

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES

PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CAMPUS DE ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMANDA STAUDT

**ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA
(*Cymbopogon winterianus*) COM ÁCIDO CINÂMICO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

ERECHIM – RS

2018

AMANDA STAUDT

**ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA
(*Cymbopogon winterianus*) COM ÁCIDO CINÂMICO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Orientadora: Natália Paroul

Coorientador: Alexander Junges

ERECHIM – RS

2018

AMANDA STAUDT

**ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA
(*Cymbopogon winterianus*) COM ÁCIDO CINÂMICO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Erechim, 23 de janeiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Natália Paroul

URI – Erechim

Prof. Dr Alexander Junges

URI - Erechim

Prof. Dr Rogério Luis Cansian

URI – Erechim

Prof. Dr^a Ivana Correa Ramos Leal

UFRJ

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Milton e Nádia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de crescer e evoluir nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais, Milton e Nádia, por todo amor, apoio e dedicação. Vocês são meus maiores exemplos e motivos de orgulho.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Karine Dalla Costa e Jean Rauschkolb, por todo apoio e companheirismo neste período. Vocês são os melhores parceiros da vida.

Aos alunos de iniciação científica Giulia Baretta, Willian Trentin e Júlia Lisboa por toda ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Química Ambiental – LaQAm que faziam com que os dias no subsolo ficassem mais alegres.

Aos membros do Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos – LaProNEB da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que tão bem me receberam. Em especial aos queridos Daniel, Camila, Maria Sandra, Felipe, Patrick e Bruna por toda ajuda durante minha missão. Vocês são muito especiais para mim.

A professora Naomi Kato Simas, do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Ivana Correa Ramos Leal, do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por todo apoio, ajuda e comprometimento.

Ao professor Rogério Dallago, pela ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Ao meu querido coorientador Alexander Junges, por toda ajuda, apoio, boas ideias e comprometimento. Por fazer com que eu me esforçasse sempre mais, por acreditar em mim, por me atender em todo momento e por alegrar meus dias de trabalho. Meu mais sincero muito obrigada!

A minha querida orientadora Natália Paroul, por todo apoio, por acreditar no meu potencial, por instigar minha curiosidade, por todo comprometimento e parceria. Muito obrigada!

Duas estradas se bifurcaram no meio da minha vida, ouvi um sábio dizer. Peguei a estrada menos usada. E isso fez toda a diferença cada noite e cada dia.

(Larry Norman)

RESUMO

O óleo essencial de citronela é amplamente aplicado nas indústrias farmacêutica, de perfumaria e cosmética por apresentar atividade analgésica, anticonvulsiva, antifúngica, antibacteriana, e também é o principal constituinte de repelentes para mosquitos. Ésteres de ácido cinâmico são motivos de interesse científico devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com potencial aplicação nas indústrias alimentícia e de cosméticos. Sistemas de esterificação enzimática são preferíveis quando comparados aos métodos químicos devido sua alta eficiência, seletividade e por utilizar condições reacionais brandas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de ésteres a partir do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) com ácido cinâmico via esterificação enzimática e avaliar a toxicidade e atividades antioxidante, antimicrobiana e larvicida dos substratos utilizados e ésteres produzidos. A cinética de esterificação enzimática conduzida em sistema de agitação mecânica foi realizada em condições de 70°C e 150 rpm, pela mistura de ácido cinâmico e óleo essencial de citronela (3:1), com solvente n-heptano e 15% em peso de enzima Novozym 435 ou NS 88011. A conversão de substratos em ésteres foi determinada por cromatografia gasosa. Através da cinética de reação enzimática determinou-se o tempo de 48 horas quando aplicada a enzima Novozym 435 e 52 horas para a enzima NS 88011 como os tempos onde houve maior taxa de conversão. Quando avaliada a reação de esterificação com massa de enzima de 5, 10 e 15% em peso determinou-se a concentração de 15% como a concentração em que houve maior produção. Após determinar o tempo e concentração de enzimas ótimos para a reação, a reação foi realizada em sistema fechado, obtendo conversões de 81% de citronelol e 87,7% de geraniol para reação catalisada por Novozym 435 e 58,7% de citronelol e 69% de geraniol para reação com NS 88011. Para a atividade de esterificação enzimática, determinada por método titulométrico, obteve-se redução de 43% e 39% de atividade das enzimas Novozym 435 e NS 88011, respectivamente. Para a toxicidade frente à *Artemia salina* foram obtidos resultados de CL_{50} de 5,29 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial de citronela, 4,36 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os ésteres produzidos com enzima NS 88011 e 2,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os ésteres produzidos com enzima Novozym 435. Para a atividade antioxidante, determinada pela técnica de neutralização do radical DPPH, a esterificação diminuiu o poder antioxidante do óleo essencial de citronela. Em estudo de atividade antimicrobiana frente à bactéria ATCC 33591 (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina) determinado por método de Concentração Mínima Inibitória (CMI) por microdiluição em placa, obteve-se CMI de 148 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido cinâmico, 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os ésteres obtidos com enzima NS 88011, 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial de citronela e CMI igual a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os ésteres obtidos com enzima Novozym 435. Para a bactéria clínica 517 somente do óleo esterificado com a enzima Novozym 435 apresentou atividade nas concentrações testadas, obtendo CMI de 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Com ensaio de atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* obteve-se CL_{50} de 111,84 ppm para o óleo essencial de citronela, 44,03 ppm para o ácido cinâmico, 86,30 ppm para os ésteres obtidos com enzima NS 88011 e 71,87 ppm para os ésteres obtidos com a enzima Novozym 435. Sendo assim, conclui-se que a esterificação dos álcoois geraniol e citronelol provenientes do óleo essencial de citronela é de grande valia quando o objetivo for a aplicação como agente citotóxico, antimicrobiano e larvicida.

Palavras-chave: Óleo essencial de citronela, esterificação, cinamato de geranila, cinamato de citronelila, atividades biológicas.

ABSTRACT

Citronella essential oil is widely applied in the pharmaceutical, cosmetology and perfumery industries because it exhibits analgesic, anticonvulsive, antifungal, antibacterial activity and is also the main constituent of mosquito repellents. Cinnamic acid esters are reasons of scientific interest due to their antioxidant and antimicrobial properties, with potential application in the food and cosmetic industries. Enzymatic esterification systems are preferable when compared to chemical methods because of their high efficiency, selectivity and by using mild reaction conditions. The objective of the present study was to evaluate the production of esters from the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus*) with cinnamic acid via enzymatic esterification and to evaluate the toxicity, antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities of the substrates used and the esters produced. The kinetics of enzymatic esterification conducted in a mechanical stirring system were carried out under conditions of 70°C and 150 rpm, by mixing cinnamic acid and citronella essential oil (3: 1) with n-heptane as solvent and 15% by weight of enzyme Novozym 435 or NS 88011. The conversion of substrates to esters was determined by gas chromatography. By the kinetics of enzymatic reaction the time of 48 hours was determined when the enzyme Novozym 435 were applied and 52 hours were applied the enzyme NS 88011 as the times with the highest conversion rate. When the esterification reaction with an enzyme mass of 5, 10 and 15% by weight was evaluated, the concentration of 15% was determined as the concentration at which there was higher production. After determining the optimum time and enzyme concentration for the reaction, the reaction was carried out in a closed system, obtaining conversions of 81% of citronellol and 87,7% of geraniol for reaction catalyzed by Novozym 435 and 58,7% of citronellol and 69 % geraniol for reaction with NS 88011. For the enzymatic esterification activity, determined by titulometric method, 43% and 39% reduction of Novozym 435 and NS 88011 enzyme activity were obtained, respectively. For the toxicity to *Artemia salina*, LC₅₀ results of 5,29 µg.mL⁻¹ were obtained for the essential oil of citronella, 4,36 µg.mL⁻¹ for the esters produced with enzyme NS 88011 and 2,62 µg. mL⁻¹ for esters produced with Novozym 435 enzyme. For the antioxidant activity, determined by the DPPH radical neutralization technique, esterification decreased the antioxidant power of citronella essential oil. In a study of antimicrobial activity against the bacterium ATCC 33591 (*Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin), determined by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by plaque microdilution, it was obtained MIC of 148 µg.mL⁻¹ for cinnamic acid, 512 µg .mL⁻¹ for esters obtained with enzyme NS 88011, 256 µg.mL⁻¹ for citronella essential oil and MIC equal to 128 µg.mL⁻¹ for the esters obtained with Novozym 435 enzyme. For the clinical bacterium 517 only of esterified oil with Novozym 435 enzyme showed activity at the tested concentrations, obtaining MIC of 256 µg.mL⁻¹. A test of larvicidal activity against larvae of the *Aedes aegypti* mosquito yielded LC₅₀ of 111,84 ppm for citronella essential oil, 44,03 ppm for cinnamic acid, 86,30 ppm for esters obtained with NS 88011 enzyme and 71,87 ppm for the esters obtained with Novozym 435 enzyme. Therefore, it is concluded that the esterification of the geraniol and citronellol alcohols from the citronella essential oil is of great value when the aim is the application as a cytotoxic, antimicrobial and larvicidal agent.

Key words: Citronella essential oil; esterification; geranyl cinnamate; citronellil cinnamate; biological activities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	24
Figura 2 – Número de publicações científicas acerca de óleos essenciais empregados como inseticidas por ano.....	29
Figura 3 – Estrutura química do ácido cinâmico.....	31
Figura 4 – Exemplos de reações catalisadas por lipases.....	36
Figura 5 – Esquema de plaqueamento para determinação de CMI.....	45
Figura 6 – Esquema de esterificação enzimática de geraniol e citronelol com ácido cinâmico.....	47
Figura 7 – Comparativo de produção de ésteres cinamato de geranila e citronelila utilizando as enzimas Novozym 435 e NS 88011.....	50
Figura 8 – Cromatograma da mistura reacional.....	51
Figura 9 – Cromatograma para a reação de 48 horas utilizando a enzima Novozym 435.....	51
Figura 10 – Cromatograma para a reação de 52 horas utilizando a enzima NS 88011.....	52
Figura 11 – Comparativo de produção de ésteres obtidos por reação enzimática de 52 horas utilizando enzima NS 88011.....	56
Figura 12 – Comparativo de produção de ésteres obtidos por reação enzimática de 48 horas utilizando enzima Novozym 435.....	56
Figura 13 – Porcentagem de náuplios de <i>Artemia salina</i> mortos em relação ao aumento da concentração de amostras.....	59
Figura 14 – Porcentagem de neutralização do radical DPPH em relação ao aumento da concentração de amostras.....	61
Figura 15 – Representação da porcentagem de larvas de <i>Aedes aegypti</i> mortas em função do aumento da concentração de amostras.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>) obtida por cromatografia gasosa com espectrometria de massas.....	48
Tabela 2 – Representação do consumo dos substratos e produção de ésteres para reação conduzida com enzima Novozym 435 num tempo de 48 horas e NS 88011 em tempo de reação de 52 horas.....	52
Tabela 3 – Taxa de conversão em produtos para a reação sob agitação mecânica de 48 horas aplicando enzima Novozym 435 e 52 horas utilizando a enzima NS 88011.....	53
Tabela 4 – Taxa de conversão de substratos em ésteres para reação realizada em micro-ondas.....	54
Tabela 5 – Representação do consumo dos substratos e produção de ésteres para reação em sistema fechado conduzida com enzima NS 88011 como biocatalisadora num tempo de 52 horas e com enzima Novozym 435 num tempo de 48 horas.....	57
Tabela 6 – Representação da atividade enzimática das enzimas Novozym 435 e NS 88011 antes e após reação de esterificação.....	58
Tabela 7 – Correlação entre a quantidade de artemias mortas (%) e concentração de amostras com determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀).....	60
Tabela 8 – Concentração Mínima Inibitória do ácido cinâmico, óleo essencial de citronela e óleos esterificados frente às bactérias ATCC 33591 e 517.....	63
Tabela 9 - Correlação entre quantidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> mortas (%) e concentração de amostras com determinação da Concentração Letal Média.....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Óleos essenciais.....	20
3.1.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	22
3.1.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	26
3.1.3 Atividade larvicida de óleos essenciais.....	28
3.1.4 Óleo essencial de citronela.....	30
3.2 Ácido cinâmico.....	31
3.2.1 Ésteres de ácido cinâmico.....	32
3.3 Sistemas enzimáticos.....	34
3.3.1 Enzima.....	35
3.3.2 Lipase.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Material.....	38
4.1.1 Enzimas.....	38
4.1.2 Reagentes.....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Cinética de esterificação.....	39
4.2.2 Determinação da conversão em éster.....	40
4.2.3 Determinação de atividade enzimática de esterificação.....	41
4.2.4 Avaliação de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	42
4.2.5 Determinação da atividade antioxidante.....	42

4.2.6 Determinação da atividade antibacteriana.....	43
4.2.7 Determinação da atividade larvicida.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Composição química do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>).....	48
5.2 Avaliação de tempo reacional.....	49
5.2.1 Esterificação em sistema de agitação mecânica.....	49
5.2.2 Esterificação em sistema de micro-ondas.....	54
5.3 Avaliação de influência enzimática na produção de ésteres.....	55
5.4 Esterificação enzimática de óleo essencial de citronela.....	57
5.5 Atividade de esterificação enzimática.....	58
5.6 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>.....	59
5.7 Estudo de atividade antioxidante.....	61
5.8 Estudo de atividade antibacteriana.....	63
5.9 Estudo de atividade larvicida.....	64
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Ésteres de ácido cinâmico mostram-se motivo de interesse científico, pois apresentam diversas propriedades terapêuticas e promissora aplicação nas áreas alimentícia e cosmética. Esses ésteres podem ser obtidos através de processos de esterificação ou transesterificação (SOUZA, 2016).

Cada vez mais vêm-se pesquisando rotas enzimáticas para obtenção desses produtos. As rotas enzimáticas mostram-se mais promissoras quando comparadas às rotas químicas, principalmente por sua alta seletividade, diminuindo assim a formação de compostos indesejados (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; SHARMA; CHAUHAN; KANWAR, 2011; SOUZA, 2016).

Os óleos essenciais mostram-se bons substratos em reações de esterificação por possuírem em suas composições diversos álcoois. De acordo com Wolffenbütel (2010) os óleos essenciais possuem em sua composição cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, fenóis, entre outros.

Dentre os álcoois presentes na composição dos óleos essenciais destacam-se os terpenos, produzidos a partir da síntese do ácido mevalônico, formados pela ligação entre unidades isoprênicas. Dentre as diferentes classes de terpenos, vale ressaltar os monoterpenos, que são substâncias formadas por duas unidades isoprênicas originando uma cadeia composta por dez átomos de carbono (DEWICK, 1997; CABALLERO; TRUGO; FINGLAS, 2003).

Exemplos de monoterpenos, e que serão utilizados como substratos nas reações de esterificação do presente estudo, são o geraniol e citronelol, componentes majoritários do óleo essencial de citronela.

De acordo com Paduch *et al.* (2007) os terpenos possuem diversas atividades biológicas, sendo aplicados como agente antimicrobiano, fungicida, antiviral e antiparasitário. Na literatura são encontrados diversos relatos em relação à aplicação de óleos essenciais e seus constituintes como agentes biológicos. Por exemplo, o eugenol possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005), já o óleo essencial de cravo-da-índia

(*Caryophyllus aromaticus*) pode ser utilizado no tratamento de náuseas, flatulências, indigestão e diarreia (PAOLI *et al.*, 2007) e tem sido usado como medicamento para o tratamento da asma, doenças alérgicas e também como vermífugo (SINGH; BAGHOTIA; GOEL, 2012).

Monoterpenos podem ser utilizados também frente a células tumorais, por exemplo o álcool perílico apresenta-se eficaz no controle de células de adenocarcinoma pancreático (MIA PaCa-2) (YERUVA *et al.*, 2007) e de linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) (LEBEDEVA *et al.*, 2007), entre outros.

A citronela, da família Poaceae, da espécie *Cymbopogon winterianus*, é uma planta perene, muito resistente a alterações climáticas, com possibilidade de cultivo em diferentes regiões do Brasil. O óleo essencial proveniente desta planta pode ser aplicado nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, e é um produto largamente utilizado como repelente de mosquitos (SHASANY *et al.*, 2000; CASSEL; VARGAS, 2006; AZAREDO *et al.*, 2007).

Alguns estudos estão disponíveis na literatura sobre a produção de cinamatos e também a produção de ésteres a partir dos álcoois primários, geraniol e citronelol, presentes no óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*).

Paroul *et al.* (2012) em estudo de produção de *bioflavors* por esterificação enzimática do óleo essencial de citronela em sistema livre de solvente, comparando dois diferentes ácidos (ácidos oleico e propiônico), observaram que a técnica utilizada é promissora devido a alta conversão dos álcoois geraniol e citronelol em ésteres. No ensaio utilizando o ácido oleico obteve-se maior produção nas condições de razão molar 1:1, temperatura igual a 70°C e concentração de enzima de 10% em peso, obtendo uma conversão de 98,9% de oleato de citronelila e 82,5% de oleato de geranila. No ensaio utilizando ácido propiônico a produção foi de 92,95% de propionato de citronelila e 96,51% de propionato de geranila, nas mesmas condições do ensaio com ácido oleico.

Zanetti *et al.* (2016) em avaliação da síntese de cinamato de geranila por reação catalisada por lipase obtiveram uma conversão em éster de 75,85% sob

condições de razão molar de 3:1 (geraniol:ácido cinâmico), 70°C e concentração de enzima lipase de *Candida antarctica* imobilizada (NS 88011) igual a 15% em peso.

Tendo em vista o potencial terapêutico dos ésteres de ácido cinâmico e do óleo essencial de citronela e como forma de agregar valor ao óleo, justifica-se a realização do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de ésteres a partir do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) via esterificação enzimática com ácido cinâmico, bem como a toxicidade e as atividades antibacteriana, antioxidante e larvicida do óleo antes e após a esterificação.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do óleo essencial de citronela;
- Avaliar a produção de ésteres em sistemas de agitação mecânica e de irradiação de micro-ondas;
- Avaliar a esterificação com as enzimas Novozym 435 e NS 88011 bem como a influência mássica das mesmas na reação;
- Avaliar a toxicidade dos substratos e óleo esterificado frente à *Artemia salina*;
- Estudar a atividade antioxidante dos substratos e produtos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos substratos e produtos frente à bactéria *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a atividade larvicida dos substratos e produtos frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica sobre os temas relacionados à esterificação enzimática do óleo essencial de citronela com ácido cinâmico visando à obtenção de cinamatos de geranila e citronelila.

3.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis provenientes de células especiais das plantas podendo ser encontrados em forma concentrada em alguns órgãos, como folhas, cascas e frutos (CONNER, 1993; MU'AZU; MOHAMMED-DABO; WAZIRI, 2012). No entanto, segundo Raut e Karuppayil (2014) óleos essenciais de diferentes partes das plantas como flores, folhas, raízes, frutos e cascas exibem diferentes propriedades biológicas e medicinais.

Segundo Djilani e Dicko (2012) cerca de 3000 óleos essenciais foram produzidos a partir de 2000 espécies de plantas, porém somente cerca de 300 são importantes no ponto de vista comercial. Relatam também que produzia-se de 40 a 60 mil toneladas de óleos essenciais por ano, o que mostra que a produção e o consumo de óleos essenciais é crescente no mundo. Ainda, de acordo com Bizzo (2013), o mercado mundial de óleos essenciais movimentou cerca de US\$ 15 bilhões por ano, apresentando crescimento aproximado de 11% ao ano.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas. Geralmente um líquido com odor característico, contendo em sua composição terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (DORMAN; DEANS, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os terpenoides e fenilpropanóides são os constituintes majoritários dos óleos essenciais, sendo que os monoterpenos e sesquiterpenos são os compostos de maior importância. Além disso, na composição dos óleos estão presentes também

compostos aromáticos e alifáticos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; KNAAK; FIUZA, 2010).

Os monoterpenos, como geraniol e citrionelol, mostram-se ótimos substratos em reações de esterificação. Estas substâncias são formadas pela ligação cabeça-cauda de duas unidades de isopreno (C_5), formando uma cadeia carbônica com dez átomos de carbono (C_{10}), sendo que o precursor dos monoterpenos e formadores do isopreno é o ácido mevalônico, oriundo da reação de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA) (DEWICK, 1997; McCASKILL; CROTEAU, 1997).

A composição química dos óleos essenciais obtidos de vegetais é muito abrangente, sendo esta a principal responsável por proporcionar propriedades funcionais aos óleos. No entanto, diversos fatores podem ser responsáveis pela versatilidade da composição química, dentre eles destacam-se as condições edafoclimáticas, que são extrínsecas à biologia vegetal tal como clima, relevo, temperatura e umidade do ar, e fatores dependentes da fisiologia das plantas, como seu desenvolvimento, quimiotipos, formas de manejo, extração e armazenamento (ZAGO *et al.*, 2009; SANTURIO, 2011).

Esses óleos podem ser obtidos por diversos métodos como destilação, hidrodestilação, maceração, extração utilizando solvente e gases supercríticos (GUSMÃO *et al.*, 2013; TIMUNG *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais de origem vegetal são de grande importância na indústria. São comumente utilizados como aromatizantes em produtos alimentares, bebidas, perfumaria, cosméticos e produtos farmacêuticos. Podem ainda ser utilizados como fumigantes e inseticidas de contato e também como repelentes (BURT, 2004; KHERADMAND; NOORI; SABAHI, 2010; PARANAGAMA; GUNASEKERA, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2013)

Uma aplicação é apresentada pela patente WO 2016187682 A1 (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Unicamp, 2016) que se refere a uma composição a base da mistura de extratos/óleos essenciais de *Pterodon pubescens* e *Cordia verbenacea*, que é aplicada na área farmacológica no tratamento de afecções músculo-esquelética agudas ou crônicas.

Já a patente WO 2016044903 A1 (EMBRADERM - Emp. Brasileira de Dermocosméticos Erelí, 2016) refere-se a uma composição química para elaboração de spray antimicrobiano orgânico constituído de diversos óleos naturais, como óleos de andiroba, copaíba, melaleuca e lavanda.

Gusmão *et al.* (2013) em estudo sobre a toxicidade de contato e fumigante e repelência dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon winterianus* e *Foeniculum vulgare* contra *Callosobruchus maculatus*, perceberam através dos índices de repelência que os óleos de *E. citriodora* e *C. winterianus* podem ser classificados como repelentes, *F. vulgare* foi classificado como neutro, não apresentando poder repelente, já o óleo de *E. staigeriana* foi neutro em concentrações menores que 558 ppm e repelente em concentrações superiores a esta. Os autores perceberam também que o óleo de citronela, *C. winterianus*, na concentração de 622,5 ppm, reduziu em 100% a oviposição e o surgimento de *Callosobruchus maculatus* em grãos de feijão.

Devrnja *et al.* (2017) em estudo comparativo de atividade antimicrobiana e citotóxica de óleo essencial e extrato metanólico de *Tenacetum vulgare* L., visualizaram que o óleo essencial de *T. vulgare* exibiu efeito antifúngico contra oito fungos, apresentando maior atividade contra *Penicillium funiculosum*. Já, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas o óleo foi mais eficiente contra as bactérias *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*.

De acordo com Bakkali *et al.* (2008) pesquisadores de todo o mundo estão estudando óleos essenciais com o objetivo de determinar suas propriedades biológicas como antimicrobiano, antiviral, antimutagênico, anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório e antiprotzoários.

3.1.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Uma das principais causas de deterioração de alimentos é o desenvolvimento microbiano, sendo que este é geralmente relacionado à perda de qualidade e segurança do alimento. Apesar de as indústrias de alimentos utilizarem os óleos

essenciais como agentes aromatizantes, os mesmos representam uma alternativa como agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais, podendo ser aplicados na conservação e garantia da qualidade dos produtos (VANIN, 2014). Entretanto, segundo Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012), a aplicação de óleos essenciais na conservação de alimentos exige algumas informações sobre suas propriedades, dentre estas encontra-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI), os microorganismos susceptíveis, modo de ação e efeito da matriz alimentar frente suas propriedades antimicrobianas.

Devido ao aumento de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) a preocupação com bactérias e fungos patogênicos em alimentos é crescente. Os óleos essenciais e extratos de plantas são agentes antimicrobianos naturais com potencial aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica (OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010; VICTÓRIA, 2010; VANIN, 2014).

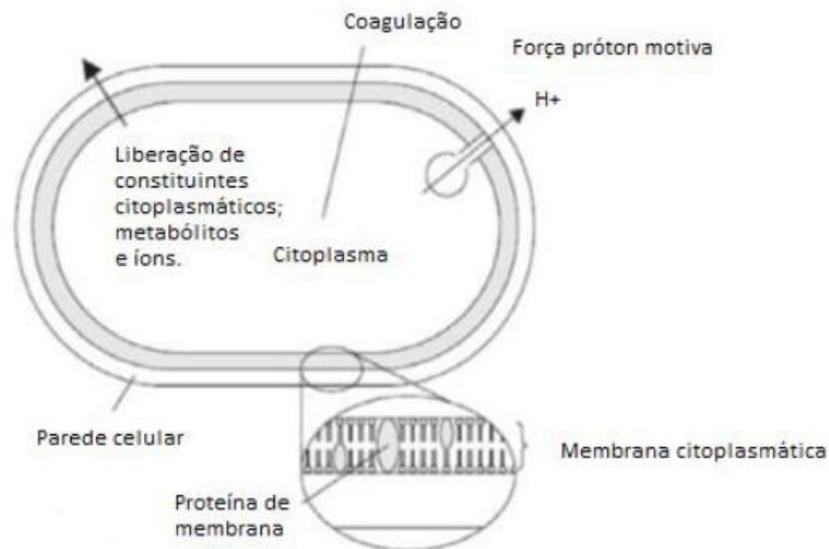
Segundo Okoh, Sadimenko e Afolayan (2010) desde que o uso de aditivos naturais tornou-se relevante como substituto dos conservantes sintéticos artificiais, a propriedade antimicrobiana de óleos essenciais é vista com grande interesse pelas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos.

De acordo com Nazzaro *et al.* (2013) a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende da composição química do mesmo, concentração de compostos e seus componentes majoritários. No entanto, a identificação dos compostos antimicrobianos mais eficientes presentes nos óleos essenciais é complexa devido a presença de inúmeros componentes diferentes, e também pelo fato de que a quantidade desses componentes varia com a época de colheita, fase de desenvolvimento da planta, método de extração do óleo, dentre outros fatores (ESPINA *et al.*, 2011).

As formas mais comuns com que os óleos essenciais agem nas bactérias estão relacionadas com a capacidade do óleo de provocar mudanças funcionais e estruturais na membrana citoplasmática, como mostrado na Figura 1, ocasionando em um aumento da permeabilidade da mesma, acarretando em perda de conteúdo celular, ATP e íons. Os óleos essenciais podem danificar alvos intracelulares, como proteínas e lipídios, devido coagulação citoplasmática, acarretando em inibição da

divisão bacteriana e das atividades enzimáticas (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2012).

Figura 1 – Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana



Fonte: Adaptado de BURT (2004).

Óleos essenciais derivados de plantas tem apresentado grande atividade inibitória contra várias bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (LANG; BUCHBAUER, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Lou *et al.* (2017) em estudo sobre a atividade antibacteriana, antioxidante e antibiofilme do óleo essencial de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* e sua nanoemulsão, visualizaram, por ensaio *pour plate*, que em concentração de 0,48 mg.mL⁻¹ de óleo essencial puro houve uma inibição de aproximadamente 67% frente a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), já para a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) a taxa de inibição na mesma concentração foi de cerca 63%.

Rather *et al.* (2012), em estudo de atividade antibacteriana de *Juglans regia* L. frente à cepas de bactérias padrões e clínicas por técnica de concentração mínima inibitória (CMI), observaram que este óleo essencial atua como antibacteriano frente às bactérias *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 435),

Pseudomonas aeruginosa (MTCC 1688), *Proteus vulgaris* (MTCC 321), e às bactérias clínicas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* e *Klebsiella pneumoniae*. Sendo que as bactérias *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *S. aureus* foram mais sensíveis ao óleo avaliado, já as bactérias *S. typhi*, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram as mais resistentes.

Djenane *et al.* (2012) visualizaram, por método de difusão em disco e concentração inibitória mínima, que os óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Mentha piperita* são muito eficazes na inibição de *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 4267) e *Staphylococcus aureus* (CECT 4459) tanto em experimento *in vitro* quanto em carne picada contaminada.

Bajer *et al.* (2017) em estudo sobre composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial, água aromática destilada e infusão de ervas de *Epilobium parviflorum* Schreb., verificaram, por método de concentração inibitória mínima, que o óleo essencial de *E. parviflorum* apresenta atividade antimicrobiana significativa contra bactérias clínicas Gram-positivas, Gram-negativas e levedura, sendo que o óleo analisado inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Enterococcus faecalis* (PKN 079), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) e *Candida albicans* (CCM 3215).

Machado (2011) em avaliação da ação antimicrobiana de 27 óleos essenciais de uso em aromaterapia frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), verificou que os óleos testados, utilizando resultados de CMI₉₀ (Concentração Inibitória Mínima para 90% da população bacteriana) das bactérias testadas, foram mais eficientes à linhagem de *S. aureus*. Sendo que obteve valor de CMI₉₀ de 0,21 mg.mL⁻¹ para os óleos de pimenta negra (*Piper nigrum*) e árvore de chá (*Melaleuca alternifolia*) para *S. aureus*. Para *E. coli*, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) foi o mais eficaz, com valor de CMI₉₀ de 2,0 mg.mL⁻¹, enquanto que para *P. aeruginosa* o óleo de cravo-da-índia (*Syzigium aromaticum*) foi o mais efetivo com CMI₉₀ igual a 8,29 mg.mL⁻¹.

3.1.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Oxidação lipídica é o termo usado para descrever alterações químicas resultantes da interação de lipídios com o oxigênio. Durante as reações de oxidação lipídica, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios degradam-se, formando moléculas pequenas e voláteis que produzem os aromas indesejáveis conhecidos como rancidez oxidativa, que são prejudiciais a qualidade dos alimentos (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2007).

De acordo com Sevanian e Hochstein (1985) a oxidação lipídica ocorre em três fases principais: iniciação, propagação e terminação. O início da oxidação lipídica decorre da interação de um iniciador com o oxigênio ativado, podendo reagir com o ácido graxo insaturado, fazendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à dupla ligação do ácido graxo, resultando na formação de radicais alílicos (SEVANIAN; HOCHSTEIN, 1985; KANNER, 1994). A próxima etapa, chamada de propagação, é caracterizada por diversas reações que levam à formação de diversos peróxidos (GRAY, 1978). Com o esgotamento dos substratos, ocorre o término das reações de propagação, e inicia-se a formação dos produtos finais. Sendo assim, as reações de terminação são caracterizadas pela formação de produtos finais estáveis ou não reativos (KUBOW, 1993).

Esse processo, além de causar perdas nutricionais e gerar compostos indesejáveis podem também ser prejudiciais à saúde humana (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007). A ingestão oral de produtos derivados da auto-oxidação de óleos provoca degeneração de tecidos linfóides (OARADA *et al.*, 1988), estando relacionados com diversos problemas de saúde, como envelhecimento, arteriosclerose, câncer, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, diabetes e asma (EDRIS, 2007).

No entanto, consegue-se o equilíbrio dos radicais livres através de diferentes antioxidantes, que são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, que podem ser sintéticos ou naturais, como organosulfurados, flavonoides e constituintes fenólicos que fazem parte da constituição de diversos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006; CAVAR *et al.*, 2012; SANCHEZ-VIOQUE *et al.*, 2013).

Antioxidantes se apresentam como uma forma de prevenção da deterioração oxidativa dos alimentos e para minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Tendo em vista que o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos vem sendo questionado, devido a possibilidade desses antioxidantes apresentarem efeito tóxico, pesquisas vem sendo realizadas na busca de compostos com esta função a partir de fontes naturais, como é o caso dos óleos essenciais (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001; MELO; GUERRA, 2002; SÁNCHEZ *et al.*, 2010; VANIN, 2014).

De acordo com Del Ré e Jorge (2012) a atividade antioxidante dos óleos essenciais ocorre devido a presença de fenilpropanoides e terpenoides.

Em avaliação da atividade antioxidante de aproximadamente 100 compostos que constituem os óleos essenciais Ruberto e Baratta (2000) verificaram que os compostos fenólicos apresentam maior atividade antioxidante, seguidos dos álcoois alílicos.

Compostos como eugenol, timol e carvacrol, presentes nos óleos essenciais de manjerição e tomilho, são capazes de inibir a oxidação de forma que podem ser comparados a antioxidantes conhecidos, como o BHT (hidroxitolueno butilado) e α -tocoferol (LEE *et al.*, 2005).

Scherer *et al.* (2009) em estudo da atividade antioxidante dos óleos essenciais de capim-citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) pelo método de DPPH não observaram atividade antioxidante significativa para o óleo essencial de citronela, com valor de IC_{50} igual a $743 \pm 18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, já para o óleo de cravo-da-índia obtiveram uma forte atividade antioxidante, com valor de IC_{50} de $7,8 \pm 0,65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Lou *et al.* (2017) em avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e nanoemulsão de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* obtiveram, em concentração de 0,48 mg/mL, capacidade de eliminação do radical DPPH igual a 45% para o óleo essencial e 72% para a nanoemulsão de óleo essencial.

Rather *et al.* (2012) em análise sobre atividade antioxidante do óleo essencial da folha de *Juglans regia* L. visualizaram que o óleo essencial de *J. regia* inibe, em concentração igual a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 90% do radical DPPH. Esse valor apresentou-se próximo aos valores dos compostos BHT e ácido ascórbico, na mesma

concentração, usados como referência na avaliação da atividade antioxidante, que foram 91,8 e 92%, respectivamente.

Em estudo de atividade antioxidante dos óleos essenciais de palmarosa e citronela Sinha, Biswas e Mukherjee (2011) visualizaram, em concentração de 200 µg/mL de óleo, uma inibição do radical livre DPPH de aproximadamente 40% para o óleo essencial de citronela e 45% para o óleo essencial de palmarosa.

3.1.3 Atividade larvívica de óleos essenciais

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal transmissor da febre amarela urbana e dengue. Este mosquito se adapta facilmente ao ambiente urbano, utiliza depósitos de água limpa para colocar seus ovos, é um mosquito doméstico, com hematofagia, cópula e oviposição diurna (ROZENDAAL, 1997; TAUILL, 2001).

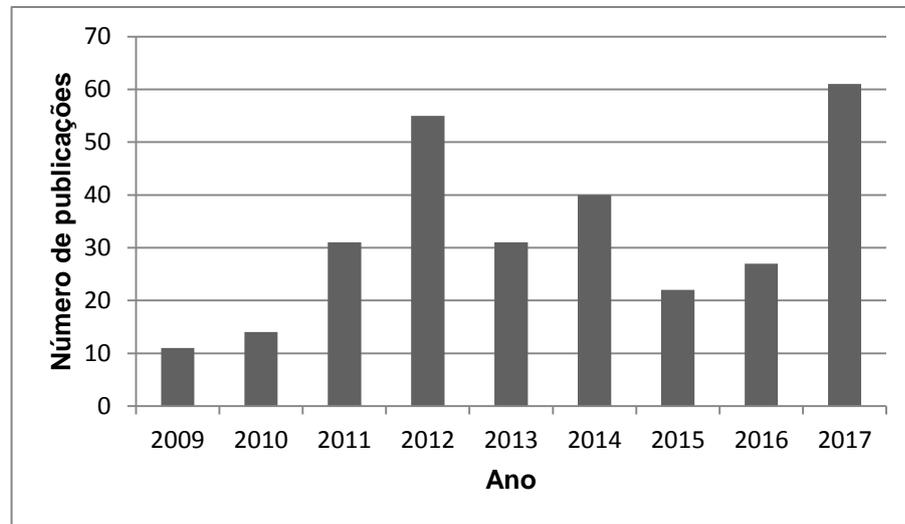
O controle do *A. aegypti* visa à eliminação das larvas ou dos mosquitos adultos. Em relação às larvas o controle pode ser realizado pela eliminação ou mudança de seus habitats através de aplicação de inseticidas e/ou larvívicas nos locais (BORROR; DELONG, 1988; BALDACCHINO *et al.*, 2015).

O número de pesquisas com o objetivo de avaliar o uso de extratos de plantas como alternativa a inseticidas sintéticos é crescente, sendo que os óleos essenciais estão entre as substâncias mais testadas contra insetos, como mostrado na Figura 2.

A montagem da Figura 2 foi realizada a partir de pesquisa de publicações na base de dados Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) empregando as palavras-chave: essential oil e larvívica. Sendo que, a presente pesquisa foi realizada no mês de dezembro de 2017.

Os óleos essenciais atuam de diferentes formas sobre os insetos afetando parâmetros biológicos dos mesmos, como inibição da oviposição e da alimentação, distúrbios no desenvolvimento, deformação, infertilidade e variação no tempo de vida (PASCUAL-VILLALOBOS, 1996; ROEL, 2001).

Figura 2 – Número de publicações científicas acerca de óleos essenciais empregados como inseticidas por ano



Fonte: Science Direct (2017).

Soonwera e Phasomkusolsil (2017) observaram que o óleo essencial de *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) apresenta bons resultados para atividade adulticida, larvicida, pupicida e de oviposição contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

Baskar *et al.* (2017) em estudo de atividade larvicida e de repelência do óleo essencial de *Atalantia monophylla* obtiveram alta atividade larvicida e repelente contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, podendo este óleo ser uma importante fonte para o desenvolvimento de repelentes de mosquitos e larvicidas.

Ríos, Stashenko e Duque (2017) em avaliação de atividade inseticida dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Lippia organoides*, *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon martinii*, *Lippia alba*, *Pelargonium graveolens*, *Turnera diffusa* e *Swinglea glutinosa* e suas misturas visualizaram que todos os óleos avaliados mostraram atividade inseticida, sendo que o óleo essencial de *T. vulgaris* e a mistura de *L. organoides* e *S. glutinosa* apresentaram maior ação larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

3.1.4 Óleo essencial de citronela

Citronela é uma planta perene de grande importância industrial cultivada em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África e América. O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 140 espécies, sendo que as duas espécies principais são *Cymbopogon nardus* (citronela de Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java). Seu óleo essencial é de grande valor devido sua utilização na indústria farmacêutica, de perfumaria e cosmética. O óleo de citronela é também o principal constituinte de repelentes para mosquito (SHASANY *et al.*, 2000).

O óleo essencial de citronela apresenta vários usos terapêuticos como analgésico, anticonvulsivo e ansiolítico sendo ainda um agente antifúngico, antibacteriano, antiparasitário e vermífugo (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004)

A aplicação do óleo essencial de citronela é ampla e variada, sendo registrado como agente herbicida, de acordo com patente CA 2324245 C (BARRIER BIOTECH LIMITED; ROBERT E. RYAN; SANDRA MORRIS, 2008).

Outra aplicação é apresentada na patente US 2323804 A que compreende formulação de vela com poder de repelência (CLIFORD D. STEWART; PHILIP J. DRISCOLL, 1943). Também pode ser aplicado como corante e aroma em pomadas de acordo com a patente US 7479292 B2 (DIXIE ROBINSON, 2009).

O óleo essencial de citronela pode também ser aplicado como componente de filme plástico com poder repelente a ser aplicado em embalagens para transporte de frutas, conforme patente US 20040034149 A1 (ROD GARCIA, 2004).

Silveira *et al.* (2012) em estudo de atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais, perceberam que o óleo de citronela, *C. winterianus*, apresenta atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* e *Proteus vulgaris*.

Timung *et al.* (2016) em análise da atividade antimicrobiana de óleo de citronela obtido por hidrodestilação, verificaram que o óleo de citronela se mostra

eficaz contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

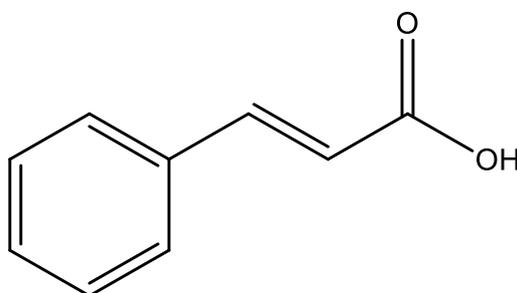
Quanto ao poder antioxidante do óleo essencial de citronela Sinha, Biswas e Mukherjee (2011) verificaram uma inibição de 40% do radical livre DPPH utilizando uma concentração de 200 µg/mL de óleo essencial.

3.2 Ácido cinâmico

O ácido cinâmico juntamente com outros ácidos dão origem ao grupo dos ácidos fenólicos. Os compostos fenólicos, amplamente distribuídos na natureza, são muito estudados devido suas atividades farmacológicas, por inibirem a proliferação de fungos e a oxidação lipídica, além de conferirem cor, adstringência e aroma a vários alimentos (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos são metabolitos secundários de vegetais, fazem parte da dieta humana e representam cerca de um terço dos compostos fenólicos dos vegetais (XU *et al.*, 2007; TABART *et al.*, 2011). Esse grupo de ácidos possui em sua estrutura um anel benzênico e um grupo carboxílico (ROBBINS, 2003).

Figura 3 – Estrutura química do ácido cinâmico



O ácido cinâmico, representado estruturalmente na Figura 1, também conhecido como ácido 3-fenil-2-propenóico, é encontrado em estoraque (*Styrax*

officinalis), óleo de canela, folha de coca, entre outros. Por apresentar propriedades polares, o ácido cinâmico apresenta baixa hidrofobicidade, o que dificulta sua aplicabilidade industrial (SHARMA; CHAUHAN; KANWAR, 2011).

O ácido cinâmico e seus derivados são amplamente encontrados no reino vegetal e apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobianas, baixa toxicidade, proteção contra radiação ultravioleta, antivirais e antiparasitárias, sendo conhecidos por suas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (MOLINERO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016; ZANETTI *et al.*, 2016).

3.2.1 Ésteres de ácido cinâmico

Segundo Souza (2016) a obtenção de ésteres derivados de ácido cinâmico tem despertado grande interesse científico devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e por serem aromas com potencial utilização na indústria alimentícia e de cosméticos.

Esses ésteres são obtidos a partir de reações de esterificação e transesterificação. Essas reações podem ocorrer por via química ou biológica.

O processo convencional para obtenção de ésteres orgânicos a partir de ácido carboxílico e álcool é conhecido como esterificação de Fischer. Esta reação é conhecida por ser reversível e de purificação onerosa. Consiste na catálise homogênea com ácido sulfúrico, o qual permanece dissolvido no meio reacional. Neste processo, o catalisador deve ser removido ao final da reação por lavagem aquosa alcalina. Como grandes desvantagens figuram a dificuldade de reutilização do catalisador, corrosão de reatores e geração de resíduos (YADAV; RAHUMAN, 2002; BONDIOLI, 2004; DEUTSCHMANN, 2009).

Portanto, cada vez mais se vem pesquisando o uso de rotas enzimáticas, pois tais reações apresentam diversos benefícios quando comparadas às rotas químicas, como o fato de serem um processo “verde” promovendo menor impacto ambiental, economia de energia e recursos, pois atuam em condições operacionais

mais brandas, alta especificidade (KRAJEWSKA, 2004; SHARMA; CHAUHAN; KANWAR, 2011).

Um exemplo de esterificação por via enzimática foi a empregada por Zanetti *et al.* (2016) que estudaram a obtenção de cinamato de geranila através da esterificação de geraniol e ácido cinâmico, em razão 3:1, e obtiveram conversão de 75% de produto a temperatura de 70°C e 150 rpm utilizando 15% em peso de enzima *Candida antarctica* imobilizada (NS 88011).

Outro exemplo foi o apresentado por Wang *et al.* (2016) que obtiveram rendimento de 99% de cinamato de etila através da esterificação de ácido cinâmico e etanol, em razão 1:3, a 50°C e 170 rpm após 24 horas de reação com a utilização de 30 mg/mL de enzima Lipozyme TLIM.

Wang *et al.* (2015) em estudo de síntese de cinamato de benzila por esterificação enzimática obtiveram um rendimento de 97,33% após 24 horas de reação utilizando a enzima Lipozyme TLIM. Além disso, a enzima poderia ser reutilizada por pelo menos três ciclos.

A aplicação do ácido cinâmico e seus ésteres é ampla. Sendo registrado em patente como *flavor*, conforme patente US 20040049068 A1 (SRINIVASAN PALANIAPPAN; MALLADI SAIRAM, 2004), podendo ser utilizado em composições de fragrância para produtos como sabões e cosméticos, bem como bebidas e alimentos.

O ácido cinâmico, seus sais e ésteres, podem ser usados como composto aromatizante e antimicrobiano, como registrado em patente US 6036986 A (LIPTON, Division of Conopco, Inc., 2000). Já, o cinamato de geranila pode ser utilizado como ingrediente para perfume, conforme patente US20030036489 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, 2003).

Outra aplicação é apresentada conforme patente WO 2014094100 A2 (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ & ABCOTT COMÉRCIO E INDÚSTRIA QUÍMICA – Eirele, 2014) que descreve uma composição de cinamato de metila, éster de ácido cinâmico, e linalol como pesticida, repelente e fungicida.

O cinamato de etila é um dos ésteres do ácido cinâmico que já possui aprovação como *flavor* pelo Food and Drug Administration (FDA) (BHATIA *et al.*, 2007). Este éster é frequentemente utilizado em produtos cosméticos, como cremes faciais, sprays para cabelos, xampus e sabonetes (BATHIA *et al.*, 2007; BELSITO *et al.*, 2007). O cinamato de etila pode ser usado também em produtos farmacêuticos, como mostrado por Zhang *et al.* (2015) que comprovaram a eficácia deste éster contra o ácaro *Psoroptes cuniculi*.

O éster cinamato de geranila pode ser obtido através da esterificação de geraniol com ácido cinâmico ou pela transesterificação de geraniol e cinamato de etila. Zanetti *et al.* (2016) obtiveram cinamato de geranila através da reação de esterificação enzimática de geraniol com ácido cinâmico, catalisada pela enzima *C. antarctica* imobilizada, NS 88011. Nesse estudo foi observado que o cinamato de geranila apresenta propriedades antimicrobianas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), porém não apresentou atividade antioxidante.

O ácido cinâmico e seus derivados também são amplamente pesquisados na área da medicina. São utilizados na síntese de novos medicamentos, tratamento de diversos tipos de câncer, como por exemplo células de osteosarcoma (MG-63), células de adenocarcinoma de cólon (Caco-2), e tuberculose e apresenta ainda efeito inibitório frente a doença de Alzheimer (GOBEC *et al.*, 2004; NIERO, 2010; CHEN *et al.*, 2011; DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011; DE *et al.*, 2012).

3.3 Sistemas enzimáticos

Métodos biocatalíticos geralmente são preferíveis quando comparados aos métodos químicos por apresentarem alta eficiência catalítica, alta seletividade, condições de reação mais suaves e são métodos mais ambientalmente corretos (YU *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2013; SANGALETTI-GERHARD *et al.*, 2015).

3.3.1 Enzima

De acordo com Coelho, Salgado e Ribeiro (2008) as enzimas são, geralmente, proteínas com poder de catalisar reações bioquímicas, promovendo um aceleração das mesmas. São moléculas que apresentam elevada versatilidade, especificidade e aplicação nos processos biotecnológicos.

Todas as enzimas, com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, são de natureza proteica. Sendo formadas por cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Em relação aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam características importantes devido suas condições de reação mais brandas, menor geração de problemas ambientais, baixa toxicidade e alta especificidade tanto por um substrato quanto na reação bioquímica, gerando um produto específico, sem formação de coprodutos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008)

Segundo Souza (2016) a atuação de enzimas como biocatalisadores é semelhante aos catalisadores químicos, devido às leis termodinâmicas e cinéticas serem iguais, ou seja, tem poder de alterar a velocidade da reação, porém sem influenciar na composição da mesma e nem na quantidade de produto final da reação.

3.3.2 Lipase

Lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol éster-hidrolase) são enzimas que hidrolisam triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa que atuam somente na interface óleo-água (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2007; SOUZA, 2016). Essas enzimas podem ser produzidas por animais, plantas, fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2007).

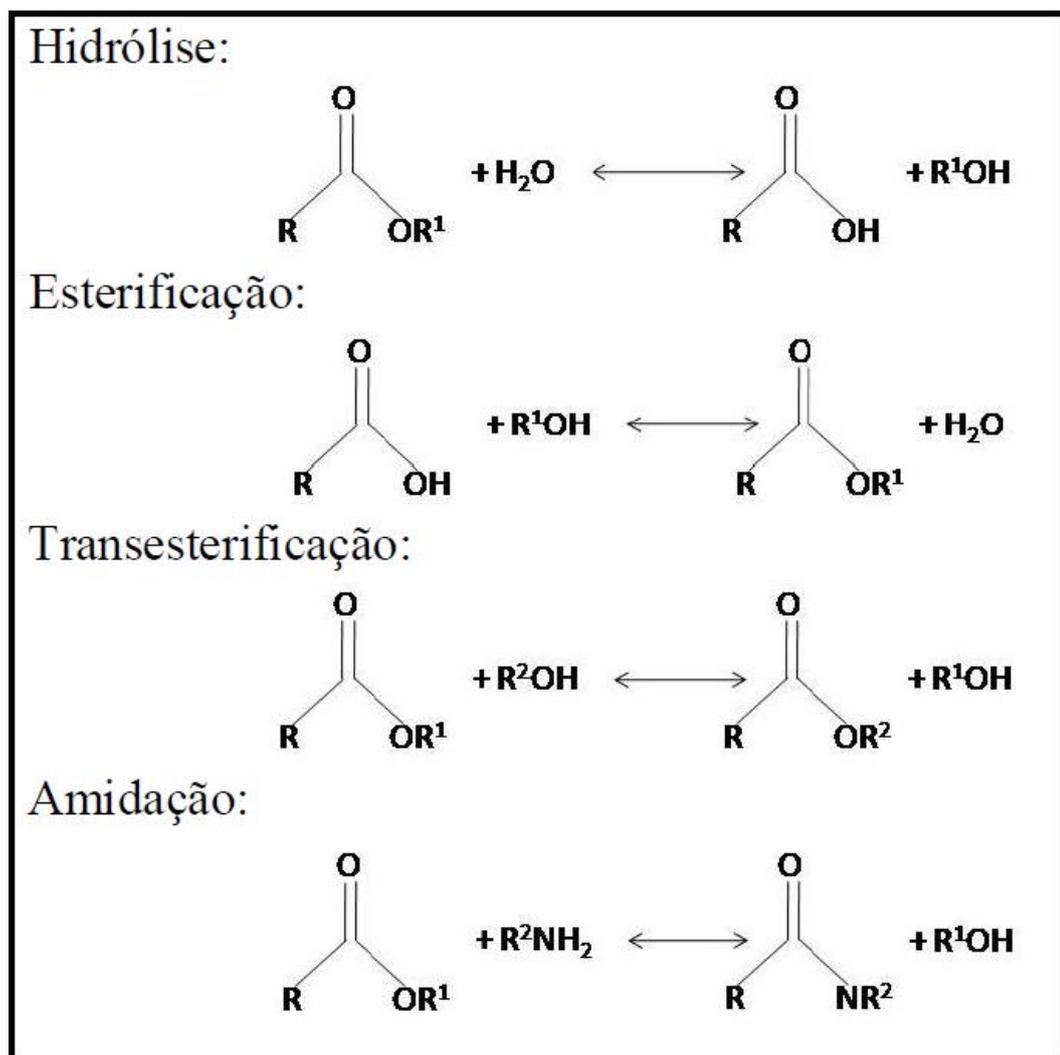
De acordo com Treichel *et al.* (2010) as principais fontes de obtenção das lipases são através as plantas, sendo encontradas em suas sementes oleaginosas e

grãos, os animais, podendo ser enzimas de fonte pancreática, hepática e gástrica, e alguns micro-organismos, como leveduras, bactérias e fungos.

As enzimas hidrolíticas, como as lipases, apresentam grande importância em reações de biocatálise, pois apresentam alta capacidade de catalisar diferentes reações e por apresentarem grande estabilidade tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (TREICHEL *et al.*, 2010).

Segundo Crespo *et al.* (2005) as lipases são as enzimas aplicadas com maior frequência em síntese orgânica. Isso ocorre devido sua alta disponibilidade comercial, baixo custo, seletividade e por atuarem em amplas faixas de pH e temperatura.

Figura 4 – Exemplos de reações catalisadas por lipases



De acordo com Yadav e Shinde (2012) as lipases são usadas em diversas reações, como esterificação, transesterificação, amidação, hidrólises, epoxidação e tio-esterificação. Algumas dessas reações são mostradas na Figura 4.

Foukis *et al.* (2017) em estudo de esterificação de ácidos graxos de resíduos industriais líquidos com uma mistura de ácidos utilizando a lipase *Candida antarctica* B (CALB) obtiveram 90,08% de esterificação utilizando etanol e 97,26% de n-butanol em sistema com remoção contínua de água.

Amini *et al.* (2017) em avaliação da produção de biodiesel por transesterificação, catalisada por lipase de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym 435), do óleo da semente de *Ocimum basilicum* L., obtiveram conversão em éster de 11,4% em 24h de reação, 87,9% em 48h, e em 72h a conversão foi de 92,1%.

Em estudo sobre esterificação de ácido ferúlico com álcool láurico catalisada por enzima em presença de líquido iônico Shi *et al.* (2017) obtiveram rendimento máximo de esterificação, utilizando enzima *Candida Antarctica* B (Novozym 435) igual a 87,9%, sendo que esse valor foi atingido utilizando hexano como solvente e [(EO)-3C-im][NTf₂] (1-(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridin-1-ium bis (trifluoromethylsulfonyl)imide) como líquido iônico num tempo de reação de 168h.

More, Waghmare e Gogate (2017) em avaliação de produção de tricaprilina, que é um éster formado a partir da reação entre ácido caprílico e glicerol, catalisada por duas diferentes enzimas obtiveram um rendimento máximo de produção igual a 94% após 7h de reação, utilizando razão molar igual a 4:1 (ácido caprílico:glicerol), temperatura de 70°C e enzima Novozym 435 de (*Candida antarctica*). Já, a enzima Lipozyme RM (*Rhizomucor miehei*) apresentou um rendimento máximo de 86% nas mesmas condições reacionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentadas as metodologias e materiais empregados para a realização dos experimentos.

4.1 Material

4.1.1 Enzimas

As enzimas utilizadas como catalisadoras nas reações de esterificação foram as enzimas Novozym 435 e NS 88011.

A enzima Novozym 435, fornecida pela empresa Novozymes Brasil, é uma lipase obtida da *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa e amplamente aplicada na síntese de ésteres e amidas.

A enzima NS88011 é uma lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina polimérica hidrofóbica.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nas reações de esterificação foram n-heptano (fornecido pela empresa Vetec em qualidade *p.a.*), óleo essencial de citronela (fornecido pela empresa Ferquima) e ácido cinâmico (com 97% de pureza, fornecido pela empresa Sigma-Aldrich).

4.2 Métodos

4.2.1 Cinética de esterificação

Para a realização da cinética de esterificação em sistema de agitação mecânica o método utilizado foi adaptado de Zanetti *et al.* (2016). A reação consistiu em misturar óleo essencial de citronela, da espécie *Cymbopogon winterianus*, com ácido cinâmico, em uma razão molar 3:1 (ácido:óleo), totalizando massa de 5 g de substratos, e 20 mL de solvente n-heptano em Erlenmeyer e mantido sob agitação mecânica de 150 rpm e temperatura de 70°C em *shaker* até a completa dissolução do ácido.

Após a completa dissolução do ácido retirou-se uma alíquota de 100 µL com o intuito de obter a amostra da mistura reacional. Depois da retirada da alíquota fez-se a adição de 15% (m/m) da enzima Novozym 435 ou NS 88011 e manteve-se a reação sob agitação constante, retirando alíquotas de amostra no decorrer da reação, sendo que estas foram analisadas por análise de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama com o objetivo de determinar a conversão de substratos em produtos. Fez-se também a avaliação de produção dos ésteres adicionando 5 e 10% de enzima à reação.

Testou-se também a esterificação em equipamento com irradiação de micro-ondas. A reação de esterificação ocorreu em equipamento do tipo reator CEM Discover com sistema de refrigeração e sensor de temperatura de fibra ótica e infravermelho, em recipiente padrão de borossilicato com capacidade para 10 mL. A reação ocorreu através da mistura de óleo essencial de citronela e ácido cinâmico, razão molar 3:1 (ácido:óleo), com solvente n-heptano e 15% (m/m) de enzima Novozym 435. A temperatura de operação foi de 70°C, a agitação do tipo “low” e potência de 120 W. Alíquotas de amostra foram retiradas em diferentes tempos e submetidas à análise de cromatografia gasosa.

4.2.2 Determinação da conversão em éster

As análises de conversão de substratos em ésteres foram realizadas em cromatógrafo gasoso do tipo GC-FID 2010 plus Shimadzu com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de polietilenoglicol (PEG) Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme, com tempo total de análise igual a 95 minutos com programação de temperatura de: 40°C (6 min), 40-180°C (2°C.min⁻¹), 180-220°C (10°C.min⁻¹), 220°C (15 min). A temperatura do detector e injetor foi de 220°C, modo de injeção Split, razão de Split 1:50 e gás de arraste: N₂ (30 mL.min⁻¹), H₂ (40 mL.min⁻¹) e ar sintético (400 mL.min⁻¹). O volume injetado foi de 100 µL de amostra diluída em diclorometano (1:9).

A determinação da conversão dos substratos em ésteres foi determinada pela Equação 1, que leva em consideração a diminuição do sinal dos substratos geraniol e citronelol.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(S_b - S)}{S_b} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde, S_b corresponde à área do pico dos substratos da mistura reacional e S corresponde à área do pico dos substratos após a reação.

A mesma programação de rampa cromatográfica de temperatura foi utilizada para a determinação da composição química do óleo essencial de citronela, onde a amostra foi injetada em cromatógrafo gasoso com espectrometria de massa do tipo GCMS-QP5050A da marca Shimadzu. Sendo que os componentes do óleo foram identificados com o emprego dos dados presentes na biblioteca NIST.

4.2.3 Determinação de atividade enzimática de esterificação

A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação de ácido oleico e etanol. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 g de enzima ao meio reacional, sendo este formado por uma mistura de etanol e ácido oleico em razão molar 1:1, em Erlenmeyer, e mantido sob agitação mecânica de 160 rpm à 40°C por 40 minutos. Alíquotas de 500 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos zero e após 40 minutos de reação e adicionadas em 15 mL de solução acetona-etanol (1:1) com o intuito de finalizar a reação e proporcionar volume de amostra. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M até atingir pH 11. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que consome 1 µL de ácido graxo por minuto nas condições experimentais descritas, como comenta Oliveira *et al.* (2005) em seu estudo. A atividade de esterificação foi calculada pela Equação 2.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 1000 \cdot V_f}{t \cdot M_E \cdot V_c} \quad (2)$$

Onde:

AE corresponde a atividade de esterificação (U.g⁻¹);

V_b corresponde ao volume de NaOH gasto na titulação da amostra de tempo zero (mL);

V_a corresponde ao volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

M corresponde à molaridade da solução de NaOH;

V_f corresponde ao volume final do meio reacional (mL);

t corresponde ao tempo (min);

M_E corresponde a massa de enzima utilizada na reação (g);

V_C corresponde ao volume da alíquota do meio reacional retirado para titulação (mL).

4.2.4 Avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina*

A metodologia utilizada no ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi uma adaptação da metodologia de Meyer *et al.* (1982). Primeiramente preparou-se uma solução salina artificial com sal marinho na concentração 10 g.L^{-1} e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio. Esta solução foi utilizada na eclosão dos ovos de *Artemia salina* e demais diluições. Para a eclosão dos ovos manteve-se os mesmos na solução salina por 24 horas sob aeração e iluminação artificial constantes e temperatura de 25°C .

As soluções das amostras a serem testadas foram preparadas pela adição de 0,1% de amostra, óleo essencial, ácido cinâmico ou ésteres, e 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina. A partir da solução de amostra fizeram-se as diluições nas concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 50; 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Adicionou-se a tubos de ensaio 10 mL da solução de amostra e 10 larvas de *Artemia salina*, em triplicata, e realizada a contagem dos animais vivos e mortos após 24 horas.

Frente aos resultados de mortalidade das larvas de *Artemia salina* em relação à concentração das amostras, fez-se um gráfico de análise para obtenção da CL_{50} (concentração letal de amostra para 50% da população).

4.2.5 Determinação da atividade antioxidante

A metodologia aplicada baseia-se na medida da redução de absorção da solução contendo o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Leva em consideração a transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante, o DPPH que possui

cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, acarretando numa diminuição da absorção.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por método espectrofotométrico, com comprimento de onda de 515 nm.

A técnica consistiu na incubação por 30 minutos, de 2 mL de solução etanólica de DPPH com 2 mL de soluções etanólicas contendo concentrações crescentes de amostra (óleo essencial de citronela, ácido cinâmico e óleo esterificado) que variaram de 0,0025 a 10 mg.mL⁻¹. Para a amostra controle substituiu-se o volume de solução de amostra pelo mesmo volume de etanol. A amostra denominada “branco” consistia somente em etanol.

A capacidade de neutralizar o radical DPPH, denominada atividade antioxidante, foi calculada pela Equação 3, abaixo.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

$Abs_{controle}$ corresponde à absorbância da solução formada por DPPH e etanol;

$Abs_{amostra}$ corresponde à absorbância da solução formada por DPPH e amostra.

Após a avaliação da faixa de atividade antioxidante calculou-se a concentração de amostra necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear.

4.2.6 Determinação da atividade antibacteriana

Este ensaio teve como objetivo determinar a CMI (Concentração Mínima Inibitória), de acordo com metodologia descrita por Amaral (2016), do óleo essencial de citronela, ácido cinâmico e óleos esterificados produzidos com as duas diferentes enzimas frente à bactéria padrão de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina

(ATCC 33591) e uma amostra clínica da bactéria *Staphylococcus aureus* (517, resistente à oxacilina e penicilina) isolada de sangue pela técnica de microdiluição em caldo.

A análise foi realizada em placas de 96 poços contendo caldo Mueller-Hinton. Para tal, as amostras bacterianas foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura Ágar Mueller-Hinton por 24 h em estufa bacteriológica a 37°C. Posteriormente, as colônias isoladas foram transferidas para um tubo de vidro contendo 3 mL de solução salina à 0,85% até atingir turvação referente a escala 0,5 de Mc Farland (10^8 UFC.mL⁻¹). Em seguida a solução foi diluída na proporção 1:10 (v/v) em solução salina, com o intuito de obter solução final com cerca de 10^7 UFC.mL⁻¹.

As amostras foram preparadas através de diluição em etanol estéril nas concentrações de 512, 256 e 128 µg.mL⁻¹ para os óleos essencial e esterificados, e 148, 74 e 37 µg.mL⁻¹ para o ácido cinâmico.

As microplacas com fundo em forma de “U” foram preparadas com 10 µL da suspensão bacteriana, 20 µL das soluções de amostra e 170 µL de caldo Mueller-Hinton. Fez-se também a avaliação de controles negativos e positivo, sendo que o controle positivo contou com um ensaio do antibiótico oxacilina nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg.mL⁻¹. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C conforme esquema de plaqueamento mostrado na Figura 5.

Após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina (indicador de oxi-redução) em cada poço, na concentração de 0,85% diluído em água estéril, com incubação por cerca de 4 h, a 37°C, para revelação da microplaca. A resazurina é um revelador colorimétrico, que na presença de crescimento microbiano é reduzida a resorufina, com conseqüente alteração da coloração azul para rosa, permitindo a detecção do resultado do ensaio. A coloração rosa indica crescimento bacteriano (bactéria resistente) e a coloração azul indica inibição bacteriana (bactéria sensível).

Realizou-se a leitura da placa e a CMI foi estabelecida como a menor diluição onde não foi verificado o botão característico do crescimento bacteriano, ou seja, mudança na coloração.

Figura 5 – Esquema de plaqueamento para determinação de CMI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ácido 1	Ácido 1	Ácido 1	Ácido 0,5	Ácido 0,5	Ácido 0,5	Ácido 0,25	Ácido 0,25	Ácido 0,25	C.A.	C.A.	C.A.
B	NS 1	NS 1	NS 1	NS 0,5	NS 0,5	NS 0,5	NS 0,25	NS 0,25	NS 0,25	C.A.	C.A.	C.A.
C	NZ 1	NZ 1	NZ 1	NZ 0,5	NZ 0,5	NZ 0,5	NZ 0,25	NZ 0,25	NZ 0,25	C.A.	C.A.	C.A.
D	O.E. 1	O.E. 1	O.E. 1	O.E. 0,5	O.E. 0,5	O.E. 0,5	O.E. 0,25	O.E. 0,25	O.E. 0,25	C.A.	C.A.	C.A.
E	OX 64	OX 64	OX 32	OX 32	OX 16	OX 16	OX 8	OX 8	OX 4	OX 4	OX 2	OX 2
F	OX 1	OX 1	OX 0,5	OX 0,5	OX 0,25	OX 0,25	C.B.	C.B.	C.B.	C.S.	C.S.	C.S.
G	B	B	B	B	B	B						
H												

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Legenda: Ácido = Ácido cinâmico; NS = Óleo esterificado com enzima NS 88011; NZ = Óleo esterificado com enzima Novozym 435; O.E. = Óleo essencial de citronela; B = Branco (meio de cultura); CA = Controle da amostra (meio de cultura + solução de amostra); CB = Controle bacteriano (meio de cultura + solução bacteriana); CS = Controle do solvente (meio de cultura + solução bacteriana + etanol); OX = Controle positivo de oxacilina (meio de cultura + solução bacteriana + solução de oxacilina).

4.2.7 Determinação da atividade larvicida

Para o ensaio de atividade larvicida utilizou-se metodologia adaptada de World Health Organization (1970) onde os ovos de *Aedes aegypti* foram imersos em água para sua eclosão, onde permaneceram até atingir o terceiro estágio da larva.

As larvas foram separadas com auxílio de pipeta de Pasteur e adicionadas a copos de polietileno contendo 4,9 mL de água destilada. Em cada copo foram adicionadas em média 5 larvas.

Em copos de polietileno (recipiente teste) contendo 15 mL de água destilada adicionou-se 0,1 mL das amostras, sendo que as amostras de ácido cinâmico, óleo

essencial de citronela e ésteres foram diluídas em etanol em concentrações que variaram de 25 a 500 ppm. O meio foi homogeneizado e mantido em repouso por 30 minutos.

Após o tempo de repouso adicionou-se aos recipientes teste 4,9 mL de água destilada juntamente com as 5 larvas de *Aedes aegypti* em terceiro estágio de crescimento e mantidos em repouso por 24 horas, quando fez-se a contagem de organismos vivos e mortos.

Fez-se também a avaliação de dois controles, um deles formado somente por água destilada e as larvas, com o intuito de verificar se haveria morte das larvas por questões ambientais, e outro onde substituiu-se o volume de amostra por etanol, com o objetivo de verificar a influência do solvente utilizado na mortalidade das larvas.

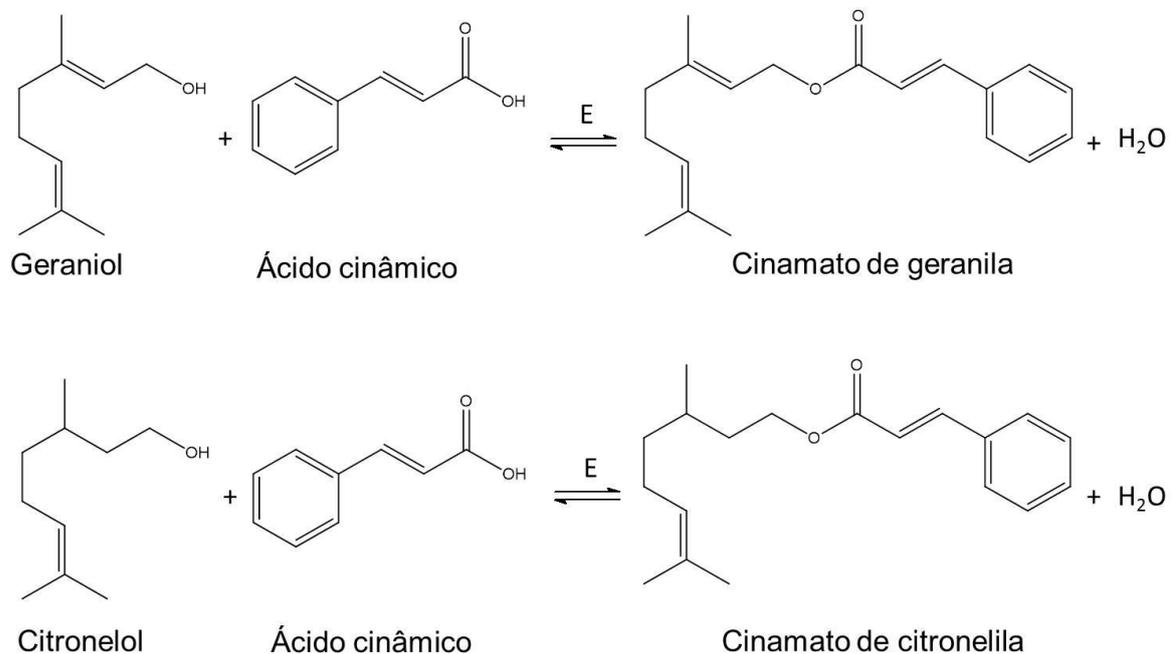
Após a contagem de organismos vivos e mortos foi determinada a concentração letal média (CL_{50}) das amostras através de método gráfico com o emprego de escala logarítmica de análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o estudo de esterificação enzimática de óleo essencial de citronela (*C. winterianus*) com ácido cinâmico utilizando as enzimas NS 88011 e Novozym 435 como biocatalisadoras bem como a avaliação da toxicidade e atividades antioxidante, antibacteriana e larvícida.

Pela reação de esterificação dos monoterpenos geraniol e citronelol, oriundos do óleo essencial de citronela, com ácido cinâmico obtém-se os ésteres cinamatos de citronelila e geranila, utilizando enzimas como biocatalisadoras, como mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Esquema de esterificação enzimática de geraniol e citronelol com ácido cinâmico



5.1 Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)

A partir de análise realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa foi possível visualizar o perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela, obtido da folha da planta, e determinar sua composição química, conforme mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) obtida por cromatografia gasosa com espectrometria de massas

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área (%)
1	11,4	D-Limoneno	3,46
2	28,4	Citronelal	38,98
3	33,1	β -elemeno	1,10
4	34,8	Linalol	1,57
5	39,4	Geranial	1,26
6	40,9	Δ -Cadieno	2,58
7	42,1	Cedreno	0,82
8	43,9	Acetato de citronelila	2,58
9	44,4	α -muurolene	2,58
10	45,1	Citronelol	17,54
11	49,0	Geraniol	20,56
12	58,4	τ -Cadinol	0,64
13	60,1	Elemol	2,33

Pela Tabela 1 é possível observar a composição química do óleo essencial de citronela, apresentando como componente majoritário o citronelal (38,98%), seguido do geraniol (20,56%) e citronelol (17,54%). Os valores encontrados para as substâncias de interesse, geraniol e citronelol, correspondem a 38,1% da composição total do óleo.

O valor obtido para a quantidade de geraniol apresenta-se semelhante ao valor encontrado por Paroul (2011) que foi de 21,99%. Foi semelhante também ao valor obtido por Kakaraparthi *et al.* (2014) para o óleo de citronela quando a mesma foi colhida com 30 e 50 dias, que apresentou teor de geraniol de 19,2 e 22%, respectivamente. No entanto, o resultado obtido foi inferior ao encontrado por Kakaraparthi *et al.* (2014) para o óleo oriundo da citronela quando colhida com 90 dias, que apresentou quantidade de geraniol igual a 26,7%.

Já a quantidade de citrionelol encontrada no presente estudo foi superior à encontrada por Paroul (2011) que foi de 10,90%. Foi superior também aos valores encontrados por Kakaraparthi *et al.* (2014) que obtiveram um valor máximo de citrionelol igual a 6,9% para óleo de citronela colhida com 90 dias. No entanto, o resultado mostrou-se semelhante ao obtido por Timung *et al.* (2016) que obteve 13,41% de citrionelol para o óleo de citronela obtido por hidrodestilação.

Fatores como tempo da colheita, espaçamento entre plantas, altura de corte, pH do solo e clima estão diretamente ligados com a composição química dos óleos essenciais, justificando as variações encontradas (MARCO *et al.*, 2007; KAKARAPARTHI *et al.*, 2014).

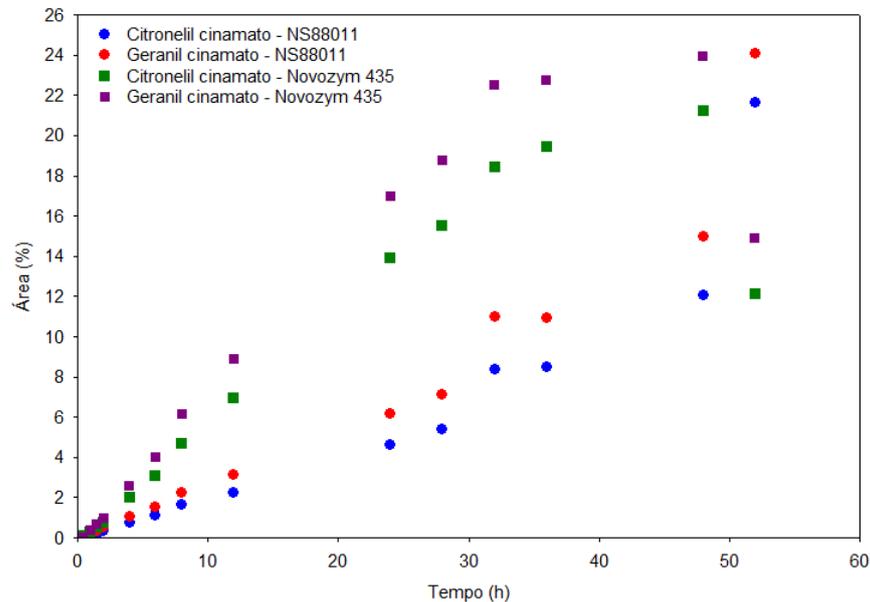
5.2 Avaliação de tempo reacional

5.2.1 Esterificação em sistema de agitação mecânica

A partir da análise de cromatografia gasosa das amostras em diferentes tempos de reação de esterificação foi possível determinar o tempo onde há maior produção de ésteres. A Figura 7 apresenta a área dos ésteres cinamatos de citrionelila e geranila produzidos com as enzimas NS 88011 e Novozym 435.

É possível visualizar a partir da Figura 7 que a produção utilizando a enzima Novozym 435 como biocatalisadora acontece mais rapidamente do que com a enzima NS 88011. Porém, a área final dos produtos é semelhante.

Figura 7 - Comparativo de produção de ésteres cinamatos de geranila e citronelila utilizando as enzimas Novozym 435 e NS 88011



Reação em razão molar 3:1 (ácido cinâmico:óleo essencial de citronela), 15% (m/m) de biocatalisador, solvente n-heptano, 70°C e 150 rpm

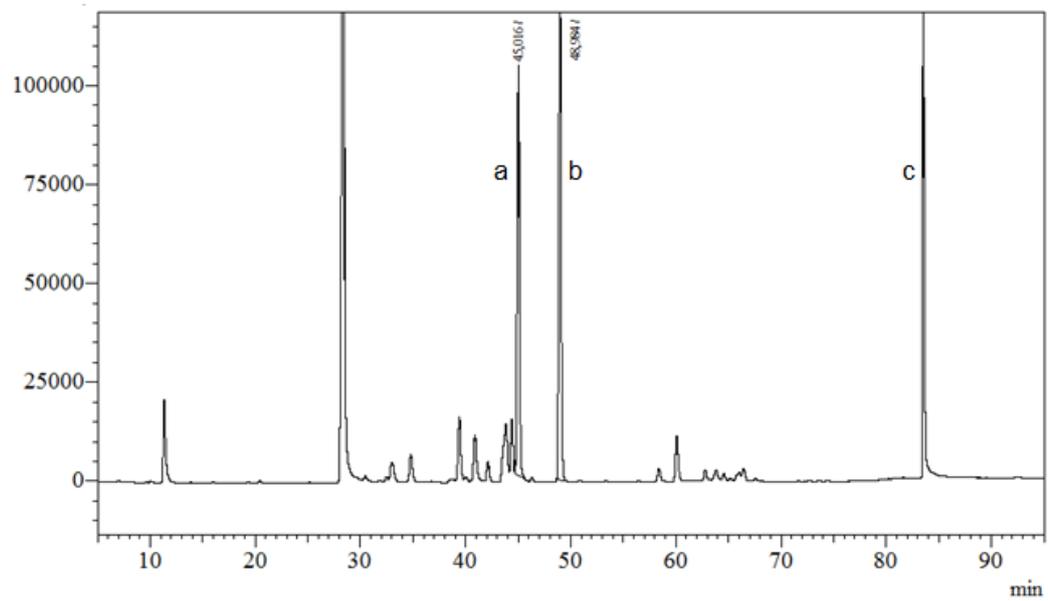
Determina-se, pela Figura 7, que o tempo ótimo para produção dos ésteres cinamatos de geranila e citronelila é de 48 horas, quando utilizada a enzima Novozym 435 e 52 horas, quando aplicada a enzima NS 88011.

Percebe-se também, pela Figura 7, que a reação catalisada pela enzima Novozym 435 apresenta um decréscimo na área dos ésteres após 48 horas de reação. Esse comportamento ocorre devido ao fato da reação de esterificação ser reversível, ocorrendo a hidrólise do éster, e assim diminuindo sua área.

Após a determinação do tempo reacional ótimo, fez-se a visualização da produção dos ésteres pela comparação dos cromatogramas para a mistura reacional e das amostras em 48 e 52 horas quando utilizadas as enzimas Novozym 435 e NS 88011, respectivamente, como mostrado nas Figuras 8, 9 e 10.

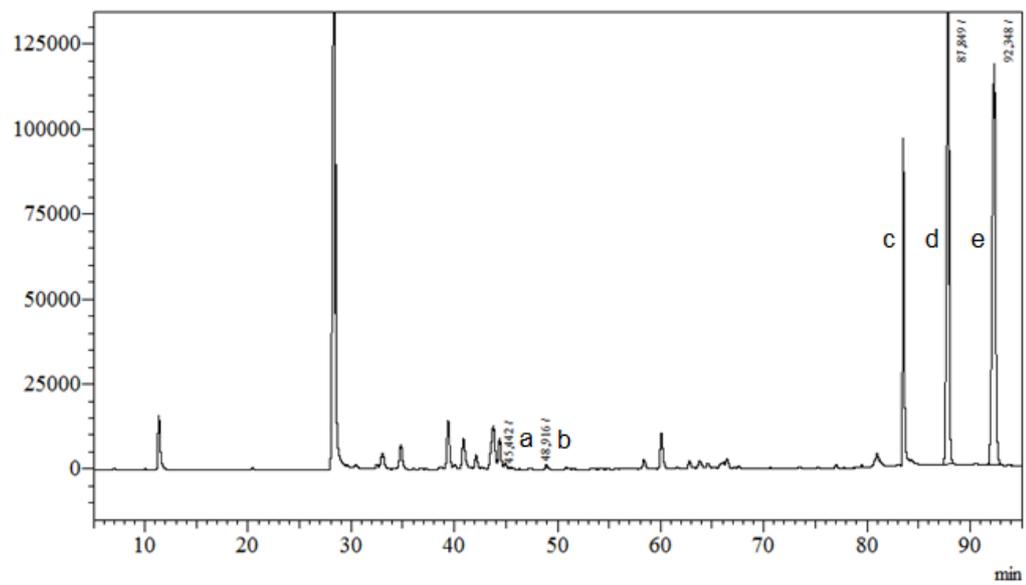
Quando comparados o cromatograma da mistura reacional com os cromatogramas das reações de esterificação percebe-se a formação de dois novos picos nos tempos 87,8 e 92,3 minutos, sendo que esses picos correspondem aos produtos cinamatos de citronelila e geranila, respectivamente.

Figura 8 – Cromatograma da mistura reacional



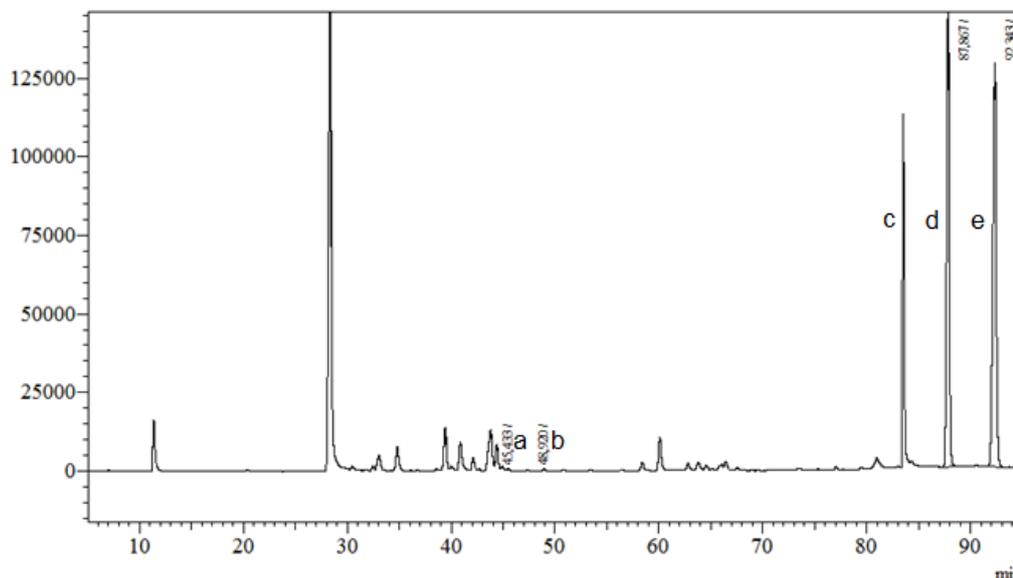
Na Figura: (a) citronelol; (b) geraniol; (c) ácido cinâmico

Figura 9 - Cromatograma para a reação de 48 horas utilizando a enzima Novozym 435



Na Figura: (a) citronelol; (b) geraniol; (c) ácido cinâmico; (d) cinamato de citronelila; (e) cinamato de geranila

Figura 10 - Cromatograma para a reação de 52 horas utilizando a enzima NS 88011



Na Figura: a) citronelol; (b) geraniol; (c) ácido cinâmico; (d) cinamato de citronelila; (e) cinamato de geranila

É visível também a diminuição dos picos dos substratos citronelol, com tempo de retenção de 45 minutos, e geraniol, com tempo de retenção de 49 minutos. Os valores das áreas dos substratos e dos produtos são mostrados na Tabela 2, que foram usados como base para a determinação da conversão dos substratos em produtos.

Tabela 2 – Representação do consumo dos substratos e produção de ésteres para reação conduzida com enzima Novozym 435 num tempo de 48 horas e NS 88011 em tempo de reação de 52 horas

Tempo de Retenção (min)	Composto	Novozym 435		NS 88011	
		Área mistura reacional	Área após a reação	Área mistura reacional	Área após a reação
45,0	Citronelol	1563809	4067	1723768	2587
49,0	Geraniol	1871930	9717	2140073	2800
87,8	Cinamato de citronelila	0	2356017	0	2575235
92,3	Cinamato de geranila	0	2656564	0	2862942

Com os dados da Tabela 2 determinou-se a taxa de conversão dos substratos em ésteres, mostradas na Tabela 3. Pode-se perceber, a partir da Tabela 3, que a taxa de conversão foi semelhante, apresentando diferença somente no tempo reacional.

Tabela 3 – Taxa de conversão em produtos para a reação sob agitação mecânica de 48 horas aplicando enzima Novozym 435 e 52 horas utilizando a enzima NS 88011

Enzima	Produto	Conversão (%)
Novozym 435	Cinamato de citronelila	98,0
	Cinamato de geranila	99,0
NS 88011	Cinamato de citronelila	98,6
	Cinamato de geranila	99,4

Reação realizada sob agitação mecânica a 150 rpm, razão molar 3:1 (ácido cinâmico:óleo essencial de citronela), 15% (m/m) de enzima e 70°C

Os resultados encontram-se próximos aos obtidos por Paroul (2011) em estudo de esterificação de óleo essencial de citronela para produção de oleatos de citronelila e geranila, que obteve uma conversão de 98,9% para o citronelol e 82,5% para o geraniol, nas condições de 60°C, razão molar 1:1 (óleo:ácido) e 10% (m/m) de enzima Novozym 435 num tempo de 6 horas de reação. Nestas mesmas condições Paroul (2011) obteve também os melhores resultados para produção de propionatos de citronelila e geranila, alcançando conversão de 92,9% para citronelol e 96,5% para geraniol.

Zanetti *et al.* (2016) em estudo de produção de cinamato de geranila por reação catalisada pela enzima NS 88011, obtiveram uma conversão de 75,85% em éster em duas horas de reação, utilizando temperatura igual a 70°C, razão molar 3:1 (geraniol:ácido) e 15% (m/m) de enzima.

Quando comparados os resultados do presente trabalho com os dados de Paroul (2011) e Zanetti *et al.* (2016), percebe-se que no presente estudo o tempo ótimo para a conversão foi superior. No entanto, a taxa de conversão obtida neste estudo se mostrou superior.

5.2.2 Esterificação em sistema de micro-ondas

A reação em sistema com irradiação de micro-ondas foi utilizada com o objetivo de diminuir o tempo reacional obtido para a reação com agitação mecânica.

Reis *et al.* (2015) em avaliação de produção de biodiesel a partir de ácidos graxos via catálise ácida heterogênea e micro-ondas obtiveram taxas de conversão na faixa de 96 a 98% para a reação em condições de aquecimento convencional em 6 horas de reação e, para reação com irradiação de micro-ondas em somente 1 hora de reação.

Em estudo de síntese de oleato de propila em condições normais e por micro-ondas utilizando lipase de *Aspergillus carneus* como biocatalisador, Saxena *et al.* (2005) obtiveram conversão de 25% dos substratos em ésteres, em sistema com solvente n-hexano, em condições normais de operação em 24 horas e conversão de 75% para reação em 25 segundos em equipamento micro-ondas. Já, para a reação realizada em sistema livre de solvente as conversões obtidas foram de 35% e 86% para reação em 24 horas em condições normais e 25 segundos sob irradiação de micro-ondas, respectivamente.

Para a reação de esterificação realizada em equipamento de micro-ondas obteve-se os resultados de conversão dos substratos em ésteres mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Taxa de conversão de substratos em ésteres para reação realizada em micro-ondas

Tempo (h)	Conversão (%)	
	Citronelol	Geraniol
1	1,04	0,92
2	2,70	3,11
3	3,84	4,31
4	5,17	6,22

Reação realizada em razão molar 3:1 (ácido cinâmico:óleo essencial de citronela), 15% (m/m) de enzima Novozym 435, solvente n-heptano, agitação "low", potência de 120 W e 70°C

Pode-se perceber que na reação realizada em equipamento de micro-ondas ocorre conversão dos substratos em ésteres, no entanto para obter uma maior taxa de conversão o tempo de reação deve ser mais longo, o que torna-se inviável, tendo em vista que é um equipamento de alto custo e com baixo volume reacional.

5.3 Avaliação de influência enzimática na produção de ésteres

Com o objetivo de determinar a melhor concentração enzimática a ser utilizada na reação de esterificação fez-se a mesma reação de esterificação em sistema de agitação mecânica descrita no item 4.2.1, mantendo fixo o tempo reacional, utilizando 5 e 10% (m/m) de enzima NS 88011 ou Novozym 435.

Nas Figuras 11 e 12 é possível visualizar o comparativo das áreas dos ésteres cinamatos de citronelila e geranila utilizando as enzima NS 88011 e Novozym 435, respectivamente, nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/m).

Como pode-se observar a partir da Figura 11 houve maior produção de ésteres quando utilizada a concentração de 15% em peso de enzima NS 88011 em reação de 52 horas. O mesmo ocorre para a reação utilizando a enzima Novozym 435, conforme visto na Figura 12, para a reação de 48 horas.

Pela Figura 11 pode-se visualizar uma grande diferença na produção dos ésteres, devido a grande variação de área, quando comparadas as diferentes massas de Novozym 435 empregadas. Vê-se que a produção de cinamatos de citronelila e geranila quando aplicado 15% (m/m) de enzima foi aproximadamente quatro vezes maior do que a produção de ésteres quando aplicado 10% (m/m) de enzima, mostrando que esta apresenta grande influência na produção de ésteres.

O mesmo resultado de concentração de enzima foi observado por Zanetti *et al.* (2016) onde, quando avaliadas as concentrações de 10, 15 e 20% (m/m) de enzima, a reação catalisada com enzima NS 88011 em concentração de 15% foi a que propiciou maior conversão de substratos em produto.

Figura 11 – Comparativo de produção de ésteres obtidos por reação enzimática de 52 horas utilizando enzima NS 88011

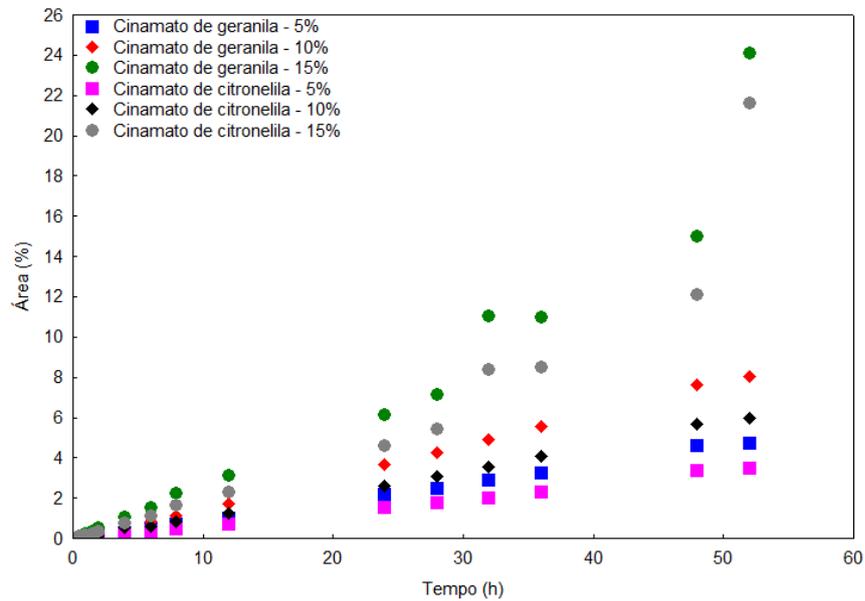
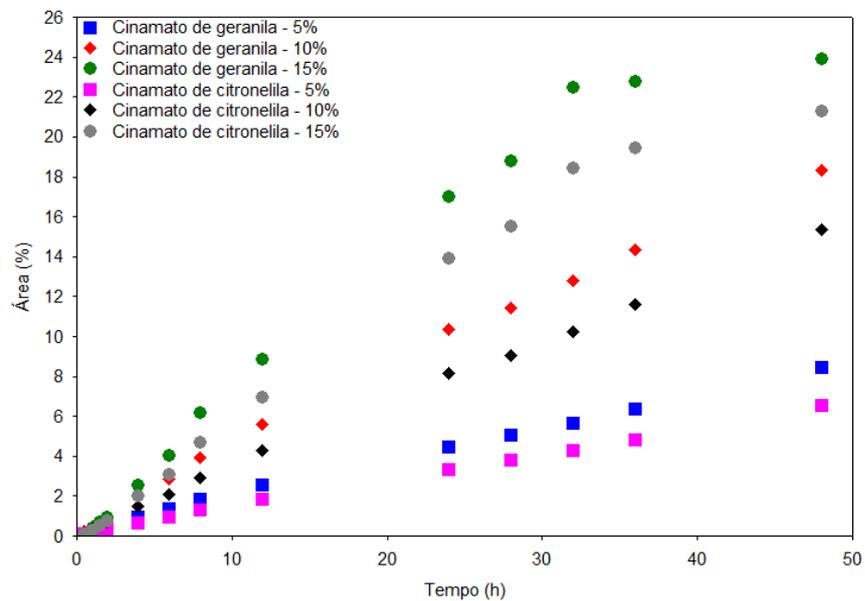


Figura 12 – Comparativo de produção de ésteres obtidos por reação enzimática de 48 horas utilizando enzima Novozym 435



Tendo em vista que a maior produção de ésteres foi obtida utilizando 15% (m/m) de enzima as análises de atividade biológica dos óleos esterificados foram realizadas utilizando as amostras obtidas com a reação de esterificação utilizando esta concentração de enzima.

5.4 Esterificação enzimática de óleo essencial de citronela

Após determinar o tempo reacional e quantidade de enzima ótimos para a esterificação realizou-se uma nova reação de esterificação, em sistema contendo o dobro de volume reacional e sem retirada de alíquotas ao longo do tempo, com o objetivo de obter amostras para realização das análises de atividade propostas.

A reação de esterificação ocorreu conforme descrito no item 4.2.1, com adição de 15% (m/m) de enzima, e os resultados obtidos para as áreas dos picos dos componentes de interesse antes e após a reação de esterificação são descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Representação do consumo dos substratos e produção de ésteres para reação em sistema fechado conduzida com enzima NS 88011 como biocatalisadora num tempo de 52 horas e com enzima Novozym 435 num tempo de 48 horas

Substratos e produtos da reação	Novozym 435		NS 88011	
	Área mistura reacional	Área após reação	Área mistura reacional	Área após reação
Citronelol	931520,5	176735	1390985,9	574513,9
Geraniol	1080091,1	132632	1699928,8	527294,8
Cinamato de citronelila	0	2790081,3	0	1153384,4
Cinamato de geranila	0	3313548,3	0	1453839,2

Com os dados apresentados na Tabela 5 foi possível determinar a taxa de conversão para as reações conduzidas com as duas enzimas. Para a reação de 48 horas conduzida com a enzima Novozym 435 obteve-se uma conversão de 81% do citronelol e 87,7% do geraniol. Já, para reação de 52 horas utilizando a enzima NS 88011 obteve-se uma conversão de 58,7% de citronelol e 69% de geraniol.

Estes resultados mostram-se semelhantes aos obtidos por Paroul *et al.* (2011) em estudo de esterificação de óleo essencial de citronela com ácido propiônico onde obteve conversão de 55,43% de citronelol e 77,91% de geraniol em ésteres nas condições reacionais de temperatura igual a 60°C, razão molar 1:1 (óleo:ácido) e 1% (m/m) de enzima.

As amostras obtidas nessa reação foram acondicionadas em embalagens estéreis de cor âmbar e armazenadas para avaliação de toxicidade e atividades antioxidante, antibacteriana e larvicida.

5.5 Atividade de esterificação enzimática

Com as enzimas separadas por filtração após a reação de esterificação determinou-se a atividade das enzimas Novozym 435, após 48 horas de reação, e NS 88011, após 52 horas de reação, comparando as mesmas com as enzimas antes de passar pela reação, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Representação da atividade enzimática das enzimas Novozym 435 e NS 88011 antes e após reação de esterificação

Enzima	Atividade antes da reação de esterificação (U.g ⁻¹)	Atividade após a reação de esterificação (U.g ⁻¹)
Novozym 435	1912,5	1087,5
NS 88011	1559,4	949,05

Com os dados obtidos foi possível visualizar uma diminuição da atividade enzimática das duas enzimas avaliadas. Para a enzima Novozym 435, submetida a 48 horas de reação, ocorreu uma diminuição de 43% de sua atividade, já a atividade da enzima NS 88011, submetida a 52 horas de reação, foi reduzida em 39%. Vê-se essa redução acentuada da atividade enzimática ocasionada pelo longo tempo que as enzimas ficam submetidas à reação, a uma temperatura de 70°C.

Semelhante foi o resultado obtido por Padilha e Augusto-Ruíz (2007) que notaram uma redução de 44,45% da atividade de solução enzimática de lipase pancreática porcina após 60 minutos de reação a 38°C.

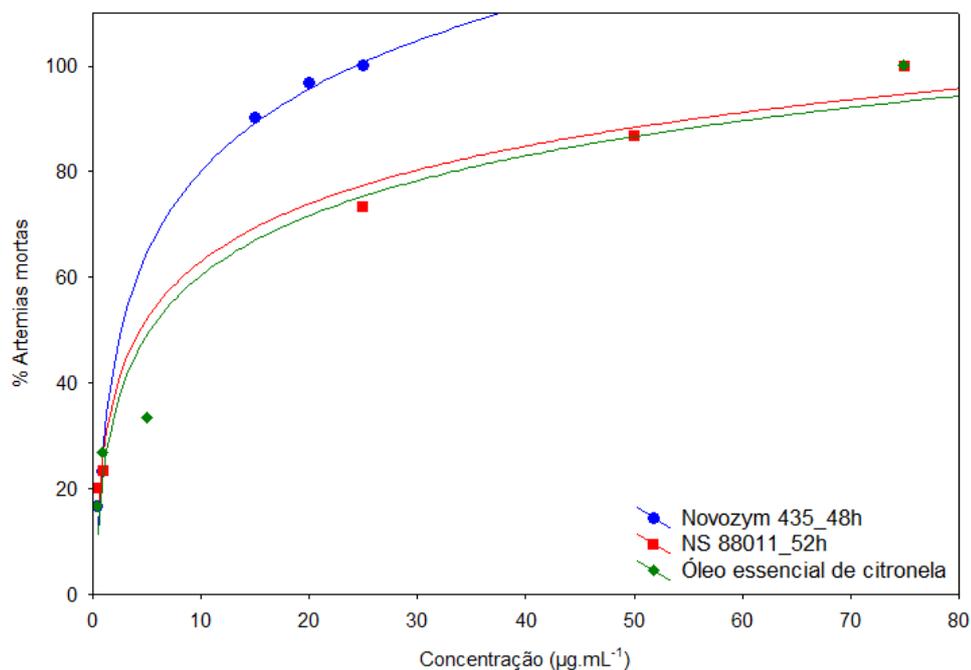
5.6 Toxicidade frente à *Artemia salina*

A partir das análises de toxicidade foi possível determinar a porcentagem de náuplios de *Artemia salina* mortos e assim, determinar a concentração letal média (CL₅₀), que é a concentração de amostra necessária para matar 50% da população.

Quando avaliada a toxicidade do ácido cinâmico foi possível visualizar que a maior concentração avaliada (100 µg.mL⁻¹) não foi suficiente para matar metade da população de artemias, por este motivo seus dados não serão apresentados nesse capítulo.

Os resultados obtidos para as amostras de óleo essencial de citronela, ésteres obtidos com a reação de esterificação utilizando a enzima Novozym 435 e com a enzima NS 88011 são apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Porcentagem de náuplios de *Artemia salina* mortos em relação ao aumento da concentração das amostras



A partir do emprego de escala logarítmica no tratamento dos dados determinou-se a CL₅₀ para o óleo essencial de citronela e óleos esterificados, os dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Correlação entre a quantidade de artemias mortas (%) e concentração de amostras com determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀)

Amostra	Correlação	R ²	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Óleo essencial de citronela	$y = 37,5962 \cdot \log_{10}(x) + 22,8026$	0,9906	5,29
Óleo esterificado em reação de 48 h com Novozym 435	$y = 51,7883 \cdot \log_{10}(x) + 28,3148$	0,9708	2,62
Óleo esterificado em reação de 52 h com NS 88011	$y = 36,2112 \cdot \log_{10}(x) + 26,8386$	0,9485	4,36

Pode-se observar que os ésteres apresentaram maior toxicidade em comparação ao óleo essencial de citronela. Vê-se também uma diferença entre as concentrações letais médias para os ésteres obtidos com as duas diferentes enzimas. Uma possível causa para este acontecimento é o fator de que obteve-se uma maior conversão de substratos em produtos para a reação com enzima Novozym 435, como mostrado no item 5.4.

Os resultados de CL₅₀ das amostras avaliadas mostram que as mesmas apresentam alta toxicidade, tendo em vista que Meyer *et al.* (1982) relataram que um produto é tóxico quando apresenta valor de CL₅₀ < 1000 µg.mL⁻¹. Amarante *et al.* (2011) relatam que uma amostra é muito tóxica quando apresenta CL₅₀ inferior a 100 µg.mL⁻¹.

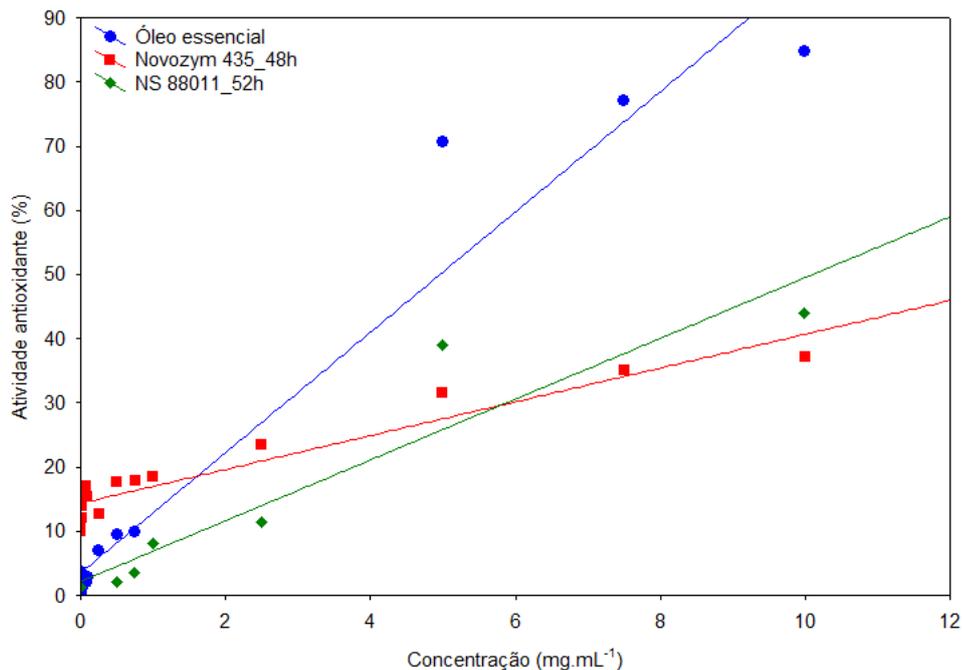
O mesmo comportamento de toxicidade para os óleos essencial e esterificado foi obtido por Vanin (2014) que obteve uma CL₅₀ de 0,5993 µg.mL⁻¹ para o óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e 0,1178 µg.mL⁻¹ para o esterificado.

5.7 Estudo de atividade antioxidante

Os resultados obtidos com a determinação da atividade antioxidante dos substratos e produtos da reação de esterificação do óleo essencial de citronela com ácido cinâmico em diferentes concentrações são mostrados na Figura 14.

Quando avaliada a capacidade de neutralizar o radical DPPH pelo ácido cinâmico percebeu-se que este não apresenta atividade nas concentrações testadas, motivo para não ser mostrado nos resultados.

Figura 14 – Porcentagem de neutralização do radical DPPH em relação ao aumento da concentração de amostras



Os resultados evidenciam que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de amostra. O maior valor de atividade antioxidante, de 84,6%, foi obtido para o óleo essencial de citronela. Após a esterificação a atividade antioxidante diminui chegando a um máximo de 37,1% e 43,8% para os ésteres obtidos com a enzima Novozym 435 e NS 88011, respectivamente.

Tendo em vista que as amostras de ésteres, mesmo na maior concentração avaliada, não foram suficientes para neutralizar metade do radical DPPH não foi possível determinar a IC₅₀ para os mesmos. No entanto foi possível determinar o valor de IC₅₀ para o óleo essencial de citronela a partir da equação da reta obtida com a linearização dos resultados.

Para o óleo essencial, a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de óleo utilizada ($y=3,523+9,3714x$) com $R^2=0,9498$ forneceu um IC₅₀ de 4960 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Analisando os valores de atividade antioxidante antes e após a reação de esterificação, pode-se observar uma diminuição no potencial antioxidante após a reação. Isso pode ter ocorrido pela presença de ácido cinâmico nas amostras após a reação, tendo em vista que este não apresenta potencial antioxidante frente ao radical DPPH.

Scherer *et al.* (2009) em estudo de composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus L.*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) perceberam que o óleo de citronela apresenta alto valor de IC₅₀ (743 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e, por consequência, baixo valor de índice de atividade antioxidante (0,1%) indicando fraca ação antioxidante.

Em avaliação de composição, atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*), Andrade *et al.* (2012) obtiveram IC₅₀ de 517,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial de citronela da espécie *Cymbopogon nardus*.

Vê-se como importante a avaliação da atividade antioxidante por métodos diferentes de análise como o de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), ensaio através do sistema de quelante de ferro, método do β -caroteno ou estresse oxidativo em macrófago.

5.8 Estudo de atividade antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana foi realizado por método de determinação de Concentração Mínima Inibitória (CMI) por microdiluição em caldo, em triplicata, frente à bactéria *S. aureus* resistente à oxacilina (ATCC 33591) e à uma amostra clínica (517) de *S. aureus* resistente à oxacilina e penicilina. Os resultados de CMI para as diferentes amostras frente às duas cepas bacterianas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração Mínima Inibitória do ácido cinâmico, óleo essencial de citronela e óleos esterificados frente às bactérias ATCC 33591 e 517

Bactéria	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Óleo essencial de citronela	Ácido cinâmico	Óleo esterificado por 48 h com enzima Novozym 435	Óleo esterificado por 52 h com enzima NS 88011
ATCC 33591	256	148	128	512
517	-	-	256	-

Pode-se perceber a partir dos dados da Tabela 8 que todas as amostras avaliadas apresentaram atividade antibacteriana frente à cepa ATCC 33591.

Para a análise de atividade frente à bactéria clínica 517 as amostras de ácido cinâmico, óleo essencial de citronela e óleo esterificado obtido com enzima NS 88011 como catalisadora não apresentaram inibição bacteriana. No entanto, a amostra de óleo esterificado obtida com aplicação da enzima Novozym 435 mostrou-se inibitória. Esse resultado mostra-se melhor do que o obtido por Amaral (2016) em avaliação de atividade antibacteriana, para essa bactéria, de tiouréias, que obteve CMI de $288 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $394 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as tiouréias LabTIF 09 e LabTIF 123.

Frente aos resultados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) pode-se dizer que a reação de esterificação confere maior atividade antibacteriana frente às bactéria testada, tendo em vista que o óleo com maior concentração dos ésteres

cinamatos de citronelila e geranila apresentaram-se mais eficazes quanto à inibição bacteriana.

Scherer *et al.* (2009) em estudo de Concentração Inibitória Mínima para o óleo essencial de citronela frente à diferentes bactérias obtiveram CMI entre 0,6 e 0,8 mg.mL⁻¹ para as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, isolada de lesão humana), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028) e *Clostridium perfringes* (ATCC 1324) e CMI igual a 0,4-0,6 mg.mL⁻¹ para *Escherichia coli* (isolada de suínos) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388).

Zanetti *et al.* (2016) em estudo de atividade antimicrobiana do éster cinamato de geranila frente à bactéria ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*, sensível) obtiveram uma valor de CMI igual a 5000 µg.mL⁻¹.

Os valores de CMI obtidos para os ésteres no presente estudo mostram-se inferiores ao valor obtido por Zanetti *et al.* (2016), mostrando que o éster cinamato de citronelila apresenta grande influência na atividade antimicrobiana.

Tendo em vista os bons resultados obtidos, vê-se como importante, em trabalhos futuros, a avaliação da atividade antibacteriana frente a diferentes bactérias.

5.9 Estudo de atividade larvicida

A determinação de atividade larvicida foi determinada a partir da porcentagem de larvas de *Aedes aegypti* mortos em função da concentração das amostras avaliadas. Os resultados para o ácido cinâmico, óleo essencial de citronela e ésteres obtidos por reação de esterificação com duas diferentes enzimas são mostrados na Figura 15.

Pode-se perceber a partir da Figura 15 que o ácido cinâmico apresenta maior atividade larvicida. Quando comparadas as amostras de óleo essencial antes e após a reação de esterificação pode-se perceber que os ésteres apresentam maior atividade. Isso pode ter ocorrido devido ao radical oriundo do ácido cinâmico presente no éster formado.

A partir da aplicação de escala logarítmica no tratamento dos dados foi possível determinar a CL_{50} para as amostras avaliadas, sendo que esses dados são mostrados na Tabela 9.

Figura 15 – Representação da porcentagem de larvas de *Aedes aegypti* mortas em função do aumento da concentração de amostras

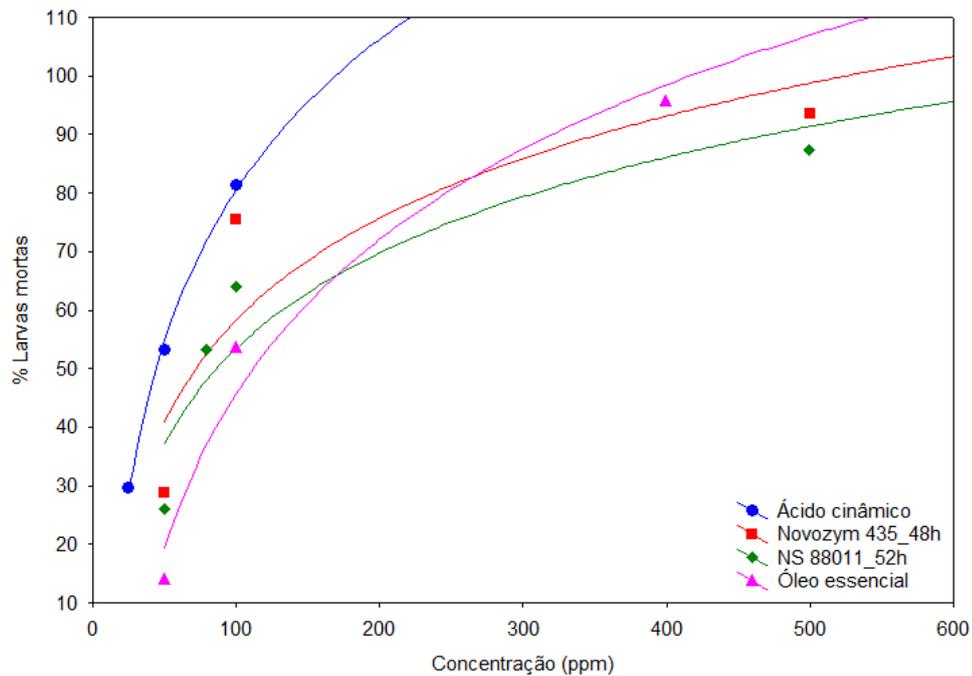


Tabela 9 – Correlação entre quantidade de larvas de *Aedes aegypti* mortas (%) e concentração de amostras com determinação da Concentração Letal Média

Amostra	Correlação	R ²	CL ₅₀ (ppm)
Ácido cinâmico	$y=85,6435.\log_{10}(x) - 90,7776$	0,9902	44,03
Óleo essencial de citronela	$y=87,6265.\log_{10}(x) - 129,5125$	0,9308	111,84
Óleo esterificado em reação de 48 h com Novozym 435	$y=57,9252.\log_{10}(x) - 57,5429$	0,7830	71,87
Óleo esterificado em reação de 52 h com NS 88011	$y=54,251.\log_{10}(x) - 55,0295$	0,8341	86,30

Pode-se perceber que existe uma diferença entre as concentrações letais médias para as duas amostras de ésteres, o motivo disso pode ser a maior

conversão de substratos em ésteres quando utilizada a enzima Novozym 435, que apresentou maior valor de CL_{50} , o mesmo ocorrido neste mesmo trabalho quando avaliada a toxicidade frente à *Artemia salina*.

A concentração letal média (CL_{50}) obtida para o ácido cinâmico e ésteres qualifica as amostras como um potencial agente larvicida, tendo em vista que Cheng *et al.* (2003) considera bons agentes larvicidas substâncias com valor de CL_{50} inferior a 100 ppm.

Resultado semelhante para o óleo de citronela sobre larvas de mosquito *Aedes aegypti* foi relatado por Silva *et al.* (2017) que obtiveram um valor de CL_{50} igual a 120 ppm para o óleo essencial de citronela da espécie *Cymbopogon winterianus*.

Gusmão *et al.* (2013) em estudo de toxicidade de óleos essenciais frente à *Callosobruchus maculatus* obtiveram concentração letal média de 328,42 ppm para o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*). No mesmo estudo, obtiveram como resultado de CL_{90} (concentração necessária para matar 90% da população) uma concentração de 500,93 ppm para o mesmo óleo.

Amer e Mehlhorn (2006) em estudo do efeito larvicida de vários óleos essenciais contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* relataram que o óleo essencial de citronela (*C. winterianus*), em concentração de 50 ppm, causou 60% de mortalidade nas larvas após 24 horas de exposição.

Gomes *et al.* (2016) em avaliação de atividade larvicida do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente ao mosquito *Aedes aegypti* obtiveram um valor de CL_{50} de 76,07 ppm.

Vasconcelos (2014) em estudo da ação de extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*, obtiveram CL_{50} de 0,62% para proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, flavonoides heterosídeos e agliconas, que são derivados de ácido cinâmico.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo, que foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a esterificação enzimática de óleo essencial de citronela com ácido cinâmico e avaliar a toxicidade e atividades antioxidante, antibacteriana e larvicida dos substratos e ésteres produzidos, apresentou resultados promissores. Sendo assim, pode-se concluir que a reação de esterificação deve ser conduzida em sistema de agitação mecânica.

Quanto à cinética de esterificação em sistema de agitação mecânica avaliando as enzimas Novozym 435 e NS 88011 obteve-se conversão quase completa dos substratos em ésteres cinamatos de geranila e citronelila, havendo variação somente no tempo de reação, onde quando aplicada a enzima Novozym 435 o tempo em que houve maior conversão em ésteres foi de 48 horas, já quando aplicada a enzima NS 88011 este tempo foi de 52 horas.

Para a reação de esterificação em sistema de irradiação de micro-ondas foi possível determinar que este sistema não é viável para tal reação.

Quando avaliada a toxicidade dos substratos e ésteres percebeu-se que quanto maior a conversão de substratos em ésteres, maior o poder tóxico da amostra frente à *Artemia salina*.

Através do ensaio de atividade antioxidante por técnica de neutralização do radical DPPH foi possível perceber que a esterificação diminui a capacidade de neutralização deste radical em comparação ao óleo essencial de citronela, tendo em vista que não foi possível determinar a concentração necessária para inibir 50% do radical nas concentrações testadas.

No estudo de atividade antibacteriana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e amostra clínica) observou-se que a esterificação aumenta o potencial antibacteriano das amostras quando comparados ao óleo essencial de citronela. O mesmo aconteceu quando avaliada a atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Quanto aos estudos de toxicidade e das atividades antioxidante, antibacteriana e larvicida, pode-se concluir que os ésteres cinamatos de geranila e citronelila apresentam maior propriedade tóxica frente à *Artemia salina*, maior poder antibacteriano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e 517) e maior atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* em comparação ao óleo essencial de citronela.

Sendo assim, conclui-se que a esterificação dos álcoois geraniol e citronelol provenientes do óleo essencial de citronela é de grande valia quando o objetivo for a aplicação como agente tóxico, antibacteriano e larvicida.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N. *et al.* Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 361-364, 2004.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.
- AMARAL, B.P. do. **Atividade antibacteriana de tioureias frente à amostras padrão e clínicas multirresistentes**. 2016. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- AMARANTE, C.B. do *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 466- 472, 2006.
- AMINI, Z. *et al.* Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. **Energy Conversion and Management**, v. 132, p. 82-90, 2017.
- ANDRADE, M.A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- AZAREDO, T.L., *et al.* Rendimento do óleo essencial de citronela em função do uso de diferentes partes da planta e do acondicionamento da biomassa no extrator. In: II Jornada Nacional da Agroindústria, Bananeiras, 2007.
- BAJER, T. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. **Industrial Crops and Products**, v.100, p.95-105, 2017.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALDACCHINO, F. *et al.* Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, v. 71, n. 11, p. 1471-1485, 2015.
- BARRIER BIOTECH LIMITED; ROBERT EUGENE RYAN; SANDRA MORRIS. ROBERT EUGENE RYAN; SANDRA MORRIS. **Citronella oil as a herbicide for control of ragwort, docks, nettles or thistles**. n. CA 2324245 C, 17 mar. 1999, 14 out. 2008, 2008.

BASKAR, K., *et al.* Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target zebra fish. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2017.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. 4. ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001.

BELSITO, D. *et al.* A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1-23, 2007.

BHATIA, S.P. *et al.* Fragrance material review on ethyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 90-94, 2007.

BIZZO, H.R. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. **A Lavoura**, v. 699, p. 48-53, 2013.

BONDIOLI, P. The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 77-82, 2004.

BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1988.

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

CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Amsterdam: Academic Press, 2003.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 50, n. 3, p. 126-129, 2006.

CAVAR, S. *et al.* Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 479-485, 2012.

CHEN, Y-L. *et al.* Transformation of cinnamic acid from *trans*- to *cis*-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 188-194, 2011.

CHENG, S.S. *et al.* Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.

CLIFORD D. STEWART; PHILIP J. DRISCOLL. **Citronella candle**. US n. US 2323804 A, 20 set. 1940, 6 jul. 1943, 1943.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis: EPUB, 2008.

CONNER, D.E. Naturali occurring compounds. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. **Antimicrobials in foods**. 2.ed. Nova York: Marcel Dekker, 1993. p. 441-467.

CRESPO, J. da S. *et al.* The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 401-409, 2005.

DE, P. *et al.* Recent advances in the development of cinnamic-like derivatives as antituberculosis agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, p. 155-168, 2012.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticâncer agents – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672-1703, 2011.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicações na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DEUTSCHMANN, O. *et al.* Heterogeneous catalysis and solid catalysts. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2009.

DEVRNJA, N. *et al.* Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 212-221, 2017.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. England: John Wiley e Sons, 1997.

DIXIE ROBINSON. **Hair pomade composition and method of making the same**. US N. US 7479292 B2, 3 abr. 2008, 20 jan. 2009, 2009.

DJENANE, D. *et al.* Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 92, p. 667-674, 2012.

DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. In: BOUAYED, J.; BOHN, J. **Nutrition, Well-being and Health**. Croácia: InTech, 2012. p. 155-178.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EMBRADERM – Empresa Brasileira de Dermocosméticos Erelí (Brasil). Marcos de Vasconcelos Barbosa. **Composições químicas para elaboração de spray antimicrobiano orgânico**. BR n. WO 2016044903 A1, 24 set. 2014, 31 mar. 2016, 2016.

ESPINA, L. *et al.* Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

FENNEMA, O.R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Fennema's Food Chemistry**. 4.ed. New York: CRC Press, 2007.

FOUKIS, A. *et al.* Sustainable production of a new generation biofuel by lipase-catalyzed esterification of fatty acids from liquid industrial waste biomass. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 122-128, 2017.

GOBEC, S. *et al.* Cinnamic acid esters as potente inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase—a model enzyme of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3933-3936, 2004.

GOMES, P.R.B. *et al.* Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 597-604, 2016.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 6, p. 539-546, 1978.

GUSMÃO, N.M.S. *et al.* Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 41-47, 2013.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3 (article 12), 2012.

KAKARAPARTHI, P.D. *et al.* Variation in the essential oil content and composition of Citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 240-248, 2014.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v. 36, p.169-189, 1994.

KHERADMAND, K.; NOORI, S.A.S.; SABAHI, G.H. Repellent Effects of Essential Oil from *Simmondasia chinensis* (Link) against *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus and *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 2, p. 66-68, 2010.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–139, 2004.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals: A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13-39, 2012.

LEBEDEVA, I.V. *et al.* Chemoprevention by perillyl alcohol coupled with viral gene therapy reduces pancreatic cancer pathogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 2042-2050, 2008.

LEE, J.W. *et al.* Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 49-56, 2005.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5.ed. New York: W. H. Freeman, 2008.

LIPTON - Division of Conopco, Inc. (Estados Unidos da América). Michael Charles Cirigliano; William Conrad Franke; Meghan Mary Kemly; Raymond Thomas McKenna; Paul John Rothenberg. **Cinnamic acid for use in tea containing beverages**. US n. US 6036986 A, 28 out. 1997, 14 mar. 2000, 2000.

LOU, Z. *et al.* The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica L. var. sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT – Food Science and Technology**, v. 80, p. 371-377, 2017.

MACHADO, B.F.M.T. **Óleos Essenciais: Verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MARCO, C.A. *et al.* Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 429-432, 2007.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família *Lamiaceae*. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MARTINS, A.B. *et al.* Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 417–422, 2013.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 55, p. 107-146, 1997.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologias de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MEYER, B.N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Biosay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOLINERO, L. *et al.* Thermal esterification of cinnamic and p-methoxycinnamic acids with glycerol to cinnamate glycerides in solventless media: A kinetic model. **Chemical Engineering Journal**, v. 225, p. 710-719, 2013.

MORE, S.B.; WAGHMARE, J.T.; GOGATE, P.R. Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 253-261, 2017.

MU'AZU, K.; MOHAMMED-DABO, I.A.; WAZIRI, S.M. Development of mathematical model for the prediction of essential oil extraction from *Eucalyptus Citriodora* leave. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v. 2, n. 3, p. 2298-2306, 2012.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NIERO, E.L. de O. **Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos: Avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta.** 2010. 38 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OARADA, M. *et al.* Degeneration of lymphoid tissues in mice with the oral intake of low molecular weight compounds formed during oil autoxidation. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2101-2102, 1988.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, D. *et al.* Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 231-241, 2005.

OLIVEIRA, M.A. de. **Resolução enzimática de álcoois secundários**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PADILHA, M.E. da S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 285-290, 2007.

PADUCH, R. *et al.* Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PAOLI, S. de *et al.* Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 175-182, 2007.

PARANAGAMA, P.A.; GUNASEKERA, J.J. The efficacy of the essential oils of Sri Lankan *Cinnamomum zeylanicum* fruit and *Micromelum minutum* leaf against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera:Bruchidae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 75-82, 2011.

PAROUL, N. *et al.* Solvent-free production of bioflavors by enzymatic esterification of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.13-21, 2012.

PAROUL, N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. 2011. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Evaluation of the inseticidal activity of *Chrysanthemum coronarium* L. plant extracts. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 22, n. 2, p. 411-420, 1996.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVÉDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2005.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-60, 2006.

RATHER, M.A. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1185-1190, 2012.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. Bioprospecting of plant essential oils for medicinal uses. In: FULEKAR, M.H.; PATHAK, B.; KALE, R.K. **Environment and Sustainable Development**. India:Springer, 2014. p. 59-76.

REIS, M.C. *et al.* Produção de biodiesel a partir de ácidos graxos provenientes do refino de óleos vegetais via catálise ácida heterogênea e micro-ondas. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1307-1312, 2015.

RÍOS, N.; STASHENKO, E.E.; DUQUE, J.E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, n. 4, p. 307-311, 2017.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.

ROD GARCIA. **Essential oils in plastic film**. US N. US 20040034149 A1, 12 abr. 2003, 19 fev. 2004, 2004.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v. 1, n. 2, p.43-50, 2001.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control**: methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization, 1997.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

SÁNCHEZ, A.A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens*H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585-590, 2010.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R. *et al.* Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 150-159, 2013.

SANGALETTI-GERHARD, N. *et al.* In situ biodiesel production from greasy sewage sludge using acid and enzymatic catalysts. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 63–70, 2015.

SANTURIO, D.F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de suínos, aves e bovinos**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SAXENA, R.K. *et al.* Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. **Current Science**, v. 89, n. 6, p. 1000-1003, 2005.

SCHERER, R. *et al.* Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCIENCE DIRECT. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

- SEVANI, A., HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 5, p. 365-390, 1985.
- SHARMA, C.K.; CHAUHAN, G.S.; KANWAR, S.S. Synthesis of medically importante ethyl cinnamate ester by porcine pancreatic lipase immobilized on poly(AAc-co HPMA-cl-EGDMA) hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 5, p. 2674-2679, 2011.
- SHASANY, A.K. *et al.* Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 553-559, 2000.
- SHI, Y-G. *et al.* Lipase-catalyzed esterification of ferulic acid with lauryl alcohol in ionic liquids and antibacterial properties in vitro against three food-related bacteria. **Food Chemistry**, v. 220, p. 249-256, 2017.
- SILVA, T.I. da *et al.* Efeito larvicida de óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Revista Cultivando o Saber**, v. 10, n. 1, p. 128-136, 2017.
- SILVEIRA, S.M. da *et al.* Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 268-495.
- SINGH, J.; BAGHOTIA, A.; GOEL, S. P. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1469-1475, 2012.
- SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1521-1527, 2011.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOONWERA, M.; PHASOMKUSOLSIL, S. Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 11, p. 967-978, 2017.
- SOUZA, R. **Avaliação de sistemas reacionais e ampliação de escala para a síntese enzimática de cinamato de geranila e suas propriedades antimicrobianas**. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SRINIVASAN PALANIAPPAN; MALLADI SAIRAM. **Process for preparation of cinnamates using polyaniline salts as catalysts.** US n. US20040049068 A1, 13 fev. 2002, 11 mar. 2004, 2004.

TABART, J. *et al.* Ascorbic acid, phenolic acid, flavonoid, and carotenoid profiles of selected extracts from *Ribes nigrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4763–4770, 2011.

TAUIL, P.L. Urbanização e Ecologia do Dengue. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17 (Suplemento), p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, B. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (Estados Unidos da América). Zaiyou Liu; Toan Trinh; Kristin Finley. **Consumable composition comprising perfumed particles and article containing the same.** US n. US20030036489 A1, 02 maio 2002, 20 fev. 2003. 2003.

TIMUNG, R. *et al.* Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 178-188, 2016.

TREICHEL, H. *et al.* A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Unicamp (Brasil). Rosanna Tarkany Basting; Humberto Moreira Spindola; Leila Servat; Nubia de Cassia Almeida Queiroz; Ilza Maria Oliveira Sousa; Rogério Grando; Vanessa Helena da Silva Sousa; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; João Ernesto de Carvalho; Mary Ann Foglio. **Composição e formulação a base de extratos/óleos essenciais de *Pterodon pubescens* benth. e *Cordia verbenacea* dc, e usos.** BR n. WO 2016187682 A1, 28 maio 2015, 1 dez. 2016, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ & ABCOTT COMÉRCIO E INDÚSTRIA QUÍMICA – Eirele (Brasil). Francisco de Assis Marques; Eduardo Novaes Ramires; Vinícius Annies; Mario Antonio Navarro da Silva. **Composição pesticida, repelente, fungicida e vermífuga e uso da mesma.** BR n. WO 2014094100 A2, 20 dez. 2013, 26 jun. 2014, 2014.

VANIN, A.B. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*).** 2014. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

VASCONCELOS, T.F.P. **Estudo da ação de extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas *Aedes***

aegypti. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

VICTÓRIA, F. N. **Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Patógenos de Importância em Alimentos**. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

WANG, Y. *et al.* High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629-633, 2016.

WANG, Y. *et al.* Synthesis of benzyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 256-261, 2015.

WOLFFENBUTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inseticide resistance and vector control: Technical Report Series: n. 443**, Geneva, 1970.

XU, G. *et al.* Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 330–335, 2007.

YADAV, G.D.; RAHUMAN, M.S.M.M. Cation-Exchange Resin-Catalysed Acylations and Esterifications in Fine Chemical and Perfumery Industries. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 5, p. 706-713, 2002.

YADAV, G.D.; SHINDE, S.D. Synergism of microwave irradiation and immobilized lipase catalysis in synthesis of 4,8-dimethylnon-7-en-1yl (2E)-3-phenylpro-2-enolate. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, n. 6, p. 589-596, 2012.

YERUVA, L. *et al.* Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer letters**, v. 257, n. 2, p. 216-226, 2007.

YU, D. *et al.* Microwave assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, v. 12, p. 844-850, 2010.

ZAGO, J.A.A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZANETTI, M. *et al.* Synthesis of geranyl cinnamate by lipase catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 115-121, 2016.

ZHANG, B. *et al.* Ethyl cinnamate derivatives as promising high-efficient acaricides against *Psoroptes cuniculi*: Synthesis, bioactivity and structure-activity relationship. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 63, p. 255-262, 2015.