 Eficiência de encapsulação (EE)

Os resultados obtidos para a eficiência de encapsulação (EE) variaram de 80,0 a 56,6 %, em concentração de 1,8-cineol de 2,3 a 1,6 mg/mL, respectivamente. As maiores EE foram obtidas nas menores pressões (90 e 100 bar) aplicadas no processo SFEE, para todas as temperaturas estudadas, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados ( $p < 0,05$ ). As EE dos experimentos do ponto central (100 bar e 40 °C) não apresentaram diferença significativa, indicando boa reprodutibilidade experimental ( $p < 0,05$ ), como pode ser visto na **Tabela 4.5**.

**Tabela 4.5:** Eficiência da encapsulação do processo SFEE.

Suspensões	T <sup>1</sup> (°C)	P <sup>2</sup> (bar)	$\rho\text{CO}_2$ <sup>3</sup> (kg/m <sup>3</sup> )	EE <sup>4</sup> (%)	Concentração em 1,8-cineol (mg/mL)
1	35	90	662,87	80,0 <sup>a</sup>	2,3
2	45	90	338,81	75,3 <sup>a</sup>	2,2
3	35	110	744,85	59,0 <sup>b</sup>	1,7
4	45	110	604,65	56,6 <sup>b</sup>	1,6
5	40	100	629,76	72,0 <sup>a</sup>	2,1
6	40	100	629,76	69,7 <sup>a</sup>	2,0
7	40	100	629,76	72,0 <sup>a</sup>	2,1

<sup>(1)</sup>T = temperatura; <sup>(2)</sup>P = pressão; <sup>(3)</sup> $\rho\text{CO}_2$  = densidade do dióxido de carbônico; <sup>(4)</sup>EE = eficiência de encapsulação.

O processo de encapsulação por SFEE ocorre com a supersaturação do composto ativo (óleo essencial) seguida por uma rápida precipitação, provocadas pela remoção do solvente orgânico (DCM) da emulsão pelo CO<sub>2</sub> supercrítico (MATTEA et al., 2009). Para que o agente de encapsulação envolva o composto ativo é necessário que o CO<sub>2</sub> supercrítico carregue o solvente orgânico, sem remover o composto ativo e/ou o agente de encapsulação, ou seja, a encapsulação somente ocorre com a saída do solvente orgânico.

As pressões e as temperaturas dos experimentos foram definidas por meio dos dados de equilíbrio de fase da mistura binária DCM/CO<sub>2</sub> supercrítico (CORAZZA et al., 2003), levando-se em conta a solubilidade do 1,8-cineol, enquanto principal componente do óleo essencial da folha de louro, em CO<sub>2</sub> supercrítico (FRANCISCO; SIVIK, 2002).

Com isso, garantiu-se que o solvente orgânico também estivesse em fase supercrítica, favorecendo sua solubilidade no CO<sub>2</sub> supercrítico, e dificultou-se a extração do 1,8-cineol pelo fluido supercrítico (AGUIAR et al., 2016a).

Como resultado, o teor residual de diclorometano (DCM) em todas as suspensões obtidas foi menor que 1 ppm, estando bem abaixo dos limites estabelecidos para o consumo humano, previstos pelos órgãos nacional e internacionais já citados no Capítulo 4 (ELVASSORE; BERTUCCO; CALICETI, 2001). Este resultado pode ser atribuído a um conjunto de fatores, citados, que foram considerados para a realização do processo, complementado pelo tempo de secagem de 30 min, chamado de segunda fase do processo SFEE.

Este tempo foi maior do que o utilizado por outros autores que também usaram o DCM na formação da emulsão (MATTEA et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2012). Portanto, as variáveis do processo SFEE foram adequadas para a retirada do solvente orgânico (DCM), promovendo a encapsulação do óleo essencial de louro.

De acordo com a ANOVA, demonstrada na **Tabela 4.6**, a pressão (L) foi o único parâmetro que influenciou a EE ( $p < 0,05$ ) com comportamento inversamente proporcional, indicando que as menores pressões apresentaram as maiores EE. Porém, a EE não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com a diminuição da pressão de 100 para 90 bar, o que pode ter sido limitado pela vazão da emulsão, que foi mantida constante. É provável que, nessas condições de processo, ainda fosse possível disponibilizar uma maior quantidade de emulsão (pelo aumento da vazão) sem prejuízo à remoção do solvente orgânico pelo CO<sub>2</sub> supercrítico e favorecer a EE.

A ANOVA também demonstrou que a variação da temperatura ou sua interação com a pressão não apresentaram efeito significativo na EE ( $p < 0,05$ ). Embora esses resultados possam ser considerados positivos para a EE, é necessário entender que o efeito do aumento da temperatura na EE pode ter sido reduzido pela diminuição da densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, ou seja, a EE não foi afetada devido à diminuição da solubilidade do CO<sub>2</sub> supercrítico. Por outro lado, a facilitação da remoção do solvente orgânico provavelmente foi eficiente devido ao aumento da sua pressão de vapor, promovida pela elevação da temperatura.

**Tabela 4.6:** ANOVA para avaliação dos efeitos das variáveis (T e P) do processo SFEE.

Efeito	SQ <sup>(1)</sup>	F <sup>(2)</sup>	p <sup>(3)</sup>
Temperatura (L) (°C)	12,6025	7,1470	0,116061
Temperatura (Q) (°C)	21,1001	11,9660	0,074368
Pressão (L) (bar)	394,0225	223,4532	0,004445
Interação T x P	1,3225	0,7500	0,477767
Erro puro	3,5267	-	-
SQ <sup>(1)</sup> total	432,5743	-	-

SQ<sup>(1)</sup> = soma dos quadrados; F<sup>(2)</sup> = estatística de teste; p<sup>(3)</sup> = probabilidade.

Considerando que para uma regressão ser estatisticamente significativa é preciso uma avaliação pelo teste de Fisher, foram determinados o  $F_{\text{calculado}}$  e o  $F_{\text{tabelado}}$ , sendo necessário que o  $F_{\text{calculado}}$  seja maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , que foi obtido pela tabela de distribuição de Fisher (BOX; WETZ, 1973; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Ao final, o resultado encontrado do  $F_{\text{calculado}}$  foi 3,16 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , confirmando que os dados estatísticos obtidos foram significativos ao nível de 5 % de confiança, conforme **Tabela 4.7**.

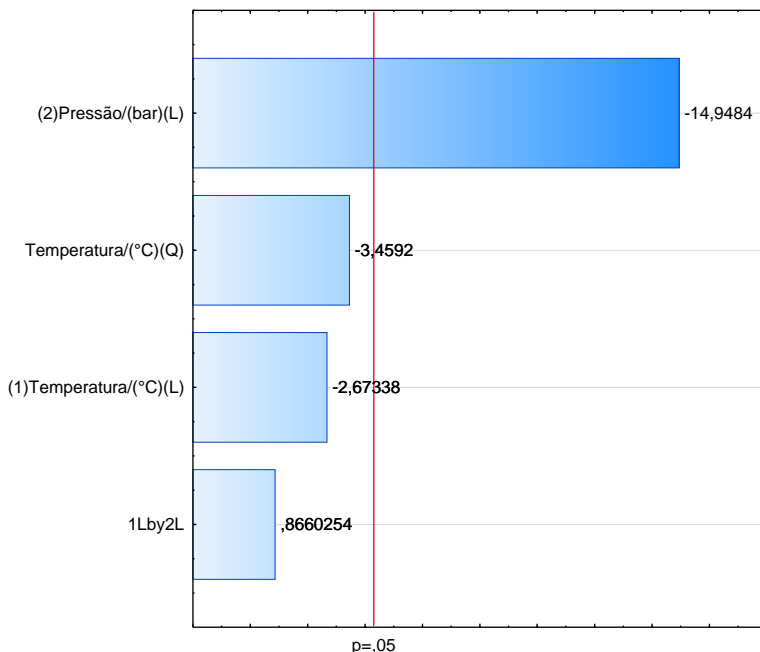
**Tabela 4.7:** Análise de variância para avaliação do teste de Fischer.

	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	MQ <sup>3</sup>	F <sup>4</sup> calculado	F tabelado
Regressão	429,0476	4	107,2619	60,83	19,25
Erro	3,5267	2	1,76335	R <sup>2</sup> : 0,9918	
Total	432,5743	6			

SQ<sup>(1)</sup> = soma dos quadrados; GL<sup>(2)</sup> = grau de liberdade; MQ<sup>(3)</sup> = média quadrática; F<sup>(4)</sup> = teste de Fisher.

Sendo assim, foi possível avaliar os resultados por meio do diagrama de Pareto e da superfície de resposta, como também gerar o modelo preditivo. O diagrama de Pareto, visto na **Figura 4.11**, confirmou que o aumento da pressão resultou em diminuição na EE, contribuindo para as interpretações dos dados.

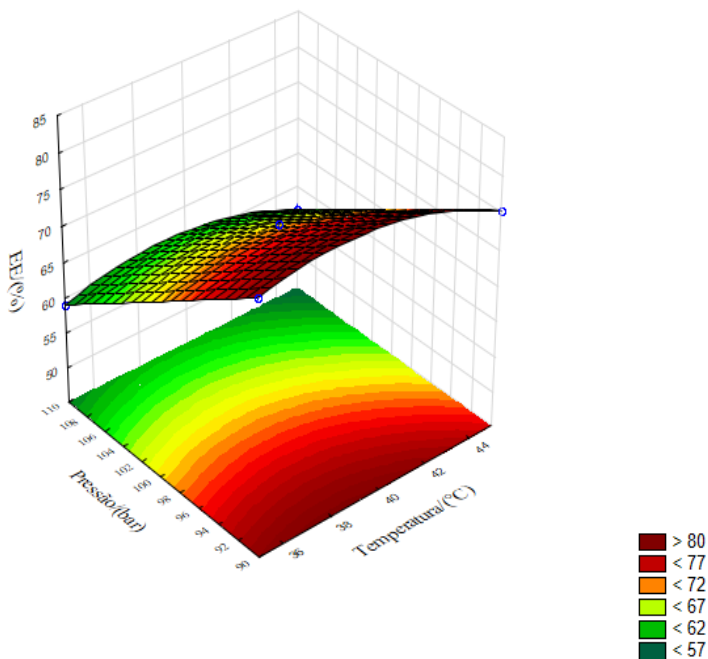
**Figura 4.11:** Diagrama de Pareto referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.



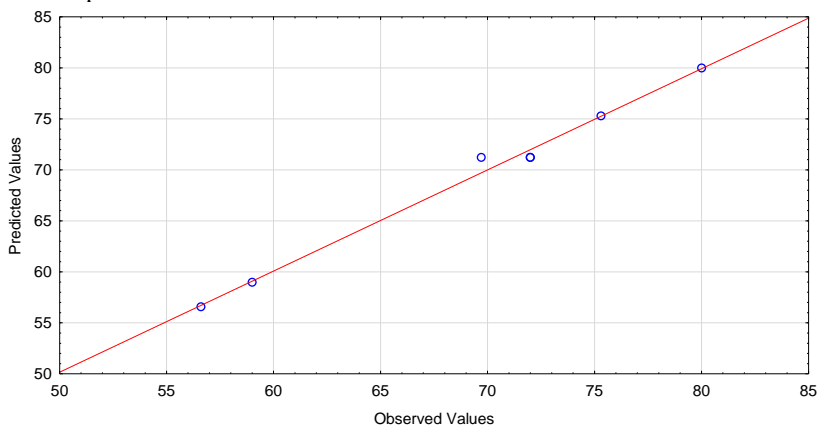
A superfície resposta ilustrada na **Figura 4.12** revelou os pontos de otimização do processo para um melhor resultado na EE pelo SFEE. Pressões abaixo de 98 bar e a temperatura no limite de 45 °C foram indicadas como região de pontos ótimos (em vermelho) para retirada do solvente orgânico (DCM) e para promover a encapsulação do composto ativo (o óleo essencial do louro).

O modelo matemático ( $EE = -1,4525P$ ) construído a partir dos coeficientes de regressão da variável que influenciou no processo foi significativo e previsível ( $p < 0,05$ ), pois apresentou um bom ajuste ( $R^2 = 0,99185$ ), podendo ser utilizado para prever o comportamento da EE dentro dos limites do experimento, conforme visto na **Figura 4.13**.

**Figura 4.12:** Superfície resposta referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.



**Figura 4.13:** Modelo preditivo referente aos resultados da influência da pressão e da temperatura na EE.



Comparando-se os resultados da EE deste trabalho com os encontrados na literatura (**Tabela 4.8**), foram obtidos resultados semelhantes aos de Lévai et al. (2016) e Santos et al. (2012), que utilizaram a mesma técnica para avaliação da EE (UV-Vis), porém menores que o de Mezzomo et al. (2012) e maiores que os de Aguiar et al. (2016a). Portanto, tratam-se de resultados que estão dentro da faixa daqueles encontrados por outros trabalhos.

**Tabela 4.8:** Trabalhos encontrados na literatura para encapsulação por SFEE.

EE (%)	Metodologia	C. ativo/A. de encapsulação	Autores	Este trabalho (%)
21,53 a 39,98	HPLC	Capsaicinoides/Hi-Cap	Aguiar et al. (2016a)	
70 a 65,7	UV-Vis	Quercetina/lecitina e Pluronic L64	Lévai et al. (2016)	80,0 a 56,6
89,0 a 34,0	UV-Vis	$\beta$ -caroteno e licopeno/Hi-Cap	Santos et al. (2012)	UV-Vis
93,0	HPLC	Carotenoides/Hi-Cap	Mezzomo et al. (2012)	

Os resultados deste trabalho indicaram que pressões e temperaturas baixas favoreceram a eficiência de encapsulação e foram adequadas para retirarem o solvente orgânico (DCM) da emulsão pelo CO<sub>2</sub> supercrítico, promovendo a encapsulação do óleo essencial em Hi-Cap.

#### 4.3.2 Estabilidade das suspensões

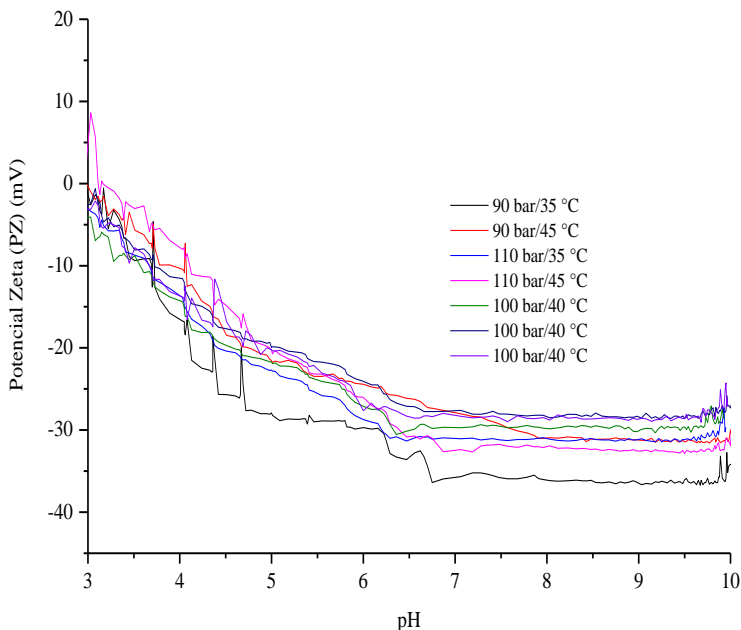
O Potencial Zeta (PZ) é um indicativo da estabilidade cinética. Suspensões com um Potencial Zeta acima de +/- 25 mV são consideradas estáveis, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais das partículas adjacentes (MIRHOSSEINI et al., 2008).

Avaliando-se a **Figura 4.14**, percebeu-se que as suspensões apresentaram valores negativos de Potencial Zeta com o aumento do pH, indicando que as superfícies das partículas exibem cargas predominantemente negativas, que podem ser atribuídas à presença de grupos funcionais do Hi-Cap, a exemplo da -OH (hidroxila) e do HC = O



(aldeído). As suspensões alcançaram a estabilidade (-25 mV) em pH acima de 6,0, com destaque para a suspensão 1, onde o processo de encapsulação por SFEE foi realizado nos menores níveis de temperatura e pressão estudados.

**Figura 4.14:** Potencial Zeta das suspensões oriundas do processo SFEE.



A instabilidade nas suspensões pode ter sido provocada pela movimentação do CO<sub>2</sub> supercrítico na suspensão, durante a etapa de depressurização do processo SFEE, observada devido à intensa agitação da suspensão. Por essa razão, o choque entre as partículas foi estimulado, favorecendo o movimento browniano, e as forças de repulsão das partículas menores não tiveram intensidade e alcance suficientes para superar as forças de atração (forças de Van der Waals) entre partículas, desestabilizando o sistema (JUNIOR; VARANDA, 1999).

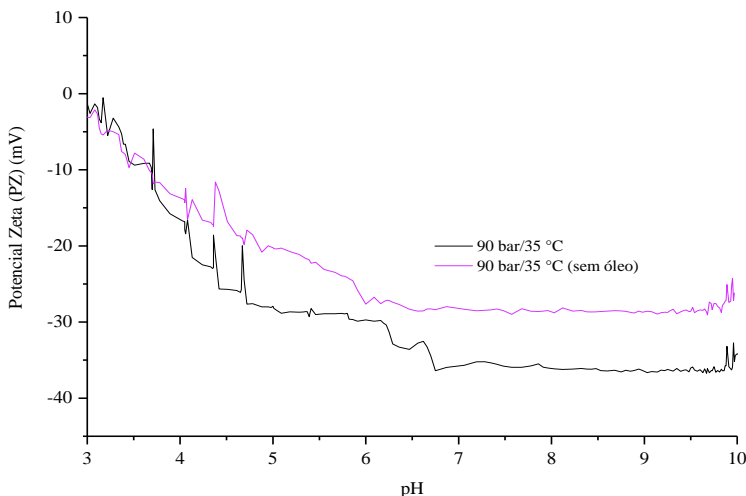
A quantidade de Tween 80 (emulsificante), utilizada por este trabalho (1 %), também pode não ter sido suficiente para auxiliar na estabilidade das suspensões, é possível que uma quantidade maior seja

capaz de impedir a aglomeração das partículas devido à diminuição da tensão superficial que esse tensoativo pode promover (KAUPPI; ANDERSSON; BERGSTR, 2005).

Mattea et al. (2009) sugeriram estudos sobre a ocorrência de desestabilização durante o processo SFEE. Lévai et al. (2015) encapsularam quercetina em Pluronic L64 por SFEE e relataram que as distribuições de tamanho das partículas obtidas eram multimodais, enquanto que as emulsões utilizadas possuíam um tamanho médio de gotícula com alta homogeneidade. Esses resultados podem indicar uma possível ocorrência de desestabilização durante o processo SFEE, como foi observada neste trabalho.

Comparando a suspensão 1, processada a 90 bar e 35 °C, com a suspensão que não possui o óleo essencial da folha de louro, observou-se que houve um aumento do PZ, com a elevação do pH, na suspensão que possuía o composto ativo. Portanto, as interações das moléculas do Hi-Cap com o óleo essencial da folha de louro exerceram um efeito positivo para a estabilidade da suspensão provavelmente em razão do aumento na concentração de íons negativos, oriundos do grupo funcional do 1,8-cineol, um éter cíclico (R – O – R), contribuindo ao final para o aumento (em módulo) do PZ, conforme se constatou a partir da **Figura 4.15**.

**Figura 4.15:** Potencial Zeta das suspensões 1 e 8 (sem óleo essencial), obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.



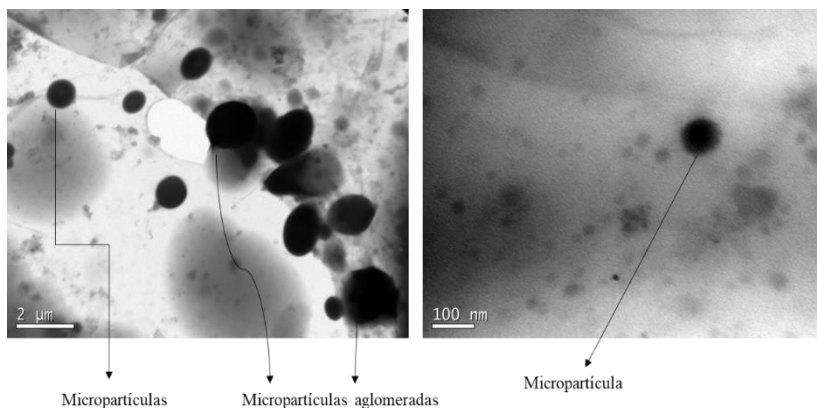
Com isso, em meios pouco ácido ou alcalino, a estabilidade cinética da suspensão 1 deste trabalho pode ser alcançada. Estudos utilizando uma maior concentração do emulsificante e um maior controle da etapa de despressurização do processo SFEE se fazem necessários.

### 4.3.3 Morfologia da suspensão

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostraram a morfologia das partículas da suspensão 1, escolhida por ter a maior EE, conforme **Figura 4.16**. Foi necessária rapidez para captura das micrografias, uma vez que as partículas fundiam sob o feixe de elétrons do equipamento, dificultando a análise da morfologia da partícula.

No entanto, foi possível visualizar que as partículas têm forma esférica e maciça, com tamanho de partícula ( $D_p$ ) variando entre 200 e 1000 nm, podendo ser classificadas como micropartículas (SLOMKOWSKI et al., 2011).  $D_p$  entre 200 e 300 nm são próximos aos resultados de  $D_g$  encontrados pela técnica de DLS (seção 4.2.1). Também foi observado a aglomeração das partículas, provavelmente devido à desestabilização ocorrida na suspensão durante o processo SFEE (MATTEA et al., (2009), confirmada pelo Potencial Zeta.

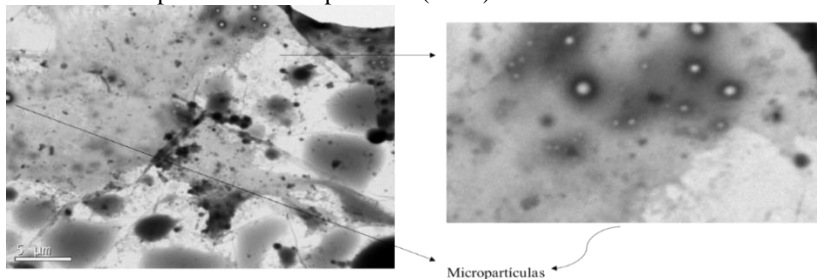
**Figura 4.16:** Morfologia das partículas da suspensão 1 (TEM).



Por meio do TEM, foi visto uma região, ampliada na **Figura 4.17**, onde é possível visualizar o núcleo com o composto ativo (óleo essencial

da folha de louro) e uma fina camada externa do agente de encapsulação (Hi-Cap).

**Figura 4.17:** Ampliação da região da morfologia que destaca o núcleo e o envoltório das partículas da suspensão 1 (TEM).



As partículas deste trabalho possuem tamanho maior do que os encontrados por Aguiar et al. (2016a), menor quando comparado ao Dp medido por Lévai et al. (2015) e Chattopadhyay; Huff; Shekunov (2006), como também possui partículas com Dp semelhante aos encontrados por Mattea et al. (2009) e Santos et al. (2012), descritos na **Tabela 4.9**.

**Tabela 4.9:** Tamanho das partículas obtidas por SFEE dos trabalhos encontrados na literatura.

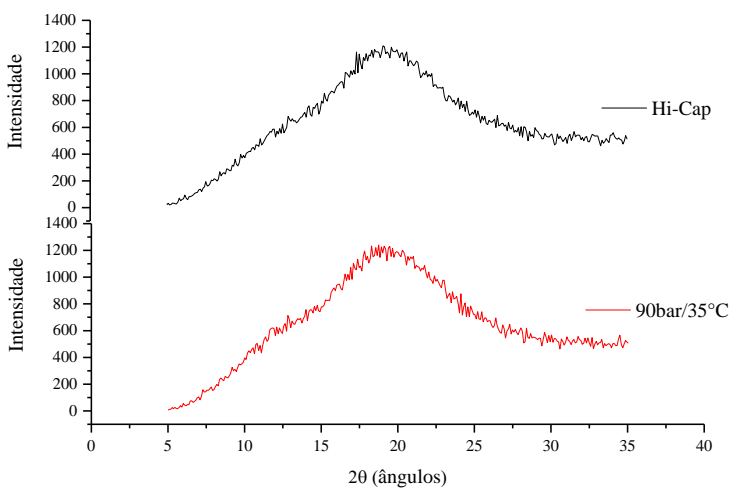
Dp	C. ativo/A. de encapsulação	Autores	Este trabalho (Dp)
126 a 137 nm	Capsaicinoides/Hi-Cap	Aguiar et al. (2016a)	
3,4 a 1,1 μm	Quercetina/lecitina e Pluronic L64	Lévai et al. (2016)	200 a 1000 nm
344 a 366 nm	β-caroteno e licopeno/Hi-Cap	Santos et al. (2012)	Óleo essencial/Hi-cap
400 nm	β-caroteno/Hi-Cap	Mattea et al. (2009)	
0,1 a 2 μm	Indometacina e cetoprofeno/ PVA PLGA e Eudragit RS	Chattopadhyay P., Huff R., Shekunov B. Y (2006)	

### 4.3.4 Caracterização das partículas

#### 4.3.4.1 Estrutura das partículas

Os padrões de raios-X para o Hi-Cap e para as partículas da suspensão 1 demonstrados na **Figura 4.18** mostraram características predominantes de materiais em estado amorfo. A banda larga dos padrões das reflexões dos difratogramas é típica de estrutura amorfa porque o grau de desordem molecular causa dispersão nas bandas de difração. O estado amorfo do Hi-Cap é atribuído, em grande parte, à amilose, presente na proporção de 20 a 30 % (ZOBEL, 1998).

**Figura 4.18:** Padrões de difração de raio-X do Hi-Cap e das partículas da suspensão 1, obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.

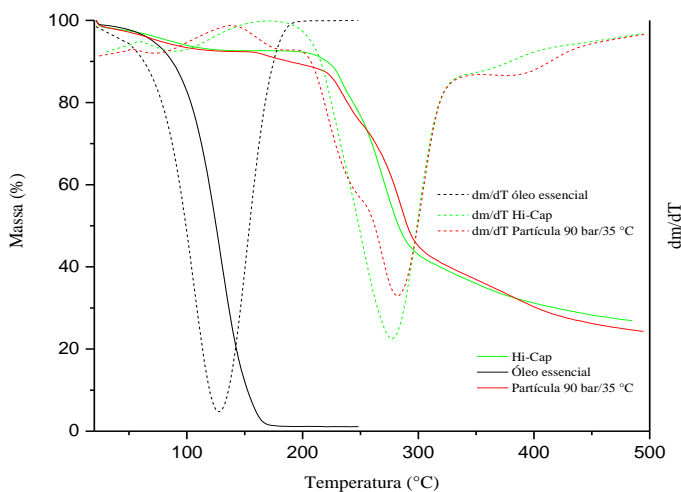


Silva et al. (2016) realizaram difração de raios-X de partículas formadas por soro de isolado proteico em amido modificado (Hi-Cap), obtendo estruturas com característica amorfa semelhantes às encontradas neste trabalho. A característica amorfa das partículas deve ser mantida por toda vida útil, para evitar a alteração da sua biodisponibilidade, maior vantagem de materiais amorfos (FANGUEIRO et al., 2012).

#### 4.3.4.2 Decomposição térmica

As decomposições térmicas do óleo essencial da folha de louro, do Hi-Cap e das partículas obtidas da suspensão 1 foram analisadas por meio da termogravimetria (TGA). Observou-se que a curva de decomposição das partículas da suspensão 1 teve declives diferentes das curvas do óleo essencial da folha de louro e do Hi-Cap, vistas na **Figura 4.19**, sugerindo a existência do encapsulamento do óleo essencial em Hi-Cap como um novo complexo, resultado este que pode ser confirmado pela curva da 1ª derivada (dm/dT) do TGA (DTG), que expressou as características dos eventos endotérmico ou exotérmico, além da massa perdida.

**Figura 4.19:** TGA e DTG do óleo essencial de louro, do Hi-Cap e das partículas, obtidas por SFEE a 90 bar e 35 °C.



Analisando-se cada componente separadamente, nota-se que o evento ocorrido no óleo essencial da folha de louro aconteceu entre 38,7 °C e 189,1 °C, com perda de massa de 98,8 % do composto, o que pode ser atribuída aos processos de volatilização e de decomposição dos componentes do óleo essencial.

Já no agente de encapsulação (Hi-Cap), o primeiro evento ocorrido foi no pico endotérmico em 57,4 °C, característica da gelatinização do

amido, com 2,5 % de perda de massa. O segundo evento ocorreu entre 99,4 °C e 147,2 °C, pela provável perda de água livre e/ou ligada, com decréscimo de massa de 6,8 %. Já o terceiro evento, entre 208,1 °C e 329,2 °C, corresponde a um pico exotérmico indicativo de decomposição em 277,3 °C, com perda de massa de 50,9 %, com uma provável despolimerização do amido. E um último evento acima de 356 °C, resultando em uma perda de massa total em 73,1 %.

No entanto, os resultados do TGA das partículas demonstraram que o primeiro evento somente ocorreu no pico endotérmico de 53,7 °C, o que representa um aumento significativo da estabilidade térmica do óleo essencial, com perda de massa de 4,5 %, comprovando a proteção térmica que o amido promoveu ao óleo essencial. Nessa temperatura, é característico ocorrer a perda de água e de alguns compostos voláteis provenientes do óleo essencial, como também uma gelatinização do Hi-Cap.

No segundo pico endotérmico das partículas, ocorrido em 137,46 °C, é provável que tenha havido a desidratação e/ou a volatilização, com perda de massa de apenas 5,0 %. O processo de decomposição intensa das partículas ocorreu entre 216,3 °C e 329,6 °C, com pico exotérmico em 282,8 °C e perda de massa em 50 %. Uma última decomposição foi percebida acima de 390 °C, com uma perda de 15,7 % da massa, restando apenas materiais que não conseguiram volatilizar na temperatura final da análise (500 °C), como por exemplo cinzas.

Esses eventos ocorridos no amido são alterações irreversíveis: em um primeiro momento a alteração estrutural leva o polímero à formação de pirodextrinas. Em temperaturas ainda mais elevadas, a despolimerização leva à formação de levoglucosana, furfural, produtos de baixa massa molecular e voláteis. E por fim, a formação de produtos carbonáceos (cinzas) (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998).

#### **4.3.5 Atividade antimicrobiana**

O teste de difusão em ágar teve função qualitativa para estimar o potencial de atividade antimicrobiana do óleo essencial da folha de louro na emulsão e nas partículas da suspensão 1. Para todos os microrganismos testados, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 e *Candida albicans* ATCC 10231, foram observados halo de inibição para o controle positivo e crescimento microbiano para o controle negativo, comprovando a eficiência dos testes.

A emulsão do óleo essencial da folha de louro com Hi-Cap apresentou halo de inibição para todos os micro-organismos testados, comportando-se como um potente inibidor de crescimento microbiano, demonstrado na **Tabela 4.10**. Considerando a proporção entre os tamanhos dos halos de inibição da emulsão e do controle positivo, foi observado que as melhores respostas de inibição se apresentaram sobre a levedura *Candida albicans*, seguido pelas bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, provavelmente devido à fisiologia dessa espécie, como pode ser visto na **Figura 4.20**.

**Tabela 4.10:** Teste de difusão em ágar: diâmetro dos halos de inibição formados pela emulsão e pelo controle positivo.

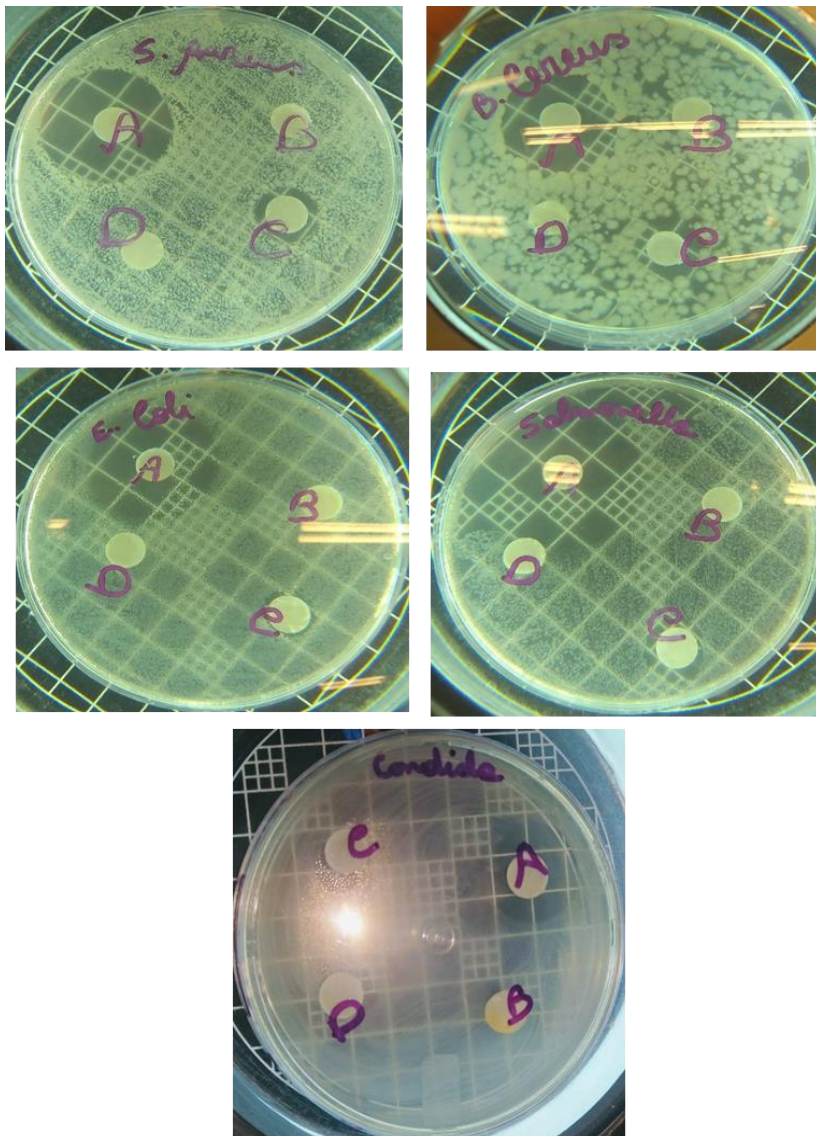
Diâmetro do disco ± DP (mm)	Micro-organismos				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Emulsão	16,1 ± 2,3	14,5 ± 1,0	14,7 ± 3,6	14,9 ± 0,6	11,0 ± 1,2
Controle positivo	32,9 ± 6,4	25,6 ± 2,3	43,3 ± 7,7	47,9 ± 1,8	19,3 ± 2,1

Merghni et al. (2016) estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial da folha de louro contra cepas da *Staphylococcus aureus*, apresentando como resultado, para o teste de disco, zonas de inibição variando entre 6,75 a 16,5 mm, resultados semelhantes aos encontrados por este trabalho. Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados por este trabalho, Goksen, Eser, & Ekiz, (2017) relataram uma maior atividade antibacteriana da *Laurus nobilis* L. contra as bactérias Gram-negativas.

Porém, as partículas da suspensão 1 não apresentaram efeito de inibição sobre os micro-organismos testados, sendo provável que o envoltório não tenha se rompido durante o tempo do experimento, impedindo um contato maior do óleo essencial com os micro-organismos. Com isso, fez-se o teste de diluição em caldo, promovendo um maior contato direto e agitação contínua ao inóculo, por um tempo de 48 h. Foram escolhidos três micro-organismos com características diferentes, um Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*), um Gram-negativo (*Salmonella Typhimurium*) e uma levedura (*Cândida albicans*) para o teste.



**Figura 4.20:** Placas de petri com os resultados do teste de difusão em ágar para os micro-organismos testados. A = controle positivo, ciprofloxacina (0,05 mg/mL) e para a *C. albicans* o fluconazol (7,5 mg/mL); B = controle negativo; C = emulsão; C<sub>eo</sub> = 12 mg/mL e D = suspensão 1, C<sub>eo</sub> = 9,6 mg/mL.

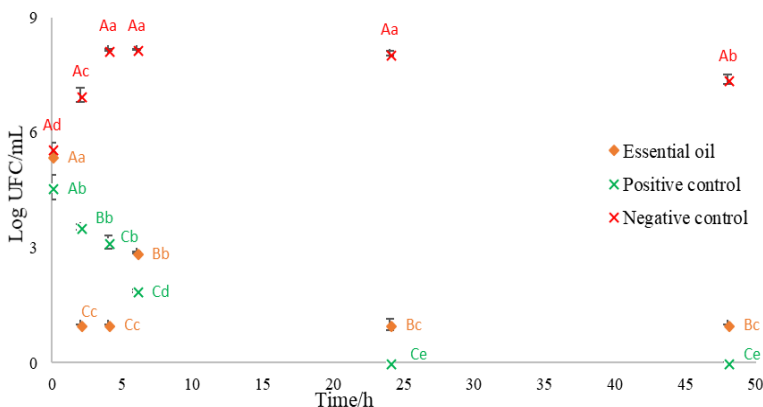


As curvas de crescimento microbiano da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para o controle negativo, controle positivo e para as partículas da suspensão 1 podem ser vistas na **Figura 4.21**. As partículas da suspensão 1 foram capazes de reduzir em 99,99 % a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, não havendo diferença significativa entre os resultados em 24 e 48 h, ( $p < 0,05$ ).

A avaliação estatística confirmou a diferença nos resultados obtidos entre os tratamentos para os controles negativo e positivo, após 24 e 48 h, demonstrando a efetividade do teste. Apesar de as partículas da suspensão 1 terem apresentado um resultado melhor que o controle positivo em 2 h e, ainda, de não haver diferença significativa entre esses tratamentos em 4 horas ( $p < 0,05$ ), em 6 h ocorreu um leve crescimento, indicando que a eliminação dos micro-organismos não foi completa, caracterizando um efeito de inibição de crescimento (BLACK, 2002).

Portanto, a suspensão 1 na concentração estudada apresentou redução significativa da contagem bacteriana e efeito bacteriostático, mantendo constante a contagem dos micro-organismos em função do tempo.

**Figura 4.21:** Curvas de crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.

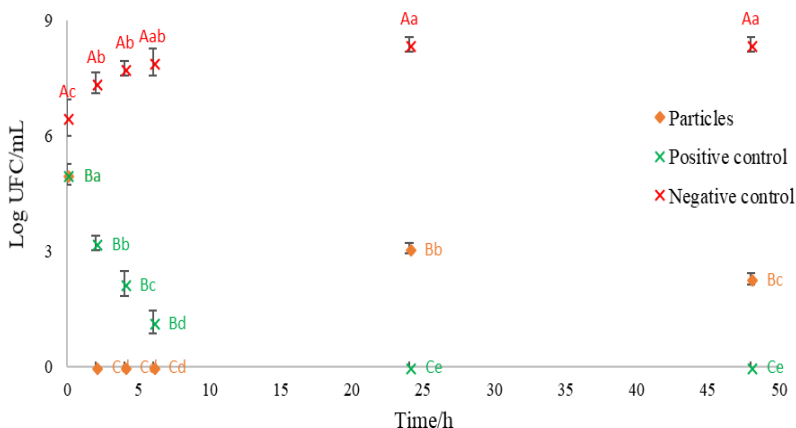


Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tempos do tratamento ( $p < 0,05$ ).

A atuação das partículas da suspensão 1 frente ao micro-organismo Gram-negativo *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 apresentou efeito bacteriostático após 48 h, conforme visto na **Figura 4.22**. Também foi possível perceber a diferença entre os tratamentos (controle negativo e controle positivo) em função do tempo, comprovado por meio da avaliação estatística ( $p < 0,05$ ). Aqui é importante destacar que a concentração das partículas utilizada foi capaz de eliminar o crescimento microbiano em 2, 4 e 6 h, com atuação mais efetiva que o controle positivo. Porém, após 24 h os micro-organismos retomaram o crescimento e foram reduzidos com 48 h, com resultados confirmados pela diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os resultados obtidos em 24 e 48 h. Isso pode ter ocorrido porque as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa rica em fosfolipídios, que pode representar uma barreira a mais para a ação antibiótica de determinadas substâncias (LUZZI, 2014).

**Figura 4.22:** Curvas de crescimento do micro-organismo *Salmonella Typhimurium* ATCC para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.



Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tempos do tratamento ( $p < 0,05$ ).

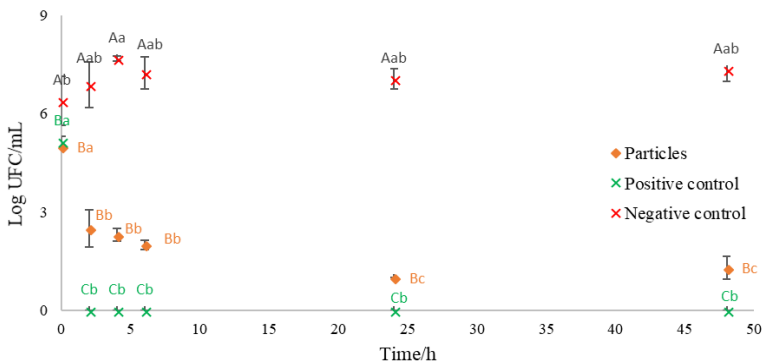
O perfil químico do óleo essencial da folha de louro encontrando neste trabalho (Capítulo 2) demonstrou a existência de compostos bioativos como o 1,8-cineol, o metil eugenol, o D-limoneno e o 3-careno, todos apresentando ações contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DA SILVEIRA et al., 2014; MERGHNI et al., 2016; COSTA et al., 2017). A proposta do mecanismo de ação do 1,8-cineol em *S. aureus* é por meio de danos causados à membrana celular, ocasionando a perda de metabólitos citoplasmáticos e ácido nucléicos, aumentando-se consequentemente a suscetibilidade celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Outros autores explicam o mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais pela atuação dos compostos lipofílicos presentes, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, dentre estes o 1,8-cineol (monoterpeno), que, por meio dos danos causados à membrana celular, afetam a homeostase e o equilíbrio de pH e de íons inorgânicos dentro da célula microbiana, levando as bactérias à morte (COWAN, 1999; BURT, 2004; DA SILVEIRA et al., 2014; GUPTA et al., 2016).

Por serem lipofílicos, os óleos essenciais acumulam-se na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, interferindo no metabolismo vital desses micro-organismos (BAKKALI et al., 2008). Possivelmente o contato entre o óleo essencial e os micro-organismos testados não ocorreu o suficiente para o alcance da efetiva atividade bacteriana. É provável que não tenha ocorrido o rompimento de todas as partículas devido à agregação, que acarretou em aumento de tamanho.

O comportamento das partículas da suspensão 1 frente à levedura testada foi fungistático, com inibição do crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231 durante às 48 h da análise, como pode ser visto na **Figura 4.23**. Também foi observada diferença estatística entre os resultados obtidos para os tratamentos em função do tempo ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4.23:** Curvas de crescimento do micro-organismo *Candida albicans* ATCC 10231 para o controle negativo, controle positivo e partículas da suspensão 1.



Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes nas curvas indicam diferença estatística entre os tempos do tratamento ( $p < 0,05$ ).

A suscetibilidade da levedura às partículas da suspensão 1 foi semelhante e, em alguns momentos, levemente superior ao apresentado pela bactéria Gram-positiva (*Salmonella Typhimurium* ATCC), com queda de crescimento microbiano significativa ( $p < 0,05$ ) logo nas primeiras horas, mantendo-se constante em 24 e 48 h. Resultados promissores do óleo essencial do louro foram estudados por Peixoto et al. (2017), que encontraram atividade antifúngica contra a formação de biofilmes da *C. albicans* ATCC 10231 e atribuíram essa ação aos monoterpenos, dentre eles o 1,8-cineol, e aos sesquiterpenos, que interferem na biossíntese da parede celular e na permeabilidade iônica da membrana celular, inibindo a formação e adesão do biofilme.

Provavelmente, o maior benefício dos óleos essenciais seja a possibilidade de atuarem conjuntamente com outros agentes microbianos, potencializando-os (LUZZI, 2014). Dentro dessa perspectiva, as atividades bacteriostática e fungistática encontradas para as partículas da suspensão 1 podem ser consideradas promissoras.

Portanto, esses resultados sugerem que a encapsulação por SFEE do óleo essencial da folha de louro em Hi-Cap, na concentração estudada, além de proteger o óleo essencial, conservou as atividades bacteriostática e fungistática do composto ativo.

### 4.3.6 CONCLUSÃO

Os menores níveis de pressões e temperaturas do SFEE estudados foram suficientes para retirar o solvente orgânico da emulsão e promover a encapsulação do óleo essencial em amido modificado. Foram formadas micropartículas estáveis, a partir de pH 6,0, com características amorfas, onde o agente de encapsulação foi capaz de proteger o óleo essencial contra a degradação térmica. As partículas formadas por SFEE apresentaram atividades bacteriostática e fungistática.

O óleo essencial da folha de louro, rico em compostos voláteis e de fácil degradação, foi encapsulado em amido modificado pelo processo SFEE, em quantidade significativa e livre de resíduos.

## CAPÍTULO V

### 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A encapsulação do óleo essencial da folha de louro foi realizada pela combinação das técnicas de ultrassom e supercrítica. Extraídos por métodos a pressão ambiente (convencionais) e alta pressão (supercrítico), os extratos da folha de louro apresentaram diferentes rendimentos e composição química, com destaque para os compostos 1,8-cineol, metil eugenol e D-Limoneno, para os extratos oriundos a pressão ambiente, e para o  $\alpha$ -tocoferol, em relação aos extratos obtidos por alta pressão. Portanto, a escolha do método é dependente das características do extrato que se deseja obter ao final.

O 1,8-cineol, composto majoritário da folha de louro, foi obtido em maior concentração (62,70 mg/mL) pelo método da hidrodestilação. Por esse motivo, tal extrato foi definido para o estudo da estabilidade das emulsões que foram utilizadas na encapsulação por SFEE.

Na formação das emulsões, as maiores concentrações estudadas do óleo essencial, 9 e 12 mg/mL, no tempo de 4 min de sonicação, foram as mais adequadas para a obtenção dos menores tamanhos das gotículas das emulsões pela técnica da sonda ultrassônica, com estabilidade de 24 h. Um tempo de sonicação menor foi insuficiente para os efeitos da cavitação, enquanto que um tempo maior promoveu um excesso de processo, ocorrendo um leve aumento no tamanho das gotículas da emulsão.

A eficiência de encapsulação foi favorecida com o aumento da concentração do óleo essencial nas emulsões, subindo de  $48,9 \pm 2,4$  % para  $75,5 \pm 3,8$  % nas suspensões obtidas por SFEE a 100 bar e 40 °C, com teor residual do solvente orgânico (DCM) abaixo de 1 ppm.

Os menores níveis de pressão (90 e 100 bar) e temperatura (35 e 40 °C) estudados também favoreceram a eficiência de encapsulação, alcançando 80 % de composto ativo encapsulado, correspondente a uma concentração de 2,3 mg/mL de 1,8-cineol. Além disso, esses níveis de pressão e temperatura foram adequados para retirar o solvente orgânico da emulsão e promover a encapsulação desejada.

Micropartículas estáveis em meios de pH pouco ácido ou alcalino foram formadas, com tamanhos de 200 a 1000 nm e característica amorfa, semelhante ao agente de encapsulação. O freeze-drying promoveu um crescimento significativo no tamanho das partículas e, por isso, não foi apropriada.

As partículas formadas foram degradadas em temperaturas superiores ao do óleo essencial, assim o Hi-Cap foi capaz de promover uma maior proteção térmica ao composto ativo. As partículas conservaram a característica bioativa do composto ativo, demonstrada por meio das atividades bacteriostática e fungistática.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho apontaram que a técnica de extração por fluido supercrítico de emulsões é uma promissora alternativa para a encapsulação de óleos essenciais, proporcionando uma maior proteção contra a degradação térmica, além de conservar sua bioatividade.

A redução do tamanho, o envoltório hidrofílico e a concentração presentes nas micropartículas formadas são resultados que ampliam as expectativas quanto ao uso da tecnologia supercrítica, pois aumentam a qualidade dos óleos essenciais e diversificam a utilização destes pelas indústrias de cosméticos, alimentos, farmacêutica e química.



## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma maior compreensão dos aspectos fenomenológicos que ocorrem durante o processo SFEE faz-se necessária para um melhor domínio do uso da técnica. Verificou-se que a desestabilização da suspensão ocorreu durante a encapsulação, onde a morfologia indicou agregação das partículas.

Por isso, sugerem-se estudos sobre as causas dessa desestabilização, para investigar se podem ser controladas na formação da emulsão com o uso de emulsificantes/tensoativos, pelos parâmetros do processo e/ou por outros fatores. Ainda sobre o processo SFEE, fatores que interferem na eficiência de encapsulação necessitam ser melhor esclarecidos, a exemplo da influência das vazões da emulsão e do CO<sub>2</sub> supercrítico e da quantificação de compostos ativos que podem não estar encapsulados.

Estudos sobre o tempo de estabilidade das suspensões formadas por SFEE podem contribuir com informações sobre a validade das partículas, visto que isso interfere no tamanho e no comportamento destas em diferentes meios (ácido e/ou alcalino). Testes que comprovem o aumento da disponibilidade e solubilidade do óleo essencial encapsulado em amido modificado poderão apontar as melhorias que a técnica de encapsulação promoveu ao óleo essencial estudado.

Por fim, seria de grande relevância estudar as melhorias que as partículas do óleo essencial podem proporcionar na aromatização, nas ações antioxidante e antimicrobiana de alimentos, na composição de medicamentos que tem como princípio ativo o 1,8-cineol e, ainda, na formulação de cosméticos que têm como base de suas composições óleos essenciais.

## 6. PRODUÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA

### 6.1 Trabalhos apresentados em eventos

SANTOS, P. H.; REIS, P. M. C. L.; PESSOA, A. S.; HENSE, H. Obtenção de extrato de folha de louro (*Laurus nobilis* L.) via CO<sub>2</sub> supercrítico: cinética e modelagem. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, realizado de 25 a 29 de setembro de 2016 na Fábrica de Negócios em Fortaleza – CE.

REIS, P. M. C. L.; SANTOS, P. H.; HENSE, H. Extraction and Identification of the Essential Oil Profile of the *Laurus nobilis* L. Leaf. 16 th European Meeting on Supercritical Fluids, 25th to 28th April 2017 in as an oral presentation, Lisboa, Portugal.

REIS, P. M. C. L.; MEZZOMO, N.; AGUIAR, G. P. S.; FERREIRA, S. R. S.; HENSE, H. Encapsulation Of Laurel Leaves Essential Oil (*Laurus Nobilis* L.) By Supercritical Fluid Extraction Of Emulsion (SFEE). International Symposium on Supercritical Fluids 2018, 22th to 25th April 2018, Juan-les-pins, France.

### 6.2 Artigos submetidos

REIS, P. M. C. L.; MEZZOMO, N.; AGUIAR, G. P. S.; SENNA, E. M. T. L.; FERREIRA, R. S. S.; HENSE, H. Ultrasound assisted emulsion of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) encapsulated by SFEE. The Journal of Supercritical Fluids, aceite em set. 2018.

REIS, P. M. C. L.; PEREIRA, T. C. de S.; Nunc-Nfônro, I.; ANDRADE, K. S.; MAZZUTTI, S.; HENSE, H. Chemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. extracts obtained by different techniques extraction. The Journal of Supercritical Fluids, submetido em set. 2018.

## REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 87–94, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641106000385>>.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 30 dez. 2006.

ABIHPEC. **Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria**. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2016-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGUÊS-14jun2016.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

ABISMAÏL, B.; CANSELIER, J. P.; WILHELM, A. M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: Drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, n. 1–2, p. 75–83, 1999.

ACOSTA, S.; CHIRALT, A.; SANTAMARINA, P.; ROSELLO, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 233–240, 2016.

ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112–119, out. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015305963>>.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis. **Thermochimica Acta**, v. 324, n. 1–2, p. 1–8, 1998.

AGUIAR, A. C. de; SILVA, L. P. S.; REZENDE, C. A. de; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 112, p. 37–43, 2016a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844616300316>>.

AGUIAR, G. P. S.; BOSCHETTO, D. L.; CHAVES, L. M. P. C.; ARCARI, B. D.; PIATO, A. L.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350–355, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.047>>.

AGUIAR, G. P. S.; MARCON, M.; MOCELIN, R.; HERRMANN, A. P.; CHAVES, L. M. P. C.; PIATO, A. L.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J. V. Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: Evaluation of in vitro and in vivo biological activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. April, p. 282–291, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.010>>.

ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 2, p. 215–236, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612015000200215&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000200215&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

ALVES, L. D. S.; DE LYRA, M. A. M.; ROLIM, L. A.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM-NETO, P. J. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 17–25, 2012.

ANDRADE, A. M. de. Influência de alguns fatores não genéticos sobre teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 181–189, 2000. Disponível em: <<http://www.floram.org/files/v7núnico/v7nunicoa19.pdf>>.

ANGADI, V. G.; RAVIKUMAR, G.; RAJEEVALOCHAN, A. N.; KUMAR, P.; SHANKARANARAYANA, K. H. UV-spectroscopic

method for identifying high cineole yielders in eucalyptus hybrid oil samples. **FAFAI**, p. 37–38, 2002.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. **International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide**. Oxford: Pergamon Press, 1976.

ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição** **Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI** Brasília - DF, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>.

ANVISA, A. N. de V. S. **RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007** Brasília - DF, 2007. Disponível em: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:RaSBKbnCRq0J:www.un.org/esa/sustdev/natlinfo/indicators/factsheet.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=gh>>.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International** (Gaithersburg, Ed.) Maryland, USA, 2005.

ARRANZ, E.; JAIME, L.; LÓPEZ DE LAS HAZAS, M. C.; REGLERO, G.; SANTOYO, S. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, n. 3, p. 121–129, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434416300056>>.

ASBAHANI, A. El; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. El; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ASTRATH, N. G. C. **Determinação e análise de propriedades térmicas**

**e ópticas de sólidos não cristalinos em altas e baixas emperaturas.**

2006. Universidade Estadual de Maringá, 2006. Disponível em: <[http://www.pfi.uem.br/wp-content/uploads/2015/09/nelson\\_guilherme\\_castelli\\_astrath\\_2006.pdf](http://www.pfi.uem.br/wp-content/uploads/2015/09/nelson_guilherme_castelli_astrath_2006.pdf)>.

AUGUSTIN, M. A.; RILEY, M.; STOCKMANN, R.; BENNETT, L.; KAHL, A.; LOCKETT, T.; OSMOND, M.; SANGUANSRI, P.; STONEHOUSE, W.; ZAJAC, I.; COBIAC, L. Role of food processing in food and nutrition security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, n. 4, p. 115–125, 2016. Disponível em: <<https://sci-hub.cc/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553148>>.

AURORI, A. C.; BOBIŞ, O.; DEZMIREAN, D. S.; MĂRGHITAŞ, L. A.; ERLER, S. Bay laurel (*Laurus nobilis*) as potential antiviral treatment in naturally BQCV infected honeybees. **Virus Research**, v. 222, p. 29–33, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170216301150>>.

AZAMBUJA, W. **Óleo essencial de louro**. Disponível em: <<http://www.oleos essenciais.org/oleo-essencial-de-louro/>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

AZEREDO, H. M. C.; DIVISION, C.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A.; DE AZEREDO, H. M. C.; AZEREDO, H. M. C. Drying Technology: An International Journal. **Alimentação e Nutrição, Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2005. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/106/119>>.

BAKHOUCHE, K.; DHAOUADI, Z.; JAIDANE, N.; HAMMOUTÈNE, D. Comparative antioxidant potency and solvent polarity effects on HAT mechanisms of tocopherols. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1060, p. 58–65, 2015.

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, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>>.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S089684461000286X/1-s2.0-S089684461000286X-main.pdf?\\_tid=29676bc2-ad00-11e7-9f0d-00000aacb361&acdnat=1507560366\\_68d4d2e898092198823612af3d9feac](https://ac.els-cdn.com/S089684461000286X/1-s2.0-S089684461000286X-main.pdf?_tid=29676bc2-ad00-11e7-9f0d-00000aacb361&acdnat=1507560366_68d4d2e898092198823612af3d9feac)>.

BILIADERIS, C. G. Structures and Phase Transitions of Starch in Food Systems. **Food Technology**, v. 46, p. 98–109, 1992.

BLACK, J. G. **Microbiologia fundamentos e perspectivas**. 4<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro, 2002.

BOSCHETTO, D. L.; DALMOLIN, I.; DE CESARO, A. M.; RIGO, A. A.; FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A.; BATISTA, E. A. C.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 352–360, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/269942223\\_Phase\\_behavior\\_and\\_process\\_parameters\\_effect\\_on\\_grape\\_seed\\_extract\\_encapsulation\\_by\\_SEDS\\_technique](https://www.researchgate.net/publication/269942223_Phase_behavior_and_process_parameters_effect_on_grape_seed_extract_encapsulation_by_SEDS_technique)>.

BOUBAKER, H.; KARIM, H.; EL HAMDAOUI, A.; MSANDA, F.; LEACH, D.; BOMBARDA, I.; VANLOOT, P.; ABBAD, A.; BOUDYACH, E. H.; AIT BEN AOUMAR, A. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus species* essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 95–101, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016301820>>.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximating response function**. Technical Report n. 9, Wisconsin, 1973. Disponível em: <<http://www.stat.wisc.edu/techreports/tr9.pdf>>.

BRAHMI, F.; ABDENOUR, A.; BRUNO, M.; SILVIA, P.;

ALESSANDRA, P.; DANILLO, F.; DRIFA, Y.-G.; FAHMI, E. M.; KHODIR, M.; MOHAMED, C. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 96–105, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016301339>>.

BRASIL, N. I. do; ARAÚJO, M. A. S.; SOUSA, E. C.; MOLINA, D. **Processamento de petróleo e gás**. Ciências exatas e tecnológicas. LTC, Rio de Janeiro, 2014.

BROZE, G. **Handbook of Detergents, Part A: Properties (Surfactant Science)**. v. 82, Marcel Dekker AG, New York, 1999.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**. Heidelberg: Steinkopff, v. 4, 1994.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 163–170, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844604002864>>.

CAO, G. **Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications**. Imperial College Press, London, 2004.

CAREDDA, A.; MARONGIU, B.; PORCEDDA, S.; SORO, C. Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of *Laurus nobilis* Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1492–1496, 2002. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0108563>>.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of



Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–20, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019108>>.

CHANG, C.; VARANKOVICH, N.; NICKERSON, M. T. Microencapsulation of canola oil by lentil protein isolate-based wall materials. **Food chemistry**, v. 212, p. 264–73, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374532>>.

CHATTOPADHYAY, P.; HUFF, R.; SHEKUNOV, B. Y. Drug Encapsulation Using Supercritical Fluid Extraction of Emulsions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 3, p. 667–679, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916319669>>.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, 2012.

CHMIT, M.; KANAAN, H.; HABIB, J.; ABBASS, M.; MCHEIK, A.; CHOKR, A. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S546–S552, 2014.

CLARINDO, A. de S. **Biocompósito Hidrofóbico Utilizando Amido Modificado e Celulose**. 2015. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/128962/327884.pdf?sequence=1>>.

CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 26–33, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641630100X>>.

COCERO, M. J.; MARTÍN, Á.; 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.

COMTRADE. **United Nations Commodity Trade Statistics Database**. Disponível em: <<https://comtrade.un.org/data>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

CORAZZA, M. L.; FILHO, L. C.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. High Pressure Phase Equilibria of the Related Substances in the Limonene Oxidation in Supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 48, n. 2, p. 354–358, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/je020150k%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/je020150k>>.

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B.; BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 1, p. 158–171, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v44n2/2236-8906-hoehnea-44-02-0158.pdf>>.

COTTON, S. **1,8-cineole**. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/cineole/cineoleh.htm>>. Acesso em: 5 jun. 2016.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/pdf/cm000564.pdf>>.

CUCHEVAL, A.; CHOW, R. C. Y. A study on the emulsification of oil by power ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 916–920, 2008.

DA SILVEIRA, S. M.; LUCIANO, F. B.; FRONZA, N.; CUNHA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; VIEIRA, C. R. W. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014.

Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0023643814003211/1-s2.0-S0023643814003211-main.pdf?\\_tid=1caa8eb9-ecce-472c-8688-1b0e3a20d2f2&acdnat=1520520053\\_1def8f6ff8b4b4298a157eb7a05bcf61](https://ac.els-cdn.com/S0023643814003211/1-s2.0-S0023643814003211-main.pdf?_tid=1caa8eb9-ecce-472c-8688-1b0e3a20d2f2&acdnat=1520520053_1def8f6ff8b4b4298a157eb7a05bcf61)>.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; AHMED HASSAN, L. E.; KHADEER AHAMED, M. B.; ABDUL MAJID, A. S.; ABDUL MAJID, A. M. S. In vitro antimetastatic activity of Agarwood (*Aquilaria crassna*) essential oils against pancreatic cancer cells. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 2, p. 141–150, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506815000500>>.

DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G. P. S.; VENERAL, J. G.; DOS SANTOS, A. E.; DE CHAVES, L. M. P. C.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, n. February, p. 182–190, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.025>>.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1<sup>a</sup> reimpre ed. p. 1-59, 2011.

DAMIANI, N.; FERNÁNDEZ, N. J.; PORRINI, M. P.; GENDE, L. B.; ÁLVAREZ, E.; BUFFA, F.; BRASESCO, C.; MAGGI, M. D.; MARCANGELI, J. A.; EGUARAS, M. J. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidial, and acaricidal activity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 701–709, 28 fev. 2014. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0896844616300316/1-s2.0-S0896844616300316-main.pdf?\\_tid=018f5032-9d75-11e7-945a-00000aacb360&acdnat=1505851332\\_a67b6c8a8051f3400151e619456ef90c](http://ac.els-cdn.com/S0896844616300316/1-s2.0-S0896844616300316-main.pdf?_tid=018f5032-9d75-11e7-945a-00000aacb360&acdnat=1505851332_a67b6c8a8051f3400151e619456ef90c)>.

DANTAS, M.; SFREDO, M. A. **Extração de óleo essencial de folhas de louro (*Laurus nobilis*) em escala piloto** Erechim, 2015. .

DE CORATO, U.; MACCIONI, O.; TRUPO, M.; DI SANZO, G. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. **Crop Protection**,

v. 29, n. 2, p. 142–147, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2009.10.012>>.

DE PAZ, E.; MARTÍN, Á.; ESTRELLA, A.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATIAS, A. A.; DUARTE, C. M. M.; COCERO, M. J. Formulation of  $\beta$ -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 17–27, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11001068>>.

DE PAZ, E.; RODRÍGUEZ, S.; KLUGE, J.; MARTÍN, Á.; MAZZOTTI, M.; COCERO, M. J. Solubility of  $\beta$ -carotene in poly-( $\epsilon$ -caprolactone) particles produced in colloidal state by Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 105–112, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.017>>.

DE SOUZA, C. A. G.; SIQUEIRA, S. M. C.; DE AMORIM, A. F. V.; DE MORAIS, S. M.; GONÇALVES, T.; GOMES, R. N.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S. Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: Preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 877–883, 2015. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/v38n7a01.pdf>>.

DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. **Food Research International**, v. 31, n. 5, p. 351–354, jun. 1998. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0963996998000866/1-s2.0-S0963996998000866-main.pdf?\\_tid=20a6dff8-ad01-11e7-88d3-00000aacb361&acdnat=1507560781\\_0ab735d0330e38924f33ab16c288d824](https://ac.els-cdn.com/S0963996998000866/1-s2.0-S0963996998000866-main.pdf?_tid=20a6dff8-ad01-11e7-88d3-00000aacb361&acdnat=1507560781_0ab735d0330e38924f33ab16c288d824)>.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. **Princípios e Aplicações de Análise Térmica**. São Carlos, p. 40, 2012.

DIAS, M. I.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? **Food Chemistry**, v. 156, p. 339–

346, 2014. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614001666>>.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.

DIMA, C.; COTÂRLET, M.; ALEXE, P.; DIMA, S. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 203–211, abr. 2014. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901500014X>>.

EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; FENANDES, D. M.; ROCHA, W. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, R. F. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 72–77, 2013. Disponível em:  
<<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v15n1/a10v15n1.pdf>>.

ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A.; CALICETI, P. Production of Insulin-Loaded Poly(Ethylene Glycol)/Poly(L-Lactide) (PEG/PLA) Nanoparticles by Gas Antisolvent Techniques. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 10, p. 1628–1636, 2001. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916308425>>. Acesso em: 20 set. 2017.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J. J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, n. 3, p. 219–226, 2004. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0032591004000695/1-s2.0-S0032591004000695-main.pdf?\\_tid=fdfd8717-a6c0-4f11-acc3-bb7b6af8bc81&acdnat=1526910700\\_8f77a6ad02fd632c141a821876dd6dcc](https://ac.els-cdn.com/S0032591004000695/1-s2.0-S0032591004000695-main.pdf?_tid=fdfd8717-a6c0-4f11-acc3-bb7b6af8bc81&acdnat=1526910700_8f77a6ad02fd632c141a821876dd6dcc)>.

FANGUEIRO, J. F.; MARQUES, I. R.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.

H. A.; SOUTO, E. B. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-76922005000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-76922005000200003)>.

FERNÁNDEZ, N. J.; DAMIANI, N.; PODAZA, E. A.; MARTUCCI, J. F.; FASCE, D.; QUIROZ, F.; MERETTA, P. E.; QUINTANA, S.; EGUARAS, M. J.; GENDE, L. B. *Laurus nobilis* L. Extracts against *Paenibacillus* larvae: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X18300937>>.

FERRAZ, J. B. S.; BARATA, L. E. S.; SAMPAIO, P. de T. B.; GUIMARÃES, G. P. **Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável.** Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252009000300015](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252009000300015)>. Acesso em: 6 jul. 2016.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais Óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH**, v. 114, p. 29–33, 2007.

FLAMINI, R.; VEDOVA, A. D.; DE ROSSO, M.; PANIGHEL, A. A new sensitive and selective method for analysis of ochratoxin A in grape and wine by direct liquid chromatography/surface-activated chemical ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 22, p. 3737–3742, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.3275>>.

FORTE, M. M. C.; OLIVEIRA, R. V. B. De. **Graftização de amido através do método de microondas.** Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/851.pdf>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

FRANCISCO, J. D. C.; SIVIK, B. Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, n. 1, p. 11–19, 2002.

FRANKOVA, A.; SMID, J.; BERNARDOS, A.; FINKOUSOVA, A.; MARIK, P.; NOVOTNY, D.; LEGAROVÁ, V.; PULKRABEK, J.; KLOUCEK, P. The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Food Control**, v. 68, p. 62–68, out. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516301293>>.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1–9, 2015.

FREITAS, S.; HIELSCHER, G.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification - A useful tool for pharmaceutical development and production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 1, p. 76–85, 2006. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S135041770400183X/1-s2.0-S135041770400183X-main.pdf?\\_tid=31f61ddc-01f2-11e8-b6de-00000aacb35d&acdnat=1516900225\\_b5d9671599150c0f595518d8ace19ada](https://ac.els-cdn.com/S135041770400183X/1-s2.0-S135041770400183X-main.pdf?_tid=31f61ddc-01f2-11e8-b6de-00000aacb35d&acdnat=1516900225_b5d9671599150c0f595518d8ace19ada)>.

FUNK, J. L.; FRYE, J. B.; OYARZO, J. N.; CHEN, J.; ZHANG, H.; TIMMERMANN, B. N. Anti-inflammatory effects of the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in experimental rheumatoid arthritis. **PharmaNutrition**, v. 4, n. 3, p. 123–131, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213434416300056>>.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1018–1025, set. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519303003059/pdf?md5=834312b8951197d76ea59366a57a94e6&pid=1-s2.0-S0022519303003059-main.pdf>>.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0956713507001107-1121.pdf?\\_tid=31f61ddc-01f2-11e8-b6de-00000aacb35d&acdnat=1516900225\\_b5d9671599150c0f595518d8ace19ada](https://ac.els-cdn.com/S0956713507001107-1121.pdf?_tid=31f61ddc-01f2-11e8-b6de-00000aacb35d&acdnat=1516900225_b5d9671599150c0f595518d8ace19ada)>.

cdn.com/S0963996907001238/1-s2.0-S0963996907001238-main.pdf?\_tid=07ece001-5aba-4c0b-90c5-58251ab6990b&acdnat=1526910118\_4b1541fb82647e8b6d465458196e756b>.

GOKSEN, G.; ESER, E.; EKIZ, H. ibrahi. Antimicrobial activity of essential oils of *Laurus nobilis*, *Rosmarinus officinalis*, and *Myrtus communis* on common foodborne pathogens. **Journal of Biotechnology**, v. 256, p. S27, ago. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617309392>>.

GÓMEZ-CORONADO, D. J. M.; BARBAS, C. Optimized and Validated HPLC Method for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherol Measurement in *Laurus nobilis* Leaves. New Data on Tocopherol Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5196–5201, ago. 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf030143f>>.

GÓMEZ-CORONADO, D. J. M.; IBAÑEZ, E.; RUPÉREZ, F. J.; BARBAS, C. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. **Journal of chromatography. A**, v. 1054, n. 1–2, p. 227–33, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553148>>.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 8–14, 2003.

GUDAT, A. E.; FIROR, R. L.; BOBER, U. Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals. **Agilent Technologies**. 2007. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/5989-6023EN.pdf>>.

GUPTA, S.; KHAN, S.; MUZAFAR, M.; KUSHWAHA, M.; YADAV, A. K.; GUPTA, A. P. Encapsulation: entrapping essential oil/flavors/aromas in food. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Encapsulations**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 229–268.



HAIYAN, G.; LIJUAN, H.; SHAOYU, L.; CHEN, Z.; ASHRAF, M. A. Antimicrobial, antibiofilm and antitumor activities of essential oil of *Agastache rugosa* from Xinjiang, China. **Saudi Journal of Biological sciences**, v. 23, n. 4, p. 524–30, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298587>>.

HOTZA, D. **Colagem de Folhas Cerâmica**, v. 43, p. 157-164, 1997.

ISHIMURA, I.; TIVELLI, S. W.; CAMARGO FILHO, W. P. de. Produção de Mudanças de Louro e Seu Plantio. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, p. 2316–5146, 2013. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/470/47043482012.pdf>>.

IURCKEVICZ, G. **Utilização de amido reticulado como matriz para imobilização do fármaco diclofenaco de sódio dissertação**. 2014. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014. Disponível em: <[http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1098/1/PB\\_PPGTP\\_M\\_Iurckevicz%2C Genice\\_2014.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1098/1/PB_PPGTP_M_Iurckevicz%2C%20Genice_2014.pdf)>.

IVANOVIC, J.; MISIC, D.; RISTIC, M.; PESIC, O.; ZIZOVIC, I. Supercritical CO<sub>2</sub> extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.): Chemical composition and antibacterial activity. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 3, p. 395–404, 2010. Disponível em: <%5C%5Cobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C14985.pdf>.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nanoparticle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 172–183, 2008.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 4, p. 478–488, 2007.

JEMÅçA, J. M. Ben; TERSIM, N.; TOUDERT, K. T.; KHOUJA, M. L. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 97–104, 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X1100110X>>.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, n. 3, p. 179–219, 2001. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S089684460100064X/1-s2.0-S089684460100064X-main.pdf?\\_tid=5ec310df-3fcc-439e-8790-8e0f4553255b&acdnat=1526911276\\_8d2ff118b53773b490feaafddfee1bd2](https://ac.els-cdn.com/S089684460100064X/1-s2.0-S089684460100064X-main.pdf?_tid=5ec310df-3fcc-439e-8790-8e0f4553255b&acdnat=1526911276_8d2ff118b53773b490feaafddfee1bd2)>.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química Nova na Escola**, 1999. Disponível em: <<http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc09/quimsoc.pdf>>.

KARMOWSKI, J.; HINTZE, V.; KSCHONSEK, J.; KILLENBERG, M.; BÖHM, V. Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. **Food Chemistry**, v. 175, p. 593–600, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.010>>.

KAUPPI, A.; ANDERSSON, K. M.; BERGSTR, L. Probing the effect of superplasticizer adsorption on the surface forces using the colloidal probe AFM technique. **Cement and Concrete Research**, v. 35, p. 133–140, 2005.

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. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S1466856407001294/1-s2.0-S1466856407001294-main.pdf?\\_tid=bf4cec74-0508-11e8-8116-00000aab0f6b&acdnat=1517239765\\_79943da9cfb1b30680b1f16717a9e105](https://ac.els-cdn.com/S1466856407001294/1-s2.0-S1466856407001294-main.pdf?_tid=bf4cec74-0508-11e8-8116-00000aab0f6b&acdnat=1517239765_79943da9cfb1b30680b1f16717a9e105)>.

KING, M. B.; MUBARAK, A.; KIM, J. D.; BOTT, T. R. The mutual solubilities of water with supercritical and liquid carbon dioxides. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, n. 4, p. 296–302, 1992. Disponível em: <<http://ac.els-cdn.com/089684469290021B/1-s2.0->

089684469290021B-main.pdf?\_tid=387d2f1e-9e16-11e7-b9df-00000aacb35f&acdnat=1505920573\_bd44f14d44b3cb893bc6d7bf34b ddc>.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos Essenciais E Sua Extração Por Arraste a Vapor**, EMBRAPA, p. 24, 1991.

LEEKE, G.; GASPAR, F.; SANTOS, R. The effect of water on the solubilities of essential oils in dense CO<sub>2</sub>. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 3, p. 172–177, 2003.

LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721–727, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.008>>.

LÉVAL, G.; MARTÍN, Á.; DE PAZ, E.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; COCERO, M. J. Production of stabilized quercetin aqueous suspensions by supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 34–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.019>>.

LIMA, B. N. B.; CABRAL, T. B.; C. NETO, R. P.; TAVARES, M. I. B.; PIERUCCI, A. P. T. Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. **Polímeros**, v. 22, n. 5, p. 486–490, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282012000500015&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282012000500015&lng=pt&tlng=pt)>.

LINAK, W. P.; MILLER, C. A.; SEAMES, W. S.; WENDT, J. O. L.; ISHINOMORI, T.; ENDO, Y.; MIYAMAE, S. On trimodal particle size distributions in fly ash from pulverized-coal combustion. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 29, n. 1, p. 441–447, 2002. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S154074890280058X/1-s2.0-S154074890280058X-main.pdf?\\_tid=e0a8c1bc-d2ca-4209-8922-776e4848db33&acdnat=1528820707\\_c41fbef3dec4fcbcb8f2d4448f4b610](https://ac.els-cdn.com/S154074890280058X/1-s2.0-S154074890280058X-main.pdf?_tid=e0a8c1bc-d2ca-4209-8922-776e4848db33&acdnat=1528820707_c41fbef3dec4fcbcb8f2d4448f4b610)>.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.;

FERNÁNDEZ-PÉREZ, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 708–716, 1999. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0165993699001776/1-s2.0-S0165993699001776-main.pdf?\\_tid=f4a45e6c-ad00-11e7-8de7-0000aacb35f&acdnat=1507560707\\_34c212de6f44132285bda0a944643f46](https://ac.els-cdn.com/S0165993699001776/1-s2.0-S0165993699001776-main.pdf?_tid=f4a45e6c-ad00-11e7-8de7-0000aacb35f&acdnat=1507560707_34c212de6f44132285bda0a944643f46)>.

LUTHER, S. K.; BRAEUER, A. High-pressure microfluidics for the investigation into multi-phase systems using the supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 65, p. 78–86, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.029>>.

LUZZI, J. C. **Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico de Folhas de Louro – *Laurus nobilis* – frente às Bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis***. 2014. Disponível em: <<https://www.univates.br/bdu/bitstream/10737/464/1/2010JoaoLuzzi.pdf>>.

MACHADO JR, 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 CO<sub>2</sub>. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.007>>.

MAHDI JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475–485, 2006.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382–387, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/26.pdf>>.

MARTEAU, C.; FAVIER, D.; NARDELLO-RATAJ, V.; AUBRY, J. M. Dramatic solvent effect on the synergy between  $\alpha$ -tocopherol and BHT antioxidants. **Food Chemistry**, v. 160, p. 190–195, 2014. Disponível em: <<https://ac.els-cdn.com/S0308814614004610/1-s2.0->

S0308814614004610-main.pdf?\_tid=6cf77c36-d09e-4c96-b9d8-ecbe3564aaf2&acdnat=1526577646\_9c28b9053b55b56aff3a98bb2f5da4c3>.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 339–350, fev. 2008. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0169409X07002578/1-s2.0-S0169409X07002578-main.pdf?\\_tid=c43b3473-8229-4c4d-b2f0-06021a4da621&acdnat=1526911322\\_c5eddd41935a535f8b11cb7583b2089f](https://ac.els-cdn.com/S0169409X07002578/1-s2.0-S0169409X07002578-main.pdf?_tid=c43b3473-8229-4c4d-b2f0-06021a4da621&acdnat=1526911322_c5eddd41935a535f8b11cb7583b2089f)>.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, a R.; ROSA, P. T. V; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. a. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 1057–1063, 2003.

MATSUGUMA, L. S.; LACERDA, L. G.; SCHNITZLER, E.; SILVA CARVALHO FILHO, M. A. da; LANDI FRANCO, C. M.; DEMIATE, I. M. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*, B.) from two production areas of Paraná state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 701–713, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v52n3/v52n3a22.pdf>>.

MATTEA, F.; MARTÍN, Á.; MATÍAS-GAGO, A.; COCERO, M. J. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion:  $\beta$ -Carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 2, p. 238–247, 2009. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0896844609002861/1-s2.0-S0896844609002861-main.pdf?\\_tid=10ee7256-9d75-11e7-89f7-00000aacb361&acdnat=1505851358\\_b7289e913feae2488d6780b3267ffbe0](http://ac.els-cdn.com/S0896844609002861/1-s2.0-S0896844609002861-main.pdf?_tid=10ee7256-9d75-11e7-89f7-00000aacb361&acdnat=1505851358_b7289e913feae2488d6780b3267ffbe0)>.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions**. 3. ed. [s.l.] Taylor & Francis Group, LLC, 2003.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical

method. **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 2, p. 127–30, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268111>>.

MERGHNI, A.; MARZOUKI, H.; HENTATI, H.; AOUNI, M.; MASTOURI, M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. **Current Research in Translational Medicine**, v. 64, n. 1, p. 29–34, jan. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0369811415001017>>.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–16, nov. 2009. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S089684460900268X/1-s2.0-S089684460900268X-main.pdf?\\_tid=cdb38864-9e05-11e7-bea8-00000aacb362&acdnat=1505913522\\_82d060d6fb9f2daef54794981852c1d1](http://ac.els-cdn.com/S089684460900268X/1-s2.0-S089684460900268X-main.pdf?_tid=cdb38864-9e05-11e7-bea8-00000aacb362&acdnat=1505913522_82d060d6fb9f2daef54794981852c1d1)>.

MEZZOMO, N.; PAZ, E. De; MARASCHIN, M.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342–349, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.006>>.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. 2009. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 47–56, 2008. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0927775707007054/1-s2.0-S0927775707007054-main.pdf?\\_tid=fb120ac8-d9e8-11e7-bcdf-00000aacb361&acdnat=1512498213\\_4e73b210d84a66d3ffdbb39c058c7571](https://ac.els-cdn.com/S0927775707007054/1-s2.0-S0927775707007054-main.pdf?_tid=fb120ac8-d9e8-11e7-bcdf-00000aacb361&acdnat=1512498213_4e73b210d84a66d3ffdbb39c058c7571)>.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico** Norma Aprovada, 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM7\\_A6.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf)>.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na ciência e na indústria**. Unicamp, Campinas, 2001.

NIKOLIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; FERREIRA, I. C. F. R.; CALHELHA, R. C.; FERNANDES, Â.; MARKOVIĆ, T.; MARKOVIĆ, D.; GIWELI, A.; SOKOVIĆ, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183–190, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901300558X>>.

OKOH, O. O.; AFOLAYAN, A. J. The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. capensis. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 22, p. 2474–2478, 15 dez. 2011. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84055211929&doi=10.5897%2FAJPP11.570&partnerID=40&md5=a08ce5991defcfc59a1eac25c28abab5>>.

ORTEGA, F. S.; PANDOLFELLI, V. C.; RODRIGUES, J. A.; DE SOUZA, D. P. F. Aspectos da Reologia e da Estabilidade de Suspensões Cerâmicas. Parte III: Mecanismo de Estabilização Eletroestérica de Suspensões com Alumina. **Cerâmica**, v. 43, n. 281–282, p. 113–119, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-14982010000100004&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-14982010000100004&script=sci_arttext&tlng=es)>.

OUCHIKH, O.; CHAHED, T.; KSOURI, R.; TAARIT, M. Ben; FALEH, H.; ABDELLEY, C.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. **Journal of Food Composition**

**and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 103–110, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.006>>.

OZEK, T.; BOZAN, B.; BASER, K. H. C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of volatile components from leaves of *Laurus nobilis* L.\*. **Chem. of Natural Compounds**, v. 34, n. 6, p. 668–671, 1998.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315–27, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29518156>>.

PEIXOTO, L. R.; ROSALEN, P. L.; FERREIRA, G. L. S.; FREIRES, I. A.; DE CARVALHO, F. G.; CASTELLANO, L. R.; DE CASTRO, R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179–185, jan. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996916302898>>.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137–150, 2006. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0308814605003195/1-s2.0-S0308814605003195-main.pdf?\\_tid=91b500de-ad11-11e7-bca7-00000aab0f27&acdnat=1507567843\\_159e8c226a52310c887f7830b37d9779](https://ac.els-cdn.com/S0308814605003195/1-s2.0-S0308814605003195-main.pdf?_tid=91b500de-ad11-11e7-bca7-00000aab0f27&acdnat=1507567843_159e8c226a52310c887f7830b37d9779)>.

PINO, J.; BORGES, P.; RONCAL, E. The chemical composition of laurel leaf oil from various origins. **Food Nahrung**, v. 37, n. 6, p. 592–595, 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/food.19930370611>>.

RADAELLI, M.; DA SILVA, B. P.; WEIDLICH, L.; HOEHNE, L.; FLACH, A.; DA COSTA, L. A. M. A.; ETHUR, E. M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology** :



**publication of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424–30, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991289>>.

REÁTEGUI, J. L. P.; BARRALES, F. M.; REZENDE, C. A.; QUEIROGA, C. L.; MARTÍNEZ, J. Production of Copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 128–139, 2017.

REZENDE, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/72981/000381781.pdf?sequence=1>>.

RICHTER, M.; SOVOVÁ, H. The solubility of two monoterpenes carbon dioxide in supercritical. **Fluid Phase Equilibria**, v. 85, p. 285–300, 1993. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/037838129380020N/1-s2.0-037838129380020N-main.pdf?\\_tid=b31b6c14-e84a-47b8-b336-61beddba1966&acdnat=1523991708\\_90ad3ec3e568e276fafecf484fa70afa](https://ac.els-cdn.com/037838129380020N/1-s2.0-037838129380020N-main.pdf?_tid=b31b6c14-e84a-47b8-b336-61beddba1966&acdnat=1523991708_90ad3ec3e568e276fafecf484fa70afa)>.

ROSSI, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

RUNGQU, P.; OYEDEJI, O.; NKEH-CHUNGAG, B.; SONGCA, S.; OLUWAFEMI, O.; OYEDEJI, A. Anti-inflammatory activity of the essential oils of *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burt Davy from Eastern Cape, South Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 5, p. 426–31, maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261849>>.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Current Opinion in Colloid & Interface Science Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 61–72, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.003>>.

SANTOS, D. T.; MARTÍN, Á.; MEIRELES, M. A. A.; COCERO, M. J. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 167–174, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.011>>.

SANTOS, A. B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparation and characterization of paprika oleoresin microcapsules obtained by spray drying. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322–326, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000200024&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000200024&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

SANTOYO, S.; LLORÍA, R.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 5–6, p. 565–571, 8 mar. 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00217-005-0027-9.pdf>>.

SELLAMI, I. H.; BETTAIEB, I.; BOURGOU, S.; DAHMANI, R.; LIMAM, F.; MARZOUK, B. Essential oil and aroma composition of leaves, stalks and roots of celery (*Apium graveolens* var. dulce) from Tunisia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 513–521, 2012.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8216812>>.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v39n1/02.pdf>>.

SILVA, E. K.; AZEVEDO, V. M.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D.; MEIRELES, M. A. A. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. **Food Hydrocolloids**, v.

56, p. 71–83, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.006>>.

SILVA, E. K.; ROSA, M. T. M.; MEIRELES, M. A. A. Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 50–59, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.007>>.

SIMSEN, V. L.; LOBO, V. S. **Quantificação e estudo fotodegradativo do óleo essencial de folhas de louro (*Laurus nobilis* L.)** Curitiba/PR, 2012. .

SLOMKOWSKI, S.; ALEMÁN, J. V.; GILBERT, R. G.; HESS, M.; HORIE, K.; JONES, R. G.; KUBISA, P.; MEISEL, I.; MORMANN, W.; PENCZEK, S.; STEPTO, R. F. T. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2229–2259, 2011. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/pac.2011.83.issue-12/pac-rec-10-06-03/pac-rec-10-06-03.xml>>.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S1359029405000348/1-s2.0-S1359029405000348-main.pdf?\\_tid=0b71f82e-9e07-11e7-afd9-00000aab0f01&acdnat=1505914055\\_171160ab9b56eae03e805982237623f3](http://ac.els-cdn.com/S1359029405000348/1-s2.0-S1359029405000348-main.pdf?_tid=0b71f82e-9e07-11e7-afd9-00000aab0f01&acdnat=1505914055_171160ab9b56eae03e805982237623f3)>.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 323–331, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>>.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S. De; MARTINS, E. R. Óleos Essenciais: Aspectos Econômicos E Sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 10, p. 1–11, 2010.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>—

I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409–414, 1994.

STUPAR, M.; GRBIĆ, M. L.; DŽAMIĆ, A.; UNKOVIĆ, N.; RISTIĆ, M.; JELIKIĆ, A.; VUKOJEVIĆ, J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 118–124, jul. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629914000672>>.

SUN, Y.; ZHU, L.; WU, T.; CAI, T.; GUNN, E. M.; YU, L. Stability of Amorphous Pharmaceutical Solids: Crystal Growth Mechanisms and Effect of Polymer Additives. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 3, p. 380–388, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434258>>.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S000186860300157X/1-s2.0-S000186860300157X-main.pdf?\\_tid=de72bdc7-b055-4a83-9cd2-ccd15895e19b&acdnat=1539916892\\_3aa641f06a589e523914bc0d821aa69f](https://ac.els-cdn.com/S000186860300157X/1-s2.0-S000186860300157X-main.pdf?_tid=de72bdc7-b055-4a83-9cd2-ccd15895e19b&acdnat=1539916892_3aa641f06a589e523914bc0d821aa69f)>.

TAL-FIGIEL, B. The formation of stable W/O, O/W, W/O/W cosmetic emulsions in an ultrasonic field. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 5 A, p. 730–734, 2007. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0263876207731040/1-s2.0-S0263876207731040-main.pdf?\\_tid=882996de-0508-11e8-8c1f-00000aab0f27&acdnat=1517239664\\_93522072e61f3d9a57308f71cc64ea51](https://ac.els-cdn.com/S0263876207731040/1-s2.0-S0263876207731040-main.pdf?_tid=882996de-0508-11e8-8c1f-00000aab0f27&acdnat=1517239664_93522072e61f3d9a57308f71cc64ea51)>.

TASCH HOLKEM, A.; FRANCO CODEVILLA, C.; DE BONA DA SILVA, C.; RAGAGNIN DE MENEZES, C. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 87, 2015. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/19720>>.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction,

Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231–R1249, 2014.

TRANCOSO, M. D.; BAPTISTA, B. A. V.; GOMES, G. A.; GONZALES, M. M.; RIBEIRO, T. B. **Óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano**. p. 13–14, 2017.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1–2, p. 85–99, dez. 2004. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S1570023204007640/1-s2.0-S1570023204007640-main.pdf?\\_tid=ccfa2416-ae8e-11e7-a1e1-00000aab0f01&acdnat=1507731580\\_2f1170533da04d42329e570d9a0256ad](https://ac.els-cdn.com/S1570023204007640/1-s2.0-S1570023204007640-main.pdf?_tid=ccfa2416-ae8e-11e7-a1e1-00000aab0f01&acdnat=1507731580_2f1170533da04d42329e570d9a0256ad)>.

TYAGI, V. V.; KAUSHIK, S. C.; TYAGI, S. K.; AKIYAMA, T. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1373–1391, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.10.006>>.

UD-DAULA, A. F. M. S.; DEMIRCI, F.; ABU SALIM, K.; DEMIRCI, B.; LIM, L. B. L.; BASER, K. H. C.; AHMAD, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etilingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 189–198, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015306208>>.

VARONA, S.; RODRÍGUEZ ROJO, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J.; SERRA, A. T.; CRESPO, T.; DUARTE, C. M. M. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 243–250, mar. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012002853>>.

VILEGAS, J. H. Y. **Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas**

**medicinais brasileira**. 1997. Universidade de São Paulo, 1997.

VILELA, J.; MARTINS, D.; MONTEIRO-SILVA, F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.; DE ALMEIDA, J. M. M. M.; SARAIVA, C. Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinallis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 71–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.002>>.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303–313, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417701000712>>.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. **Materials for encapsulation**. p. 31-100, 2010.

WASEEM, R.; LOW, K. H. Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 38, p. 483–501, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403494>>.

WEBER, F. H.; QUEIROZ, F. P. C.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748–753, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/08.pdf>>.

WOLFFENBÜTTEL, A. Mas afinal o que são óleos essenciais? **Informativo CRQ-V**, v. XI, p. 6–7, 2007.

YIM, J. H.; KIM, W. S.; LIM, J. S. Recrystallization of adefovir dipivoxil particles using the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 82, p. 168–176, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.07.009>>.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais**

**novos fármacos e a moderna farmacognosia.** 4<sup>o</sup> ed., Itajaí, p. 251-297, 2014.

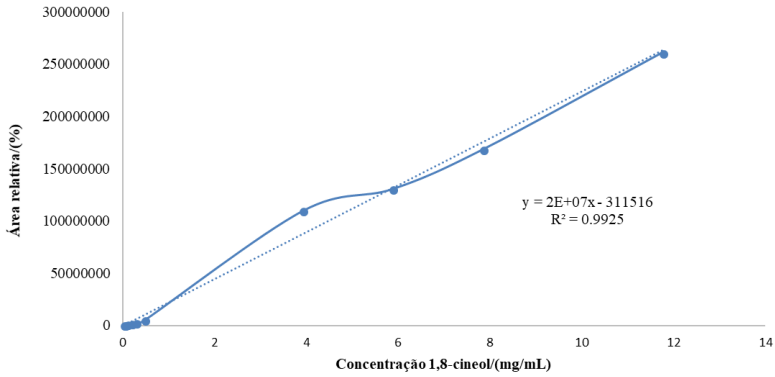
ZENG, L.; XIN, X.; ZHANG, Y. Development and characterization of promising Cremophor EL-stabilized o/w nanoemulsions containing short-chain alcohols as a cosurfactant. **RSC Advances**, v. 7, n. 32, p. 19815–19827, 2017.

ZOBEL, H. F. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. **Starch Stärke**, v. 40, p. 44–50, 1988.

## APÊNDICES

## Apêndice A

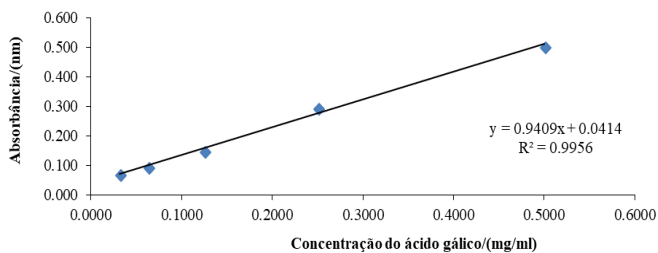
Figura A.1: Curva de calibração para determinação da concentração de 1,8-cineol por GC-FID.





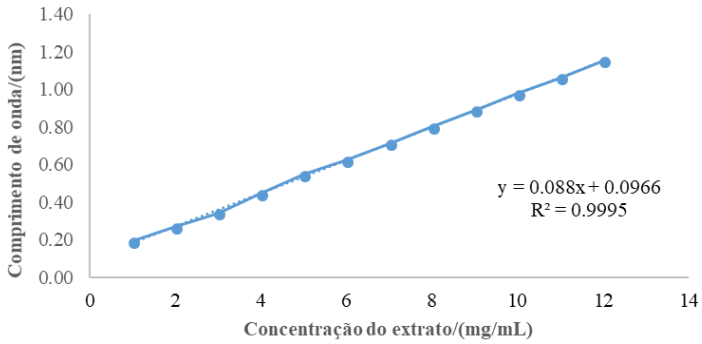
## Apêndice B

Figura B.1: Curva de calibração para determinação da concentração do ácido gálico.



## Apêndice C

Figura C.1: Curva de calibração para determinação da concentração do óleo essencial da folha de louro por UV-Vis.



## Apêndice D

Figura D.1: Curva de calibração para determinação da concentração do teor residual do diclorometano.

