

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

BRUNA MARIA SAORIN PUTON

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
ANTIOXIDANTE DE GALATO DE GERANILA**

ERECHIM, RS - BRASIL

2019

BRUNA MARIA SAORIN PUTON

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
ANTIOXIDANTE DE GALATO DE GERANILA**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de concentração – Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Natalia Paroul

Prof. Dr. Rogério Luis
Cansian

ERECHIM, RS

2019

BRUNA MARIA SAORIN PUTON

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
ANTIOXIDANTE DE GALATO DE GERANILA**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de concentração – Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Erechim, 11 de março de 2019

Banca Examinadora

Orientadora Prof.^a Dr.^a Natalia Paroul
URI Erechim

Orientador Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
URI Erechim

Avaliador Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago
URI Erechim

Avaliadora Prof.^a Dr.^a Clarissa Dalla Rosa
UFFS Erechim

P98s Puton, Bruna Maria Saorin

Síntese e avaliação das atividades biológicas e antioxidante de galato de de geranila / Bruna Maria Saorin Puton - 2019.
82 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Natalia Paraoul; Rogério Luis Cansian”

1. Esterificação enzimática 2. Ácido gálico 3. Geraniol 4. Antioxidante lipofílico I. Título

C.D.U.: 664

Catlogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e incentivou.

À minha orientadora, professora Natália Paroul, e ao meu orientador, professor Rogério Luis Cansian, pela paciência, ensinamentos, confiança e por todas as contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, e que contribuíram também para meu crescimento pessoal

Ao professor Rogério Marcos Dallago por todas as contribuições nos seminários e pelo esclarecimento de dúvidas durante este trabalho.

À Ilizandra Aparecida Fernandes pela amizade e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Itamar Luís Gonçalves pelo auxílio com análises.

À todos os professores do programa pela dedicação e ensinamentos transmitidos e aos meus colegas de laboratório, principalmente do Laboratório 9.36.

À URI- Erechim, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, pela estrutura ofertada e por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À banca avaliadora professor Rogério Marcos Dallago e Clarissa Dalla Rosa, pela disponibilidade de fazerem parte da mesma e pelas contribuições para o trabalho.

Agradeço a todos que não citei, mas que de uma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido
e não na vitória propriamente dita.”*

Mahatma Gandhi

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTE DE GALATO DE GERANILA

Bruna Maria Saorin Puton

Março/2019

Orientadores: Dr.^a Natalia Paroul

Dr. Rogério Luis Cansian

O ácido gálico é um poderoso antioxidante natural, porém sua alta polaridade dificulta sua solubilização em meio lipídico, dessa forma as modificações na molécula de ácido gálico, como a esterificação, podem melhorar sua lipofilicidade, contribuindo para o aumento da dispersão em óleos e gorduras. Essas alterações podem ser produzidas via catálise ácida ou enzimática. A catálise realizada por enzimas mostra-se um processo bastante promissor, devido as condições mais brandas de operação. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar o éster galato de geranila via reação de esterificação enzimática em solvente orgânico, e avaliar as atividades biológicas e antioxidante dos substratos e do produto obtido. A reação de esterificação nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), temperatura 70 °C, concentração de lipase de 10% (m/m substratos) e 30 mL de álcool *tert*-butílico como solvente, por 2 h, obteve um rendimento de aproximadamente 21% de conversão. O isolamento do galato de geranila foi realizado por cromatografia em coluna (CC) e acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD). Os ensaios da atividade antifúngica sobre *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* e *Penicillium crustosum* foram realizados pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades no meio de cultura, sendo que o ácido gálico apresentou atividade somente sobre *A. flavus*, o geraniol mostrou atividade sobre os três fungos testados, assim como o éster, porém este formou halo de inibição somente nas concentrações mais altas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em 10 bactérias por meio do método de microdiluição em caldo. O ácido gálico apresentou inibição fraca sobre todas as bactérias, assim como o éster, o geraniol apresentou inibição moderada sobre *Klebsiella pneumoniae* e fraca para as demais bactérias. Os resultados da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* mostrou que o ácido gálico, o geraniol e o éster apresentaram toxicidade, sendo que o valor de DL₅₀ para o éster foi de 101,56 µg.mL⁻¹, para o geraniol foi de 26,48 µg.mL⁻¹ e para o ácido gálico foi de 836,58 µg.mL⁻¹. A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, com leitura de absorbância a 515 nm, o ácido gálico apresentou o valor de IC₅₀ de 0,0029 mg.mL⁻¹, já o éster isolado apresentou potencial antioxidante com um valor de IC₅₀ de 0,0677 mg.mL⁻¹, além disso sua solubilidade em meio lipídico é maior que a do ácido gálico, possibilitando sua aplicação nas indústrias de alimentos ou farmacêuticas.

Palavras-chave: Esterificação enzimática. Ácido gálico. Geraniol. Antioxidante lipofílico.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF BIOLOGICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GERANYL GALLATE

Bruna Maria Saorin Puton

March/2019

Advisors: Dr.^a Natalia Paroul

Dr. Rogério Luis Cansian

Gallic acid is a powerful natural antioxidant, but its high polarity makes it difficult to solubilize it in lipid media, so modifications in the gallic acid molecule, such as esterification, can improve its lipophilicity, contributing to an increase in dispersion in oils and fats. These changes can be produced via acid or enzymatic catalysis. The catalysis performed by enzymes shows a very promising process due to the milder conditions of operation. In this sense, the objective of the present work was to synthesize the geranyl gallate ester via the enzymatic esterification reaction in organic solvent, and evaluate the biological and antioxidant activities of the substrates and the product obtained. The esterification reaction under conditions of 1:6 molar ratio (acid:alcohol), temperature 70 °C, lipase concentration of 10% (w/w substrates) and 30 mL of *tert*-butyl alcohol as solvent for 2 h gave a yield of approximately 21% conversion. Isolation of geranyl gallate was performed by column chromatography (CC) and accompanied by thin layer chromatography (TLC). The antifungal activity tests on *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* and *Penicillium crustosum* were carried out using the solid medium diffusion method using wells in the culture medium, and gallic acid showed activity only on *A. flavus*, geraniol showed activity on all three fungi tested, as well as the ester, but this formed inhibition halo only at the highest concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in 10 bacteria by means of the broth microdilution method. Gallic acid presented weak inhibition on all bacteria, as well as the ester, geraniol showed moderate inhibition on *Klebsiella pneumoniae* and weak for the others bacteria. The results of the toxicity to the microcrack *Artemia salina* showed that gallic acid, geraniol and ester presented toxicity, being that the value of LD₅₀ for the ester was of 101.56 µg.mL⁻¹, for the geraniol was of 26,48 µg.mL⁻¹ and for gallic acid was 836.58 µg.mL⁻¹. The antioxidant activity was determined by the DPPH method, with absorbance reading at 515 nm, gallic acid had the IC₅₀ value of 0.0029 mg.mL⁻¹, whereas the isolated ester presented antioxidant potential with an IC₅₀ value of 0,0677 mg.mL⁻¹, its solubility in lipid medium is greater than that of gallic acid, allowing its application in the food or pharmaceutical industries.

Key-words: Enzymatic esterification. Gallic acid. Geraniol. Lipophilic antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do geraniol.....	17
Figura 2 - Estrutura química do ácido gálico.	19
Figura 3 - Estrutura básica dos galatos (R = cadeia alquílica com número variável de carbonos).	20
Figura 4 - Estrutura química do galato de geranila.	22
Figura 5 - Reação de esterificação.....	25
Figura 6 – Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica.	31
Figura 7 - Reação de esterificação de ácido gálico e geraniol.....	37
Figura 8 - Conversão de galato de geranila ao longo do tempo com razão molar 1:6 (ácido:álcool), 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima, 125 rpm e temperatura de 70 °C.	47
Figura 9 - Cromatografia em camada delgada, apresentando as bandas para ácido gálico (1), geraniol (2), branco (3), fração cristalina separada da reação (4), mistura reacional após retirada do excesso de ácido gálico (5) e do produto após CC (6).....	51
Figura 10 - Percentual de mortalidade da <i>A. salina</i> em relação a diferentes concentrações de geraniol (a), ácido gálico (b) e galato de geranila (c) após 24 h de exposição.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade de esterificação da lipase Novozym 435 submetida ao tratamento com o solvente álcool <i>terc</i> -butílico.	46
Tabela 2 – Influência da temperatura na conversão de galato de geranila nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima e 125 rpm.	48
Tabela 3 – Influência da razão molar sobre a conversão de galato de geranila nas condições fixas de 70 °C, 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima e 125 rpm.	49
Tabela 4 – Influência da concentração de enzima na conversão de galato de geranila nas condições de 70 °C, 30 mL de solvente, razão molar 1:6 (ácido:álcool) e 125 rpm por 2 h.	49
Tabela 5 - Resultados da atividade de esterificação da lipase Novozym 435 antes e após a reação de esterificação com ácido gálico e geraniol.	52
Tabela 6 – Solubilização do ácido gálico e galato de geranila em diferentes solventes orgânicos e óleo de soja.	52
Tabela 7 - Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de geraniol sobre <i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> e <i>P. crustosum</i>	54
Tabela 8 – Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de ácido gálico sobre <i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> e <i>P. crustosum</i>	54
Tabela 9 – Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de galato de geranila sobre <i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> e <i>P. crustosum</i>	55
Tabela 10 - Avaliação da concentração inibitória mínima do ácido gálico, geraniol e galato de geranila.	56
Tabela 11 - Atividade antioxidante expressa em valores de IC ₅₀ do ácido gálico e do galato de geranila.	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	39
Equação 2	40
Equação 3	41
Equação 4	41
Equação 5	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Geraniol	17
3.2 Ácido gálico	18
3.2.1 Derivados do ácido gálico	19
3.2.2 Galato de geranila	21
3.2.3 Toxicidade do ácido gálico e seus derivados.....	23
3.3 Síntese de ésteres	25
3.3.1 Fatores que influenciam a esterificação enzimática	27
3.3.2 Biocatálise com solventes orgânicos	29
3.4 Oxidação lipídica	30
3.5 Antioxidante	32
4 METODOLOGIA	35
4.1 Materiais	35
4.1.1 Enzima	35
4.1.2 Substratos	35
4.1.3 Solventes e reagentes para análises químicas.....	35
4.1.4 Solventes e reagentes para análises biológicas e antioxidante	36
4.2 Métodos experimentais	36
4.2.1 Avaliação do efeito solvente sobre a atividade da enzima	36
4.2.2 Estudo da síntese enzimática de galato de geranila	36
4.2.2.1 Estudo cinético da síntese enzimática de galato de geranila	37
4.2.2.2 Estudo da influência da temperatura	38
4.2.2.3 Estudo da influência da razão molar.....	38
4.2.2.4 Estudo da influência da concentração de enzima	38
4.3 Isolamento do produto	38
4.4 Métodos analíticos	39
4.4.1 Determinação da atividade de esterificação enzimática	39
4.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	40
4.4.3 Determinação do rendimento da reação	40

4.5 Determinação da lipossolubilidade	41
4.6 Atividades biológicas e antioxidante	42
4.6.1 Determinação da atividade antifúngica	42
4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima	43
4.6.3 Avaliação de toxicidade frente à <i>A. salina</i>	43
4.6.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH*	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Efeito do solvente sobre a atividade de esterificação da enzima	46
5.2 Síntese enzimática de galato de geranila	47
5.3 Isolamento do galato de geranila.....	50
5.4 Atividade de esterificação enzimática.....	51
5.6 Atividades biológicas	53
5.6.1 Atividade antifúngica	53
5.6.2 Concentração inibitória mínima	56
5.6.3 Toxicidade frente à <i>A. salina</i>	57
5.7 Atividade antioxidante	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE A	81
APÊNDICE B.....	82

1 INTRODUÇÃO

O ácido gálico é um fitoquímico encontrado em diversas plantas, sendo considerado um poderoso antioxidante natural (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013; MEDINA-TORRES et al., 2013), com possibilidade de uso em diversos produtos para prevenir a rancidez em lipídios (PASANPHAN; CHIRACHANCHAI, 2008), porém sua alta polaridade dificulta a interação com sistemas lipídicos, diminuindo sua eficiência.

Uma alternativa encontrada para superar essa dificuldade foi a síntese de derivados do ácido gálico. Esses agentes antioxidantes passaram a ser produzidos e amplamente utilizados na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

As modificações de ácidos fenólicos, por meio da reação de esterificação com álcoois de cadeia média e longa, podem gerar uma molécula anfílica com melhor lipofilicidade, contribuindo para o aumento do efeito biológico, alterando a afinidade por alvos celulares, a difusão através das membranas lipídicas e a dispersão em óleos e gorduras (FIGUEROA-ESPINOZA; VILLENEUVE, 2005).

Essas alterações na molécula do ácido gálico podem ser produzidas via catálise ácida como relatado por diversos autores (JANG et al., 2009; TANAKA; CHINO; TAKAHASHI, 2012; KHATKAR et al., 2017) ou por catálise enzimática tanto do ácido gálico quanto do ácido tânico, utilizando como catalisador tanases (YU; LI; WU, 2004; SHARMA; GUPTA, 2003; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011; NIE et al., 2012) e lipases (BOUAZIZ et al., 2010; SHARMA et al., 2017), a fim de sintetizar diferentes ésteres de ácido gálico, chamados de galatos.

O uso de enzimas como catalisadores, principalmente as lipases, mostra-se como um processo bastante promissor, pois emprega condições mais brandas de temperatura, pressão e pH, gerando uma menor quantidade de resíduos e consumo de energia, além disso, as enzimas possuem uma grande seletividade ou especificidade em relação a um substrato, à posição e a isômeros, produzindo menos subprodutos (CASTRO et al., 2004).

Alguns trabalhos citados na literatura sintetizaram o galato de geranila por via química e buscaram avaliar algumas atividades biológicas, obtendo em grande parte dos estudos resultados satisfatórios, e em alguns casos melhora nas respostas em comparação com o ácido gálico (ABE; KASHIWAGI; NOGUCHI, 2000a; ABE; KASHIWAGI; NOGUCHI, 2000b; KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002).

Porém, não há relatos em trabalhos publicados até o momento quanto a síntese enzimática do galato de geranila, assim como há poucos trabalhos explorando as propriedades biológicas deste éster. Nesse sentido, a síntese de galatos via esterificação enzimática, em especial do galato de geranila, pode ser uma abordagem promissora para a geração de substâncias bioativas e de novos agentes antioxidantes naturais para a preservação de alimentos e cosméticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo geral sintetizar enzimaticamente o galato de geranila utilizando a lipase Novozym 435 em sistema com solvente orgânico e avaliar as atividades biológicas e antioxidante do produto.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do solvente álcool *terc*-butílico sobre a atividade da enzima;
- Sintetizar um éster a partir de ácido gálico e geraniol utilizando como catalisador a lipase Novozym 435;
- Quantificar o produto por titulação e isolar o produto por cromatografia em coluna;
- Verificar a lipossolubilidade do éster em diferentes solventes orgânicos e em óleo de soja;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos substratos e do produto nos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium crustosum*;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos substratos e do produto sobre as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Salmonella choleraesuis*;
- Avaliar a toxicidade aguda frente à *Artemia salina* do produto e dos substratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos substratos e do produto.

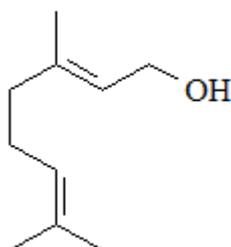
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à geraniol, ácido gálico, derivados do ácido gálico, síntese de ésteres, oxidação lipídica e atividade antioxidante.

3.1 Geraniol

O geraniol (3,7-dimetilocta-trans-2,6-dien-1-ol) é um monoterpene acíclico (Figura 1), presente na maioria dos óleos essenciais de plantas que contém terpenos, como *Cymbopogon winterianus* Jowitt. (citronela) (RAJESWARA RAO et al., 2004), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (palmarosa) (DUBEY; LUTHARA, 2001), *Rubus* sp. (amora) (DU; FINN; QUIAN, 2010), *Pelargonium graveolens* L' Heri (gerânio) (BLANK et al., 2012), *Citrus bergamia* Risso (bergamota) (FELIPE; BICAS, 2017), entre outros.

Figura 1 - Estrutura química do geraniol.



Fonte: a autora.

O geraniol origina-se da molécula geranyl difosfato através de sínteses que executam reações de ionização (BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998). Geralmente a biossíntese de geraniol é realizada através da via do mevalonato, porém em algumas plantas pode ser sintetizado por uma via independente. O produto chamado de geraniol é constituído por uma mistura de dois isômeros, onde o *trans* é chamado de geraniol e o *cis* de nerol (CHEN; VILJOEN, 2010).

Apresenta características de um líquido incolor, oleoso e com aroma de rosa (10 ppm), insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos, sendo utilizado em cosméticos, perfumes, sabonetes, produtos de limpeza em geral, entre outros (LAPCZYNSK et al., 2008).

A Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) e a Food and Drug Administration (FDA) classificam o geraniol como geralmente reconhecido como seguro (GRAS) e aprovam seu uso como aditivo alimentar (FEMA, 1965; LAPCZYNSK et al., 2008). Na indústria de alimentos é utilizado como *flavor* nos aromas de pera, amora, melão, maçã vermelha, lima, laranja, limão, melancia, abacaxi e *blueberry* (BENETI et al., 2011).

A literatura relata diversas atividades farmacológicas, como repelência, acaricida e inseticida (TRAINA et al., 2005; JEON; LEE; LEE, 2009; KHALLAAYOUNE et al., 2009; NICULAU et al., 2013), ação antihelmíntica (KUMARAN et al., 2003; HIERRO et al., 2004), antimicrobiana (BARD et al., 1988; FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; SI et al., 2006; LEITE et al., 2015; SANTOS et al., 2017), antioxidante (CHOI et al., 2000; TIWARI; KAKKAR, 2009) e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, contra leucemia, hepatoma e células de melanoma (SHOFF et al., 1991; YU; ANDERSON; ELSON, 1995; YU; HILDEBRANDT; ELSON, 1995; BURKE et al., 1997; CARNESECCHI et al., 2001). Além disso, o geraniol possui atividades quimiopreventivas em diversos modelos de carcinogênese (CARNESECCHI et al., 2004).

3.2 Ácido gálico

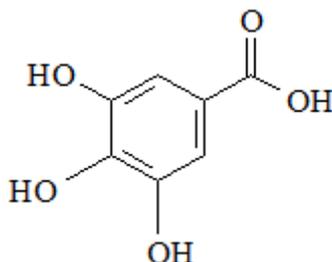
O ácido gálico (3,4,5 trihidroxibenzóico) é um metabólito vegetal que deriva de rotas bioquímicas a partir do ácido chiquímico, podendo ser obtido a partir de taninos hidrolisáveis de plantas por hidrólise com ácido (ácido sulfúrico) ou tanases (E.C.3.1.1.20) (GRUNDHÖFER et al., 2001; ROSSO, 2005).

É encontrado naturalmente em diversas plantas, como na madeira de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira preta) (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002), nas sementes de *Dimocarpus longan* Lour. (longan) e caroço de *Mangifera indica* L.(manga) (SOONG; BARLOW, 2006), em folhas de *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl (tamanqueiro) (CALVO et al., 2007), nas raízes de *Paeonia rockii* (S.G. Haw & Lauener) T. Hong & J.J. Li (peônia da rocha) (PICERNO et al., 2011), nas folhas, caules e raízes de diferentes variedades de *Labisia pumila* Benth (akar fatimah) (KARIMI; JAAFAR; AHMAD, 2011), entre outras.

Este ácido fitoquímico é um poderoso agente antioxidante, e essa atividade lhe é atribuída devido ao alto poder redutor e a baixa entalpia de dissociação da ligação O–H

(oxigênio – hidrogênio) da estrutura fenólica trihidroxilada (Figura 2) (INOUE et al., 1995; JI; ZHANG; SHEN, 2006).

Figura 2 - Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: a autora.

O ácido gálico apresenta-se como um pó cristalino branco, solúvel em água quente, acetona, acetato de etila e dimetilsulfóxido (DMSO), com baixa solubilidade em água fria e insolúvel em clorofórmio e benzeno (SANTOS, 2007). O ácido gálico é uma substância muito reativa devido à sua natureza fenólica, dessa maneira deve ser mantido ao abrigo da luz (BUDAVARI, 1996; HOEPFNER; RENG; SCHIMIDT, 2002).

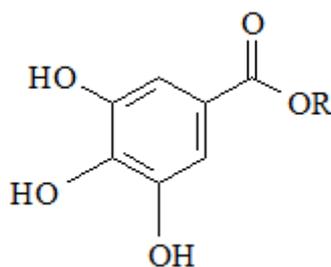
Em relação a suas propriedades ativas, estudos constataram ação antimelanogênica e antioxidante (KIM, 2007; CUSTODIO et al., 2017; THANYACHAROEN et al., 2018), anti-inflamatória (KROES et al., 1992), antimutagênico (BIROŠOVÁ; MIKULÁŠOVÁ; VAVERKOVÁ, 2005), neuroprotetiva (NABAVI et al., 2012; MANSOURI et al., 2013) e apoptose em linhagens celulares de câncer de pulmão humano (KAWADA et al, 2001).

3.2.1 Derivados do ácido gálico

Compostos químicos isolados que possuam atividades biológicas podem sofrer um incremento em tal atividade através da modificação da estrutura molecular com a incorporação de novos grupamentos ou simplificação da molécula (BARBOSA, 2010).

Segundo Rosso (2005), a função ácida do ácido gálico possibilita sua esterificação com diversas substâncias, gerando galatos (Figura 3) com os mais variados efeitos biológicos.

Figura 3 - Estrutura básica dos galatos (R = cadeia alquílica com número variável de carbonos).



Fonte: a autora.

Dentre os galatos utilizados pela indústria como antioxidantes, o galato de propila é empregado em alimentos, cosméticos e medicamentos, já os galatos de metila, octila e dodecila são usados pela indústria farmacêutica e cosmética (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

Os galatos de propila, dodecila e octila são permitidos pela legislação vigente no limite máximo de 100 mg.kg^{-1} em óleos de gorduras (BRASIL, 2007) e em cremes vegetais e margarina o galato de propila é permitido no limite de 200 mg.kg^{-1} (sobre o teor de gordura) (BRASIL, 2005).

São relatados na literatura alguns estudos sobre as propriedades bioativas dos ésteres de ácido gálico, entre elas: inibição da cadeia respiratória do parasita *Trypanosoma cruzi* (LETELIER et al 1990), atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (BOYD; BEVERIDGE, 1981), toxicidade em hepatócitos de ratos contribuindo na disfunção mitocondrial (NAGAKAWA; TAYAMA, 1995).

Além disso, os galatos podem ser potentes indutores de apoptose em células U937 de leucemia monoblástica humana (SAEKI et al., 2000), inibidores da esqualeno epoxidase (ABE; KASHIWAGI; NOGUCHI, 2000a), neuroprotetores, antioxidantes e anticarcinogênicos (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

Sakaguchi et al. (1999), demonstraram que derivados do ácido gálico apresentaram maior citotoxicidade do que o ácido gálico em algumas linhagens de células cancerosas.

Em seu estudo, Kubo (1999), verificou que os ésteres de ácido gálico apresentaram atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, sendo o galato de nonila a substância que apresentou maior atividade, ao contrário do ácido gálico que não mostrou tal atividade.

Os galatos de alquila podem ser sintetizados por catálise química, onde o ácido gálico está sob refluxo com álcoois na presença de diversos catalisadores, tais como o ácido sulfúrico concentrado, cloreto de hidrogênio, trifluoreto de boro, cloreto de alumínio, anidrido trifluoroacético, éster polifosfato, óxido de neodímio, dicitlohexilcarbodiimida, bissulfato de grafite, entre outros (SHI et al.,2015).

Entretanto, as desvantagens desse sistema são tempo de reação (8-12 h), baixo rendimento e custo dos catalisadores. Além do mais, o ácido gálico é sensível ao calor e suscetível à oxidação, dessa forma, a síntese enzimática pode ser uma alternativa atraente para a produção de galatos (WEETALL, 1985; SHI et al.,2015).

Porém, como todo processo biotecnológico, esse método também apresenta algumas desvantagens, como baixos rendimentos, elevado tempo de reação e uso dos solventes (SHI et al.,2015), necessitando uma otimização do processo.

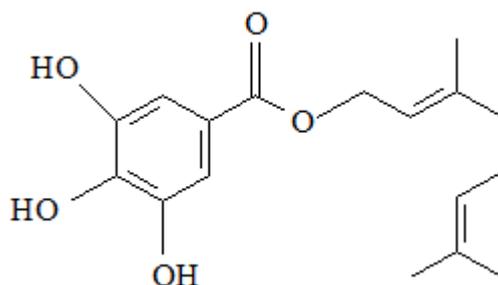
Bouaziz et al. (2010) otimizaram a síntese de galato de propila em sistema livre de solvente e obtiveram a conversão máxima de éster (90%) com 400 IU de lipase imobilizada não comercial obtida de *Staphylococcus xylosus* e temperatura de 52 °C.

Sharma et al. (2015) utilizaram a lipase de *Bacillus licheniformis* SCD11501 imobilizada em celite, em sistema livre de solvente, para a produção de galato de metila, etila, propila e butila, atingindo as taxas de conversões de 58,2; 66,9; 72,1 e 63,8%, respectivamente. O galato de propila foi o éster produzido em maior quantidade (72,1%), conversão esta alcançada na temperatura de 55 °C, concentração de biocatalisador de 1,5% e presença de peneiras moleculares, por 10 h.

3.2.2 Galato de geranila

O galato de geranila (3,4,5-tri-hidroxi benzoato de 3,7-dimetilocta-2,6-dienil) é um composto de fórmula molecular $C_{17}H_{22}O_5$ e peso molecular de 306,358 $g \cdot mol^{-1}$, produzido através da esterificação do ácido gálico com geraniol (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura química do galato de geranila.



Fonte: a autora

Abe, Kashiwagi e Noguchi (2000a) sintetizaram diversos galatos através de catálise ácida, entre eles o galato de geranila, e investigaram a atividade de inibição da esqualeno epoxidase em ratos, enzima relacionada com a biogênese de colesterol e obtiveram uma inibição moderada para galato de geranila.

Os mesmos autores avaliaram a atuação do ácido gálico sobre a mesma enzima e verificaram que este composto não causou inibição da esqualeno epoxidase em ratos (ABE; KASHIWAGI; NOGUCHI, 2000b)

Além disso, essa enzima encontra-se na membrana celular de fungos, e quando inativada deixa de regular a produção de ergosterol, composto fundamental para a manutenção da estrutura da membrana plasmática nesses micro-organismos. Dessa forma, substâncias que inativem essa enzima podem apresentar efeito antifúngico (RYDER, 1991).

O efeito antifúngico do galato de geranila foi evidenciado por Kubo et al. (2002b), onde em testes de atividade antifúngica, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) contra *S. cerevisiae* ATCC 35640 foi de 0,05 mg.mL⁻¹ para ambos os ensaios. O ácido gálico não apresentou atividade antifúngica contra esta cepa (KUBO et al., 1999).

Kubo, Fujita e Nihei (2002) avaliaram a concentração bactericida mínima (CBM) do galato de geranila contra *Salmonella choleraesuis* ATCC 35640, e encontraram o valor de 0,05 mg.mL⁻¹, para o ácido gálico, o valor encontrado foi de 1,6 mg.mL⁻¹.

Kubo et al. (2004) avaliaram a CBM para *Bacillus subtilis* ATCC 9372, e encontraram para o ácido gálico o valor de >3,2 mg.mL⁻¹. Já o galato de geranila apresentou uma CBM de 0,025 mg.mL⁻¹, indicando que a fração hidrofóbica pode afetar esta cepa.

Sugatani et al. (2004) testaram diversos galatos contra o fator ativador de plaquetas (PAF) (1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) em coelhos e encontraram para o galato de geranila o valor de IC_{50} de $6,5 \mu M$, já o ácido gálico não apresentou esta propriedade. O PAF possui propriedades hipotensoras e ulcerogênicas, além de ser responsável por ativar numerosos tipos de células que podem estar envolvidos em processos de inflamação, alergias, entre outros (SUGATANI et al., 2004; RODWELL et al., 2017).

3.2.3 Toxicidade do ácido gálico e seus derivados

O ácido gálico é um componente natural presente de muitos alimentos e bebidas de origem vegetal, sendo que nos Estados Unidos o consumo médio deste composto é de cerca de 1 g por dia (LU et al., 2006).

Segundo Niho et al. (2001), o ácido gálico ingerido em alimentos poderia ser biodegradado no trato gastrointestinal, assim como o ácido tânico e os galatos.

Em relação a toxicidade, o ácido gálico não apresentou potencial mutagênico nas cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 e TA1535 com ou sem ativação metabólica (RASHID et al., 1985; CHEN; CHUNG, 2000).

Dollahite, Pigeon e Camp (1961) não observaram quaisquer efeitos adversos após a administração de uma dose aguda de ácido gálico de 5000 mg.kg^{-1} de peso corporal em ratos.

Os toxicologistas afirmam que qualquer substância que não seja letal quando administrada de forma aguda a uma concentração de 5000 mg.kg^{-1} de peso corporal não apresenta toxicidade (OECD, 1981, ANON, 1985).

O efeito tóxico subcrônico do ácido gálico foi estabelecido por Niho et al. (2001), através da administração oral em ratos F344 por 13 semanas, os efeitos observados foram anemia de provável origem hemolítica e hipertrofia das células do fígado. O NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) do ácido gálico foi estimado pelos autores em 0,2% na dieta sob as condições experimentais em ratos, sendo traduzidos para 119 e 128 mg.kg^{-1} por dia, respectivamente para machos e fêmeas.

Variya et al. (2019) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda (28 dias) do ácido gálico em camundongos albinos, e encontraram a DL_{50} maior do que 2000 mg.kg^{-1} (categoria 5, $DL_{50} > 2000 \text{ mg.kg}^{-1}$), além do mais, o ácido gálico não produziu nenhuma toxicidade significativa relacionada a parâmetros hematológicos, bioquímicos e

adipogênico no estudo de toxicidade subaguda em camundongos. Baseado nos resultados os autores sugerem que a ingestão de ácido gálico não tem nenhuma ação adversa ou toxicidade aguda ou subaguda relacionada à saúde.

Rajalakshmi, Devaraj e Niranjali Devaraj (2001) avaliaram por 28 dias a toxicidade de doses repetidas em camundongos para o ácido gálico, até a dose de 1000 mg.kg⁻¹. Os autores não observaram efeitos adversos em parâmetros hematológicos, bem como nenhuma alteração histológica no coração, fígado, rim, pulmão e cérebro.

No que refere-se a toxicidade dos galatos, Dacre (1974) não observou efeitos tóxicos em camundongos albinos após 90 dias em dietas contendo de 1000-5000 mg.kg⁻¹ de galato de propila.

Suganthi, Muniasamy e Archunan (2018) verificaram a toxicidade de doses repetidas do 7-galato de metila em camundongos durante 28 dias, e não observaram modificações nos parâmetros avaliados na dose de 1000 mg.kg⁻¹.

Orten, Kuyper e Smith (1948) verificaram em camundongos a diminuição da ingestão de alimentos e a inibição do crescimento nos níveis de dose dietética de 11700 mg.kg⁻¹ de galato de propila, porém o mesmo não foi observado em doses menores.

Segundo Van der Heijden, Janssen e Strik (1986), o Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) estabeleceu em 1980 o ingestão diária recomendada (IDR) para o galato de propila, octila e dodecila em 0- 0,2 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Em 1996, o JECFA fez sua última reavaliação de IDR do galato de propila, sendo este definido em 0-1,4 mg.kg⁻¹ de peso corporal, já para o galato de octila e dodecila não foi estabelecido um IDR (JECFA, 1996).

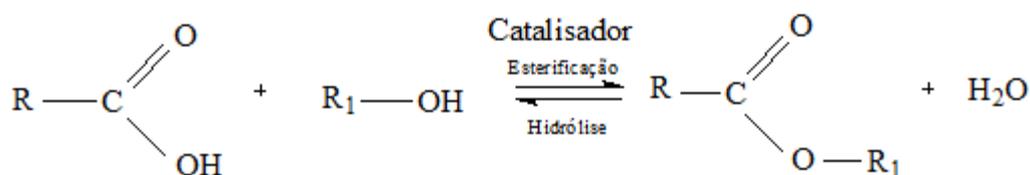
Entretanto, Van der Heijden, Janssen e Strik (1986) afirmam que o galato de propila é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, assim como os galatos de octila e dodecila que são absorvidos e hidrolisados para uma estrutura menor ou igual a do galato de propila.

Segundo Kubo, Fujita e Nihei (2003), após o galato de geranila ser consumido no alimento, este éster seria hidrolisado a ácido gálico e geraniol, que são componentes naturais de plantas.

3.3 Síntese de ésteres

A esterificação é uma reação que ocorre entre um ácido carboxílico livre e um álcool, formando como produto éster e água (SOLOMONS; FRYHLE, 2012), como mostra a Figura 5.

Figura 5 - Reação de esterificação.



Fonte: adaptado de Barzca (2011).

Essa reação é reversível e lenta, sendo necessário a utilização de catalisador e excesso de um dos reagentes, para evitar a reversibilidade da reação e aumentar o rendimento.

Outra forma de deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos é retirando-se a água que vai sendo formada na reação (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; SOLOMONS; FRYHLE, 2012). Segundo Barzca, (2011) a velocidade de reação depende da natureza do o ácido orgânico e álcool utilizado e da temperatura do meio.

A produção de ésteres através da síntese química pode ser realizada por esterificação ou interesterificação (acidólise, alcoólise, glicerólise ou transesterificação) (GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002).

Os principais catalisadores empregados na indústria para acelerar a reação de esterificação são os ácidos de Brønsted, como o sulfúrico (H₂SO₄) e clorídrico (HCl). Entretanto, a utilização de catalisadores químicos esbarra em alguns inconvenientes como a dificuldade na recuperação do catalisador, o alto consumo de energia (200 a 250 °C), a corrosão de equipamentos, a pouca seletividade, o tratamento de resíduos, a possível desidratação dos álcoois e a formação indesejada de subprodutos (OZYILMAZ; GEZER, 2010; CHIARADIA et al., 2011; MARTINS et al., 2011).

A grande procura por tecnologias “limpas” gerada pela crescente preocupação com o impacto ambiental originado pela catálise ácida, impulsiona o uso de biocatalisadores, como as lipases, em síntese orgânica.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3)) pertencem a classe das hidrolases, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis de cadeias longas a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol na interface orgânico-aquosa (CARVALHO et al., 2003; ROESLER; VANZIN; BURKERT, 2017).

Apesar de algumas desvantagens, como a possível inativação da enzima, o custo do solvente, a etapa adicional de remoção do solvente do sistema reacional, tempo de reação algumas vezes prolongado e baixo rendimento, a esterificação com lipases ainda é uma alternativa vantajosa (HALLING, 1994; SABALLY et al., 2005).

Segundo Paroul et al. (2010), as lipases podem substituir os catalisadores químicos de forma bastante eficiente, principalmente quando o produto final depende de uma alta pureza. Além do mais, os bioprocessos catalisados por lipases são muito próximos aos desenvolvidos pela natureza.

Dentre as lipases investigadas para catálise enzimática, a lipase comercial imobilizada Novozym 435 tem sido amplamente utilizada devido às sua quimio-, régio- e enantiosseletividade, estabilidade térmica e capacidade de executar a reação em meios não aquosos (YADAV; KAMBLE, 2018).

A lipase Novozym 435 é usada com sucesso em reações como esterificação, transesterificação, amidação, hidrólise e epoxidação em meios aquosos e não aquosos (SALVI; KAMBLE; YADAV, 2018). Além disso, pode ser empregada em reações de lipofilização de ácidos fenólicos (SOROUR et al., 2012; YANG; GUO; XU, 2012; XU et al., 2018).

Sbardelotto et al. (2018) investigaram a produção de butanoato de geranila a partir de geraniol e ácido butanoico utilizando como catalizador a lipase Novozym 435 e a Novozyme NZL-102-LYO-HQ de *Candida antarctica* B (Cal B) imobilizada em poliuretano, obtendo conversões máximas próximas a 95% de butanoato de geranila para ambas as enzimas.

Yadav e Kamble (2018) empregaram diferentes lipases comerciais, sendo elas Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL IM como catalisadores da conversão de geraniol em éster, e verificaram que a Novozym 435 foi considerada o catalisador mais ativo, atingindo a conversão 96% de acetato de geranila.

3.3.1 Fatores que influenciam a esterificação enzimática

A esterificação enzimática é um processo dependente de diversos fatores, como água presente no meio reacional, temperatura, razão molar dos substratos, concentração de enzima, pH e agitação, bem como a interação entre eles (STERGIOU et al., 2013).

Efeito da atividade de água

A formação de água durante a esterificação é um dos parâmetros mais importantes a ser controlado, pois afeta negativamente o rendimento da reação, entretanto a presença de uma certa quantidade de água é necessária para condicionar o estado tridimensional ativo e manter a atividade do sítio polar da enzima, bem como sua estabilidade (GRAEBIN et al., 2012).

O excesso de água formado pode ser retirado do meio através de adsorção, destilação, agentes secantes e membranas seletivas à água (ROESLER; VANZIN; BURKERT, 2017).

Efeito da temperatura

A temperatura é outro fator que pode influenciar a esterificação enzimática, negativa ou positivamente. De um lado, as altas temperaturas podem prejudicar a estabilidade ou desnaturar a enzima, por isso deve-se levar em consideração a temperatura ótima de trabalho do biocatalisador. Por outro lado, o aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade mútua e melhorar o processo de difusão dos substratos, favorecendo, assim, a transferência de massa e a interação entre a enzima e os substratos (LERIN et al., 2012).

Efeito da razão molar

A razão molar dos substratos também é um parâmetro que pode ser controlado, já que a reação de esterificação é reversível, para contornar este problema, geralmente adiciona-se um dos substratos em maior quantidade, o que pode deslocar o equilíbrio químico, aumentando as taxas de conversão, até certo ponto, quando pode ocorrer o efeito de inibição (VILLENEUVE, 2007).

De acordo com Nordblad e Adlercreutz (2008), o ácido e o álcool inibem as lipases através de mecanismos de inibição competitiva. Os álcoois são capazes de vincular proteínas e induzir sua desidratação, reduzindo a atividade enzimática (SOUZA et al., 2017).

No caso dos ácidos, uma molécula ácida adicional poderia produzir uma interferência com a desacilação da enzima, obstruindo o acesso para o sítio ativo (HARI; KARANTH, 2001). Além do mais, um aumento na concentração do ácido pode levar a um aumento no conteúdo de prótons no sistema, reduzindo a atividade enzimática (NORDBLAD; ADLERCREUTZ, 2008).

Ainda em relação aos substratos, Castro, Oliveira e Soares (1997), verificaram que o tamanho da cadeia dos álcoois influencia significativamente no rendimento da esterificação, sendo que os álcoois primários são mais reativos do que os secundários e terciários. Algumas lipases possuem dois sítios ativos, um para substratos pequenos e outro para substratos grandes (VARMA; MADRAS, 2010). Contudo, moléculas menores difundem-se mais facilmente pelo sítio ativo da enzima (STERGIOU et al., 2013).

Efeito da concentração da enzima

A massa da enzima utilizada na reação é um fator importante para a esterificação enzimática, geralmente observa-se que o aumento da concentração do biocatalisador leva ao aumento na conversão do produto, devido à ampliação da quantidade de sítios ativos no meio reacional (LOPES, 2009).

Segundo Aracil, Garcia e Martinez (1993), a carga enzimática é o efeito mais significativo na reação de esterificação enzimática. Assim, deve-se descobrir a concentração ótima nas reação enzimática, já que as enzimas são o principal componente de custo ligado ao processo.

Efeito do pH

O valor de pH do meio reacional também desempenha um papel importante em reações de esterificação catalisadas por lipase, pois estas quando extraídas de mamíferos tendem a um pH ótimo ácido, enquanto lipases de fontes microbianas exibem pH ótimo alcalino, no entanto estes últimos resultados foram registrados em meio aquoso (KRISHNA; KARANTH, 2002).

Dessa forma é necessário conhecer o pH ótimo da lipase, porém este pode ser alterado na presença e/ou ausência de fatores, como sais, emulsionantes, substratos, etc. (KRISHNA; KARANTH, 2002), e depende ainda dos fatores ligados ao tipo de reação onde a enzima será adicionada, como concentração do substrato, temperatura e tempo de duração da reação (REED, 1975; YEE; AKOH; PHILLIPS, 1997).

Efeito da agitação

Os reagentes empregados muitas vezes são imiscíveis, dessa forma um aumento na agitação pode favorecer a formação de ésteres, devido ao aumento da interação entre os reagentes e o catalisador (OLIVEIRA, 2014).

No caso de enzimas imobilizadas, os reagentes necessitam difundir do líquido a granel para a superfície externa da partícula e então para os poros no interior do catalisador onde a reação ocorre e os produtos são formados (SUN et al., 2013; KUPERKAR et al., 2014).

As limitações da transferência de massa externa podem ser diminuídas com velocidade ideal de agitação, Kuperkar et al. (2014) em seu trabalho de síntese de propionato de isobutila utilizando a lipase imobilizada Novozym 435, verificaram que o houve um aumento na taxa de conversão com o aumentou na faixa de agitação de 100 até 300 rpm, já na agitação de 400 rpm a conversão diminuiu e em uma agitação a partir de 300 rpm por 5 a 6 h a enzima despreendeu-se do suporte, perdendo sua capacidade de reuso.

3.3.2 Biocatálise com solventes orgânicos

O processo de escolha do solvente orgânico é uma etapa importante na esterificação enzimática, pois a atividade da enzima e a conversão do produto podem ser afetadas pelos substratos e solventes utilizados na reação (LERIN et al., 2011).

O solvente orgânico deve dissolver completamente os substratos sem afetar a atividade da enzima. O coeficiente de partição do solvente (Log P) é frequentemente utilizado para definir o solvente utilizado, geralmente, os solventes com Log P < 2 não são indicados para biocatálises (CHEN, 1996), os solventes com Log P entre 2 e 4, menos hidrofílicos, interagem fracamente com o sistema água-biocatalisador, sendo sua estrutura afetada de maneira imprevisível, já os solventes com Log P superior a 4 são

hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, assim o biocatalisador tende a permanecer no seu estado ativo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os solventes mais utilizados em reações de esterificação são heptano, hexano, álcool etílico, álcool *terc*-butílico, dimetilsufóxido, acetona, acetonitrila, entre outros. O ácido gálico é uma substância polar, dessa forma dissolve-se bem em solventes polares, como dimetilsufóxido (DMSO), álcool etílico e álcool *terc*-butílico.

Entretando, apesar de ser um bom solvente, a utilização do DMSO apresenta inconvenientes, como dificuldade na separação do produto do solvente, devido a sua temperatura de ebulição de 189 °C, e sua alta hidrofiliabilidade, que leva a um aumento da quantidade de água no sistema, não desejável para a síntese de ésteres (BALEN, 2016). Já o álcool etílico trata-se de um álcool primário (BALEN et al., 2015), que pode competir com o geraniol na reação de esterificação com o ácido gálico.

O álcool *terc*-butílico é um álcool terciário que apresenta uma temperatura de ebulição de 82,2 °C, permitindo que seja utilizado em reações com uma temperatura mais elevada (BALEN, 2016). Além disso, os álcoois terciários, devido ao impedimento estérico, não reagem com o biocatalisador e com o substrato, possuem um baixo efeito de desativação na enzima e sua remoção ao final da reação é geralmente fácil (VILLENEUVE, 2007).

A reação de síntese enzimática entre ácido gálico e geraniol, devido a diferença de polaridade, necessita de um solvente orgânico que atenda todas estas exigências para que ocorra a solubilização dos substratos e torne possível a reação, o álcool *terc*-butílico atende aos requisitos e seu uso é constantemente relatado na literatura.

Lerin et al. (2012), em seu trabalho sobre a conversão de palmitato de ascorbila, encontrou melhores resultados de rendimento empregando o álcool *terc*-butílico (log P = 0,80).

Balen et al. (2015) avaliaram diversos solventes para a reação de esterificação de oleato de ascorbila com a enzima Novozym 435, e verificaram que o álcool *terc*-butílico foi o solvente mais adequado para a reação.

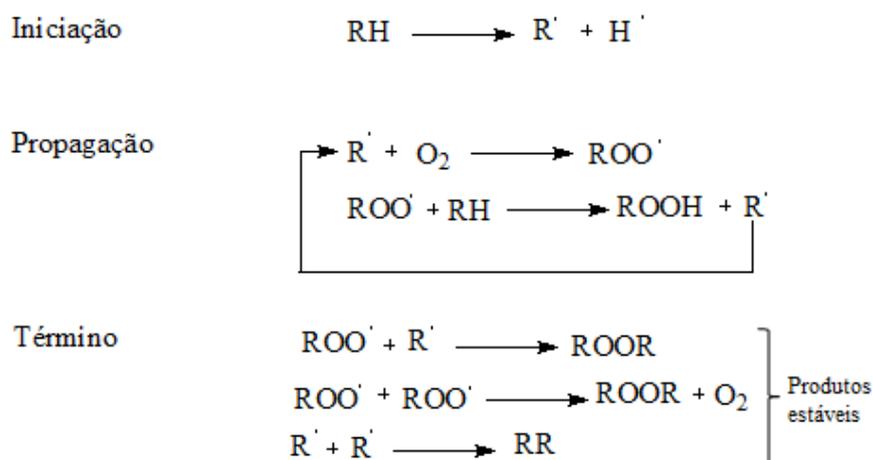
3.4 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é um dos principais processos responsáveis pela deterioração de alimentos com alto teor de gordura, gerando perda significativa de sabor, cor, textura e nutrientes (SHEN et al., 2018).

Os mecanismos de oxidação de lipídios, segundo Ramalho e Jorge (2006), são:

- Reações hidrolíticas, catalisadas por lipases ou pela ação de altas temperaturas e umidade, gerando ácidos graxos livres;
- Oxidação enzimática, onde as lipoxigenases levam à formação de peróxidos e hidroperóxidos;
- Foto-oxidação, promovida pela radiação ultravioleta na presença de fotossensibilizadores;
- Auto-oxidação, reação com o oxigênio molecular e ácidos graxos insaturados presentes nos lipídios via mecanismo autocatalítico, formado por três etapas, iniciação, propagação e terminação, como pode ser observado na Figura 6, sendo o mecanismo mais comum de oxidação em óleos e gorduras.

Figura 6 – Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica.



Onde: RH – ácido graxo insaturado; R• - radical livre; ROO• - radical peróxido e ROOH – hidroperóxido.

Fonte: adaptado de Ramalho e Jorge (2006).

A primeira fase, chamada de iniciação, ocorre a partir da retirada de um átomo de hidrogênio do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, gerando um radical livre. Essa fase é favorecida em condições de temperaturas elevadas, presença de catalizadores metálicos, espécies reativas de oxigênio e exposição a luz.

Na fase seguinte, a propagação, há o início de uma reação em cadeia de radicais livres, provocada pelo alto consumo de oxigênio atmosférico, dando origem a produtos primários de oxidação e alterações de aroma e sabor.

Na terminação ocorre o fim da propagação da reação, neste caso, dois radicais livres combinam-se entre si, formando substâncias estáveis (ANDREO; JORGE, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006; O'BRIEN; O'CONNOR, 2016.).

Os principais métodos para evitar a auto-oxidação e prolongar a vida de prateleira dos alimentos são a refrigeração, a ausência de luz e oxigênio e a utilização de pequenas quantidades de antioxidantes (ORDÓÑEZ, 2005; SHEN et al., 2018).

3.5 Antioxidante

A formação das espécies reativas ocorre através do processo respiratório e das diversas reações oxidativas que ocorrem em sistemas biológicos aeróbicos (SILVA et al., 2010), sendo classificadas em: espécies reativas de oxigênio (radicais livres e não radicais), complexos de metais de transição, radicais de carbono e espécies reativas de nitrogênio (SOARES, 2002).

Para proteger-se do ataque dos radicais o organismo desenvolveu o sistema de defesa antioxidante, responsável por neutralizar os radicais livres através dos sistemas enzimático e não-enzimático (SILVA et al., 2010).

O sistema enzimático bloqueia a iniciação da oxidação através da remoção dos radicais livres por enzimas, como superóxido dismutase, catalase, peroxidases, glutathione peroxidase e glutathione reductase. Já no sistema não-enzimático os agentes antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos, doam um elétron ou hidrogênio para o radical livre, tornando a molécula estável, da mesma forma após a perda do elétron ou hidrogênio a substância antioxidante torna-se inerte (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; BARBOSA et al., 2010; SILVA et al., 2010; SARANGARAJAN et al., 2017).

Em relação ao seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser divididos em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em produtos estáveis. Já os secundários retardam a etapa de iniciação da auto-oxidação por meio de diferentes mecanismos, entre eles, complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998; ANGELO; JORGE, 2007).

No entanto, quando há um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e as espécies reativas podem ocorrer efeitos prejudiciais ao organismo, pois ao atingir biomoléculas, como DNA, RNA, proteínas e lipídios, os radicais livres causam danos que podem condicionar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, inflamatórias, imunológicas e neurológicas, além de câncer e aceleração do processo de envelhecimento (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; MELO et al., 2011; SARANGARAJAN et al., 2017).

Em alimentos, a reação de oxidação de lipídios é um processo complexo que envolve uma grande variedade de radicais livres, sendo bastante influenciado por fatores, como temperatura, luz, oxigênio, constituição físico-química do produto, presença de possíveis iniciadores e catalisadores da reação, entre outros, que geram alterações sensoriais, como rancificação, aromas indesejáveis e formação de compostos tóxicos, além de perdas nutricionais devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais (RAMALHO; JORGE, 2006).

O papel dos antioxidantes, nesse caso, é o de retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou de outras moléculas que alterem a qualidade sensorial, proporcionando uma maior vida-de-prateleira ao alimento (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SILVA et al., 2010).

Entretanto, para serem empregados na industrialmente os antioxidantes devem apresentar algumas características, dentre elas: serem eficientes em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), não afetarem as propriedades organolépticas do produto (cor, sabor e odor), serem estáveis durante o processo e armazenagem, serem compatíveis com o produto e fáceis de aplicar, não apresentarem toxicidade, serem permitidos pela legislação e deve-se levar em conta, ainda, o custo e a preferência do consumidor por aditivos naturais (BAILEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes mais utilizados pela indústria de alimentos são o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), o galato de propila (PG) e os tocoferóis (NAMIKI, 1990; RAMALHO; JORGE, 2006).

Porém destes, somente os tocoferóis são obtidos de fontes naturais, dessa forma, faz-se necessária a investigação de novos agentes com potencial antioxidante. Alguns ácidos fenólicos, como ácidos protocatequínico, caféico, ferúlico, gálico e sinápico, mostram-se como eficientes antioxidantes em sistema lipídico, apesar da baixa solubilidade nesse sistema, que limita industrialmente sua utilização como antioxidante (DZIEDZIC; HUDSON, 1984; PRATT, 1992; SOARES, 2002).

Segundo Reische, Lillard e Eitenmiller (1998), os ésteres de ácido gálico agem em sinergismo com antioxidantes primários e com alguns secundários, porém são termosensíveis e tendem a formar complexos com íons de ferro presentes em alimentos, produzindo coloração escuro-azulada, o que pode ser evitado empregando-se quelantes de metais (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

4 METODOLOGIA

A seguir serão descritos os materiais e procedimentos experimentais, bem como a metodologia analítica utilizada para o desenvolvimento do estudo da produção de ésteres a partir de ácido gálico e geraniol via esterificação enzimática com o uso de solvente, utilizando como biocatalisador a lipase comercial imobilizada Novozym 435 e posteriores análises biológicas e atividade antioxidante dos substratos e do produto.

4.1 Materiais

4.1.1 Enzima

A enzima utilizada como biocatalisador foi a lipase comercial Novozym 435 (Novozymes Brasil/Araucária/PR), obtida a partir da lipase de *Candida antarctica*, produzida por fermentação submersa e imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica. Como característica apresenta formato em esfera, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 kg.m^{-3} e conteúdo de água entre 1 e 2%. A lipase Novozym 435 é termoestável, com faixa ótima de atividade na faixa de temperatura de 40 a 70 °C e possui ainda, ampla especificidade de substrato para promover uma reação entre álcoois primários ou secundários e ácidos carboxílicos (NOVO NORDISK, 1992).

4.1.2 Substratos

Os substratos utilizados na reação enzimática foram o geraniol ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich[®]) e o ácido gálico ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich[®]).

4.1.3 Solventes e reagentes para análises químicas

Álcool etílico (99,9%, Merck[®]), ácido oleico (Sigma-Aldrich[®]), acetona (99,5%, Dinâmica), hidróxido de sódio (Vetec), n-hexano (95%, Dinâmica), álcool *terc*-butílico (99%, Merck), clorofórmio (99,8%, Vetec), acetato de etila (99,5%, Proton), ácido acético glacial (99,7%, Dinâmica), metanol (Dinâmica; 99,5%), diclorometano (99,5%, Dinâmica), éter etílico (96%, Nuclear), n-propanol (99,5%, Vetec), cloreto férrico

(Dinâmica), cromatofolhas (Merck, AL TCL 20x20 cm Silicagel 60 F₂₅₄), sílica gel 60 F₂₅₄ (Fluka) e óleo de soja (Soya).

4.1.4 Solventes e reagentes para análises biológicas e antioxidante

Álcool etílico (99,8%, Êxodo), 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH^{*}) (Sigma-Aldrich[®]), potato dextrose agar (PDA) (Himedia[®]), potato dextrose broth (PD) (Himedia[®]), triptona (Himedia), extrato de levedura (Fluka), cloreto de sódio (Dinâmica), ácido ascórbico (Química Moderna), butil-hidroxitolueno (BHT) (Synth), dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9%, Vetec), bicarbonato de sódio (Synth), sal marinho (Salazar), cistos de *A. salina* (Aqua Plant) e Tween 80 (Dinâmica).

4.2 Métodos experimentais

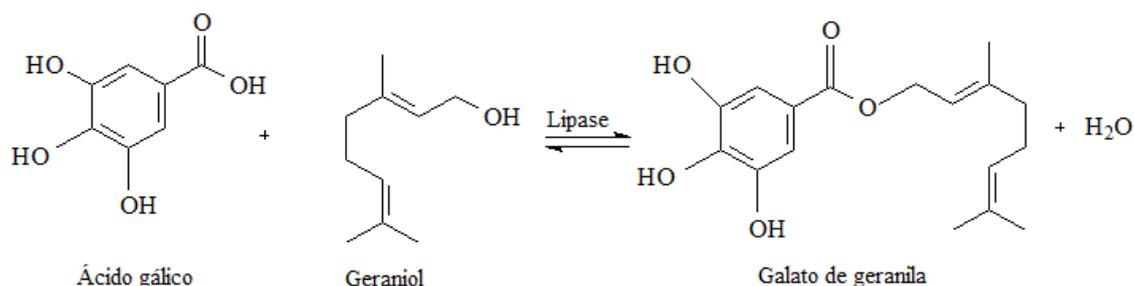
4.2.1 Avaliação do efeito solvente sobre a atividade da enzima

A avaliação da ação do solvente sobre a atividade enzimática foi realizada com a enzima antes e após ser submetida ao contato com o solvente (álcool *terc*-butílico). Para tanto, pesou-se em um Erlenmayer (50 mL) 0,1 g de enzima pré-ativada (50 °C/30 minutos) em estufa (Nevoni, nv – 1.3) e adicionou-se 10 mL de solvente. Em seguida, o Erlenmayer foi colocado em agitador orbital (Servilab, SE 1208) a 70 °C e 125 rpm, por 2, 24 e 48 h. Após, a enzima foi retirada do meio por filtração com papel filtro, lavada à vácuo com 10 mL (2x) n-hexano, seca em estufa 50°C por 30 minutos e colocada em dessecador por 24 h, antes da determinação da atividade enzimática (item 4.4.1). Os testes foram realizados em triplicata e as médias analisadas pelo Teste de Tukey (p<0,05) no programa Statistica[®] 5.0 (Statsoft Inc., EUA).

4.2.2 Estudo da síntese enzimática de galato de geranila

A produção de galato de geranila foi realizada preparando-se uma mistura reacional formada por geraniol e ácido gálico (Figura 7).

Figura 7 - Reação de esterificação de ácido gálico e geraniol.



Fonte: a autora.

Para o teste preliminar de síntese de galato de geranila, os substratos foram adicionados em Erlenmeyers de 25 mL em diferentes razões molares (1:3 e 1:6, ácido:álcool) totalizando a massa reacional de 5 g e acrescentando-se o volume mínimo necessário para solubilização dos substratos que foi de 30 mL de álcool *terc*-butílico. A mistura foi aquecida em 70 °C durante 5 minutos, sob agitação constante até a solubilização dos substratos. Após a dissolução total dos substratos a lipase comercial imobilizada Novozym 435 foi adicionada na concentração de 10% (m/m substratos) e o tempo reacional foi contado a partir da adição desta.

Os experimentos foram realizados em agitador orbital (Servilab, SE 1208) com agitação constante de 125 rpm na temperatura de 70 °C.

Após o término da reação, que para os testes foi estipulado em 2 h, determinou-se a conversão conforme especificado no item 4.4.3, a lipase foi filtrada com papel filtro e o álcool *terc*-butílico foi concentrado em evaporador rotativo à vácuo (Marconi, MA 120). Todas as amostras foram mantidas na geladeira, para posterior análise.

4.2.2.1 Estudo cinético da síntese enzimática de galato de geranila

A cinética com amostras destrutivas foi realizada com 30 mL de álcool *terc*-butílico, concentração de enzima de 10% (m/m substratos), temperatura de 70 °C, agitação de 125 rpm e razão molar 1:6 (ácido:álcool) nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 36 e 48 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.2.2 Estudo da influência da temperatura

Em relação a temperatura, testou-se 60, 70 e 80 °C, com 30 mL de álcool *terc*-butílico, concentração de enzima de 10% (m/m substratos), agitação de 125 rpm, razão molar 1:6 (ácido:álcool) e tempo de 2 e 4 h, pois nos testes preliminares observou-se que em 2 h obtinha-se o maior valor de conversão, porém a fim de verificar se havia aumento na conversão após a modificação nas demais condições estendeu-se os testes também para o tempo de 4 h. Todos os ensaios foram em triplicata e destrutivos.

4.2.2.3 Estudo da influência da razão molar

Diferentes razões molares foram avaliadas, sendo elas, 6:1, 3:1, 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12 (ácido:álcool), nas condições de 30 mL de álcool *terc*-butílico, concentração de enzima de 10% (m/m substratos), temperatura de 70 °C e agitação de 125 rpm durante 2 e 4 h, da mesma forma que o estudo da influência da temperatura. Todos os ensaios foram em triplicata e destrutivos.

4.2.2.4 Estudo da influência da concentração de enzima

A fim de avaliar a concentração da enzima foram realizadas amostras destrutivas e em triplicata na razão molar de 1:6 (ácido:álcool), com 30 mL de álcool *terc*-butílico, na temperatura de 70 °C, agitação de 125 rpm e concentrações de enzima de 1, 5, 10 e 20% (m/m), no tempo de 2 h. Foi realizado também um ensaio sem enzima nas mesmas condições reacionais, também no tempo de 2 h para verificar se havia alguma conversão sem a presença do biocatalisador.

4.3 Isolamento do produto

Após o término da reação, realizou-se a separação da enzima por filtração e o excesso do ácido gálico foi retirado por filtração depois da extração líquido/líquido com clorofórmio. O procedimento de isolamento do produto formado foi realizado por meio da cromatografia em coluna (CC). A coluna foi empacotada com sílica gel 60 F₂₅₄ e n-hexano, após a adição da amostra (2 mL), a fase móvel, composta de acetato de etila e n-hexano nas proporções de 1:9; 2:8; 3:7 e 1:1 (v/v), acidificada com 2% de ácido acético

glacial (BALEN, 2016), foi eluída, partindo-se da proporção mais apolar para a mais polar. As frações foram coletadas de 10 em 10 mL e foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD), para confirmação da separação do excesso dos componentes da mistura reacional do produto.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação da atividade de esterificação enzimática

A atividade de esterificação da lipase foi quantificada através da reação de síntese de oleato de etila a partir de álcool etílico e ácido oleico (razão molar 1:1 (m/m)). A metodologia foi baseada em Ferraz et al. (2015), com modificação na razão molar. Os frascos com os substratos foram colocados em um agitador orbital (New Brunswick, Excella E25R) a 160 rpm, 40 °C e 10 minutos. Após, retirou-se 5 mL da mistura dos substratos e adicionou-se aproximadamente 0,1 g de enzima ao meio reacional. Um ensaio em branco (sem enzima) foi realizado para determinar a acidez do meio reacional. A reação, assim como o branco, foi conduzida em frascos de vidro fechados e mantidos em agitador orbital nas condições já descritas de agitação e temperatura por 40 minutos. Em seguida, alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata, as quais foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1; v/v), para interromper a reação.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M até pH 11, com auxílio de um pHmetro (Digimed, DM-22). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de ácido oleico (µmol) convertido para cada grama de enzima por minuto, nas condições do ensaio, sendo expressa como unidade por grama de substrato (U.g⁻¹) (RIGO et al., 2010). A atividade enzimática foi calculada a partir da Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) * M * 1000 * V_f}{t * MEL * V_c} \quad (1)$$

Onde:

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

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL);

V_b : volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

M : molaridade da solução de NaOH;

V_f : volume final de meio reacional (mL);

t : tempo (minutos);

MEL : massa da enzima utilizada na reação (g);

V_c : volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Os testes foram realizados em triplicata e as médias analisadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa Statistica® 5.0 (Statsoft Inc., EUA).

4.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para verificar a formação do novo composto foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD), baseada em metodologia descrita por Wagner, Bladt e Zgainski (1984). Para a fase estacionária foram empregadas cromatofolhas e a fase móvel foi constituída por clorofórmio:metanol:n-propanol:água destilada (25:30:5:20; v/v). Os padrões do ácido gálico ($0,01 \text{ g.mL}^{-1}$ em metanol) e do geraniol, assim como a mistura reacional antes da reação (branco), a reação sem o excesso de ácido gálico, a fração cristalina separada da reação ($0,01 \text{ g.mL}^{-1}$ em metanol) e o produto obtido após a CC foram aplicados sobre a fase estacionária. A revelação foi realizada por nebulização com solução de cloreto férrico 1% em metanol. Os cálculos dos Fatores de Retenção (R_f) foram realizado através da Equação 2.

$$R_f = \left(\frac{d_a}{d_s} \right) \quad (2)$$

Onde:

d_a = distância percorrida pela amostra;

d_s = distância percorrida pelo solvente.

4.4.3 Determinação do rendimento da reação

O rendimento da reação foi determinado por titulação do ácido gálico residual baseado na metodologia de Roesler, Vanzin e Burkert (2017), com modificações na quantidade da alíquota, solução extingente e solução titulante. Uma alíquota de 0,5 mL

do meio reacional foi diluída em 10 mL de acetona e titulada com uma solução previamente padronizada de NaOH 0,0496 N, até pH 9,25 (Âpendice A), onde observava-se próximo ao ponto de neutralização que a solução mudava de incolor para uma coloração laranja claro. A determinação do percentual de ácido carboxílico foi realizada a partir da Equação 3 (AOCS, 1998).

$$C = \frac{V \cdot N \cdot M}{10 \cdot W} \quad (3)$$

Onde:

C = percentual de ácido carboxílico;

V = volume (mL) de NaOH gasto na titulação;

N = normalidade do NaOH;

M = massa molar do ácido carboxílico;

W = massa (g) correspondente a 0,5 mL de amostra retirada para titulação

O percentual de esterificação corresponde ao percentual do ácido consumido, conforme Equação 4 (OLIVEIRA et al., 2000).

$$\% \text{ esterificação} = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100 \quad (4)$$

C_0 = concentração inicial do ácido gálico residual livre, no tempo 0 h;

C = concentração do ácido gálico residual livre em um determinado tempo de reação.

4.5 Determinação da lipossolubilidade

A solubilidade do éster foi comparada com a do ácido gálico através da solubilização em diferentes solventes orgânicos n-hexano, diclorometano, éter etílico e clorofórmio, bem como em óleo de soja.

Para esta análise pesou-se 1 mg do produto ou do ácido gálico e diluiu-se com volumes crescentes de solventes orgânicos, partindo de 50 µL até 25 mL. Cada solução foi agitada manualmente e levada ao banho de ultrassom (Unique, USC 1800A) por 15 minutos, sendo após agitada em aparelho Vortex (Phoenix, AP 56) por 2 minutos e mantida em repouso por 1 h. Após, verificou-se a solubilização das amostras em cada

condição, através de observação visual, sendo considerados solúveis aquelas que apresentaram uma solução límpida, sem observação de solutos precipitados (BRUHN, 2018). Os valores foram transformados em $\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$.

4.6 Atividades biológicas e antioxidante

4.6.1 Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi testada sobre os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium crustosum*, obtidos junto ao Agricultural Research Service (ARS Culture Collection - NRRL).

As diluições do ácido gálico, do geraniol e do produto foram realizadas em água destilada estéril com 1% de Tween 80, nas concentrações de (50; 37,5; 25; 12,5; 5; 2,5; 1,5; 0,5 e 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo agitadas por 5 minutos em aparelho Vortex (Phoenix, AP 56) antes da sua utilização (LAUXEN, 2012).

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica das amostras foram realizados pelo método de difusão em meio sólido utilizando cavidades em placa (HADACECK; GREGER, 2000).

Em um erlenmayer com meio Potato Dextrose Agar (PDA) fundido e resfriado a 40-45 °C adicionou-se 1 mL de suspensão fúngica (aproximadamente $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$), crescida em meio PD (Potato Dextrose Broth), e plaqueou-se. Após a solidificação do ágar, foram feitas quatro cavidades com cânulas de vidro estéreis (6 mm de diâmetro) onde foi depositado 50 μL da solução com amostra na concentração desejada, 50 μL de Tween 80, utilizado como controle negativo, 50 μL de água estéril (controle negativo) e 50 μL de antifúngico comercial Canesten[®] 1% como controle positivo. Em seguida, incubou-se o sistema por 72 h a 28 °C em estufa (Tecnal, TE 392/2), sendo verificado a cada 24 h (LAUXEN, 2012).

Após término do período de incubação, foi medido o diâmetro total do halo e considerou-se como CIM a concentração de amostra capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 10 mm de diâmetro (LIMA et al., 2006). Os resultados foram expressos em milímetros pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições de cada fungo. A comparação das médias para avaliar o efeito antifúngico foi realizada através do Teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa SAS.

4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Para os testes de concentração inibitória mínima (CIM) dos substratos e produto foram selecionados dez micro-organismos, cinco bactérias Gram-positivas, *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. mutans* (ATCC 25175), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *S. aureus* (ATCC 25923) e cinco bactérias Gram-negativas, *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 10031), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. flexneri* (ATCC 12022) e *S. choleraesuis* (ATCC 10708), obtidas da American Type Culture Collection (USA). As cepas foram crescidas previamente em meio Luria Bertani (LB) (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl) durante 24 h a 36±1 °C em estufa bacteriológica (J.PROLAB, JP 101). Após esse período a suspensão bacteriana correspondia a aproximadamente 10⁸ células.mL⁻¹.

O teste consistiu em microdiluições seriadas com caldo LB em microplacas de ELISA até a obtenção das concentrações desejadas. Em seguida inoculou-se 10 µL de bactéria, efetuou-se a leitura (0 h) em leitor de microplaca ELISA (Bio Tek Instruments, EL 800), no comprimento de onda de 490 nm, e incubou-se a placa por 24 h a 36 ± 1 °C em estufa bacteriológica. Após esse período realizou-se a leitura (24 h) da microplaca em leitor microplaca ELISA e averiguou-se a diferença da densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano após 24 h de incubação (GAIO et al., 2015). A CIM foi definida como a menor concentração de amostra em mg.mL⁻¹, capaz de inibir o crescimento microbiano. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.6.3 Avaliação de toxicidade frente à *A. salina*

A metodologia utilizada para o ensaio de toxicidade sobre *A. salina* foi baseada na metodologia de Meyer et al. (1982), com modificações na solução salina de cultivo, no tempo de eclosão e na quantidade de náuplios utilizados em cada teste. Primeiramente preparou-se uma solução salina artificial com sal marinho comercial na concentração de 10 g.L⁻¹ e 0,7 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio. Esta solução foi utilizada na eclosão dos cistos de *A. salina* e para as diluições das amostras. Os cistos de *A. salina* foram pesados (0,1 g) e mantidos em 500 mL de solução salina por 24 h sob aeração constante e temperatura de 24 °C em incubadora BOD (CienLab, CE-300/350-FA) (PIASSÃO, 2018).

O preparo das diluições das amostras foi realizado a partir de uma solução “mãe” na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, formada por amostra e solução salina, e no caso do éster e do geraniol adicionou-se 2% de dimetilsulfóxido (DMSO). Desta solução retirou-se alíquotas que originaram as diluições utilizadas nos testes de toxicidade. As concentrações testadas para o geraniol variaram de 1 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para o ácido gálico de 100 a $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 10 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o éster.

Após, adicionou-se nas placas de Petri, 20 mL da diluição e aproximadamente 50 náuplios de *A. salina*, os testes foram realizados em triplicata. Durante os testes os náuplios não receberam alimento, pois estes podem sobreviver por até 48 h alimentando-se de sua vesícula vitelina. De qualquer forma um experimento controle com solução salina e outro com uma solução de 2% de DMSO foram realizados a fim de observar se estas condições poderiam causar alguma influência na mortalidade dos náuplios (CARBALLO et al., 2002).

A contagem dos náuplios vivos e mortos foi realizada após 24 h, considerando vivos aqueles que apresentavam motilidade. Frente aos resultados de mortalidade dos náuplios de *A. salina* em relação à concentração das amostras, construiu-se um gráfico e a partir da equação da reta calculou-se a dose letal de amostra para 50% da população (DL_{50}).

4.6.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH*

A metodologia da atividade antioxidante foi fundamentada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH*) em 515 nm (SILVESTRI et al., 2005). A determinação da atividade antioxidante dos substratos e do produto foi realizada em triplicata, em equipamento espectrofotômetro UV-Visível (Pró-Análise®, UV-1600). A técnica constituiu na incubação por 10 minutos, de 500 μL de uma solução etanólica de DPPH* 0,1 mM com 500 μL de soluções contendo concentrações crescentes de amostra diluídas em álcool etílico. A solução controle foi obtida com 500 μL da solução de DPPH* e 500 μL de álcool etílico. Para o “branco” foi utilizado somente álcool etílico. Determinou-se também a atividade antioxidante do ácido ascórbico e do butil-hidroxitolueno (BHT), a fim de comparar a atividade antioxidante. A atividade de captura de radicais pelas amostras foi expressa como percentual de inibição de DPPH* e calculada a partir da Equação 5.

$$AA\% = \frac{100 - [(Abs.amostra - Abs.branco) * 100]}{Abs.controle} \quad (5)$$

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração de amostra necessária para capturar 50% do radical livre DPPH^{*} (IC₅₀) por análise de regressão linear (NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes a síntese enzimática de galato de geranila e as atividades antioxidante e biológicas dos substratos e do produto.

5.1 Efeito do solvente sobre a atividade de esterificação da enzima

O ácido gálico e o geraniol possuem polaridade bastante distinta, dessa forma é necessário escolher um solvente adequado para a solubilização dos substratos permitindo assim que a enzima catalise a reação de forma mais eficiente.

O álcool *tert*-butílico foi relatado em diversos estudos como solvente para reações de esterificação de substratos imiscíveis, como ácido ascórbico e ácido palmítico (LERIN et al., 2011; SANTIBÁÑEZ; WILSON; ILLANES, 2014), ácido ascórbico e ácido oleico (MORENO-PEREZ et al., 2013; BALEN et al., 2015) e ácido ascórbico e ácido linoleico (BALEN et al., 2017).

Os experimentos foram conduzidos com este solvente, pois trata-se de um álcool terciário pouco reativo (BALEN et al., 2015), com temperatura de ebulição de 82,2 °C, o que permite a realização da reação de esterificação sem a perda do solvente por evaporação, e posteriormente facilita sua eliminação através da etapa de evaporação à vácuo.

Entretanto, além dessas características, o solvente adequado deve afetar o menos possível a atividade da enzima (VILLENEUVE, 2007). O efeito do álcool *tert*-butílico sobre a atividade da lipase Novozym 435 está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade de esterificação da lipase Novozym 435 submetida ao tratamento com o solvente álcool *tert*-butílico.

	Atividade enzimática (U.g ⁻¹)	Atividade residual (%)
Sem tratamento	2826,2 ^a ± 57,3	100
2h	2721,8 ^a ± 53,2	96,3
24h	2706,9 ^a ± 50,7	99,5
48h	2645,8 ^a ± 52,9	97,7

*Valor médio ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa (p<0,05).

A atividade enzimática da lipase Novozym 435 sem tratamento com solvente foi de 2826,2 U.g⁻¹, não diferindo significativamente (p<0,05) dos demais tratamentos com

contato com solvente pelos tempos de 2, 24 e 48 h, que apresentaram valores de 2721,8, 2706,9 e 2645,8 U.g⁻¹, respectivamente.

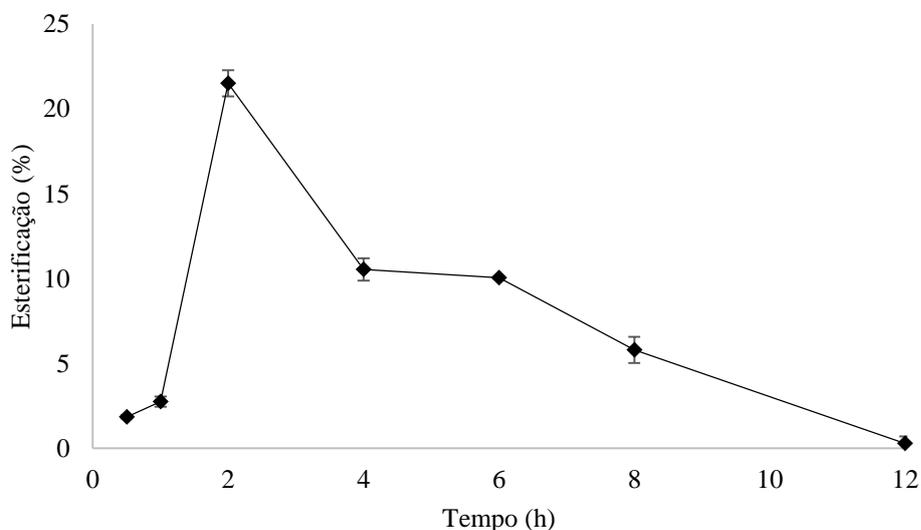
A redução da atividade enzimática do tratamento com solvente por 2, 24 e 48 h em relação a atividade inicial da enzima foi de 3,7, 4,2 e 6,4%, respectivamente. Como pode-se observar o álcool *terc*-butílico além de solubilizar os substratos, interfere pouco na atividade da enzima, mesmo após 48 h de operação.

5.2 Síntese enzimática de galato de geranila

A partir dos resultados do teste preliminar de reação de esterificação do ácido gálico e geraniol com razão molar 1:3 e 1:6 (ácido:álcool), temperatura de 70 °C, 10% (m/m substratos) de enzima, 125 rpm de agitação e tempo de reação de 2 h, verificou-se que não houve consumo de ácido gálico na titulação com hidróxido de sódio na razão molar 1:3 (ácido:álcool), já a reação com a razão molar 1:6 (ácido:álcool) houve conversão de 21,5%.

Após realizou-se ensaios para verificar o tempo de reação necessário para a maior produção de galato de geranila, sendo este verificado nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), concentração da enzima 10% (m/m substratos), 30 mL de álcool *terc*-butílico, temperatura de 70 °C e agitação de 125 rpm. A cinética de síntese de galato de geranila está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Conversão de galato de geranila ao longo do tempo com razão molar 1:6 (ácido:álcool), 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima, 125 rpm e temperatura de 70 °C.



A conversão máxima de galato de geranila (21,5%) foi obtida no tempo de 2 h, após houve um decréscimo da conversão, não havendo conversão após 12 h de reação, que pode ser devido a formação de água durante a reação de esterificação. Dessa forma, a formação de água é um parâmetro a ser controlado, necessitando de um estudo para definir a concentração de peneira molecular necessária para retirar a água, evitando a reação de hidrólise.

A fim de verificar a influência de alguns parâmetros sobre a taxa de conversão de galato de geranila, realizou-se ensaios com diferentes temperaturas, razões molares e concentrações de enzima.

A temperatura ótima da lipase Novozym 435, segundo o fabricante, é 70 °C (NOVO NORDISK, 1992), assim determinou-se a faixa de temperatura entre 60 e 80 °C, os resultados estão apresentados na Tabela 2. As demais condições foram fixadas em: razão molar 1:6 (ácido:álcool), 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de lipase e 125 rpm de agitação. O tempo de reação foi determinado em 2 e 4 h, sendo 2 h o melhor tempo encontrado para a cinética reacional e realizou-se também reações no tempo de 4 h para verificar o possível aumento da conversão nas novas condições.

Tabela 2 – Influência da temperatura na conversão de galato de geranila nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima e 125 rpm.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão (%)
60	2	12,0±1,9
60	4	8,3±0,3
70	2	21,5±0,8
70	4	11,7±0,6
80	2	15,2±0,1
80	4	5,6±0,1

Para a temperatura de 60 °C o tempo de 2 h gerou uma conversão de 12% e de 8,3% para 4 h de reação. Já na temperatura de 70 °C, em 2 h houve uma conversão de 21,5%, porém o tempo de 4 h gerou aproximadamente a metade da conversão (11,7%).

Na temperatura de 80 °C em 2 h ocorreu uma diminuição da conversão em comparação ao resultado obtido no tempo de 2 h para a temperatura de 70 °C, podendo ser atribuído ao início da inativação da enzima pela temperatura. A lipase comercial imobilizada Novozym 435 é uma enzima termotolerante, porém acima da sua temperatura ótima (70 °C) a enzima pode ser desnaturada com o passar do tempo (KUPERKAR et al., 2014).

Para verificar o efeito de diferentes razões molares na conversão de galato de geranila, fixou-se a temperatura em 70 °C, o solvente em 30 mL, a concentração de lipase em 10% (m/m substratos), a agitação de 125 rpm e o tempo em 2 e 4 h. Os resultados para as razões molares 1:6, 1:9 e 1:12 estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Influência da razão molar sobre a conversão de galato de geranila nas condições fixas de 70 °C, 30 mL de solvente, 10% (m/m substratos) de enzima e 125 rpm.

Razão molar (ácido:álcool)	Tempo (h)	Conversão (%)
3:1	2	0
3:1	4	0
6:1	2	0
6:1	4	0
1:6	2	21,9±0,1
1:6	4	11,5±0,1
1:9	2	11,5±0,0
1:9	4	12,2±2,0
1:12	2	14,5±0,7
1:12	4	12,7±1,3

As razões molares com excesso de ácido gálico (3:1 e 6:1) (ácido:álcool) não apresentaram conversão pelo teste de titulação com hidróxido de sódio. Segundo Sá et al. (2017), altas concentrações de ácido podem inibir ou causar uma redução na atividade catalítica da enzima, dessa forma, recomenda-se o uso em excesso do álcool.

Porém, a razão molar de 1:12 (ácido:álcool) gerou uma conversão menor que a razão molar de 1:6 (ácido:álcool), esse grande aumento na quantidade de álcool pode causar um efeito contrário, diminuindo a conversão devido a interação com a camada de água presente na superfície da enzima, provocando alterações na estrutura proteica da enzima e resultando em inibição e redução da atividade enzimática (SÁ et al., 2017).

A Tabela 4 apresenta os resultados da conversão de galato de geranila utilizando diferentes concentrações da lipase Novozym 435, nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), temperatura 70 °C, 30 mL de solvente e agitação constante em agitador orbital de 125 rpm por 2 h.

Tabela 4 – Influência da concentração de enzima na conversão de galato de geranila nas condições de 70 °C, 30 mL de solvente, razão molar 1:6 (ácido:álcool) e 125 rpm por 2 h.

Concentração de enzima (%;m/m)	Conversão (%)
1	0,7±0,2
5	2,2±0,1
10	21,1±1,5
20	9,4±1,3

Observa-se que a concentração de 10% (m/m) de lipase Novozym 435 apresentou a maior conversão de galato de geranila em comparação com as demais concentrações testadas. A concentração de 20% de enzima reduziu a conversão do éster para 9,4%, ao invés de aumentá-la, sugerindo que são necessários mais estudos em relação ao uso de peneiras moleculares e quantidade de solvente necessária para permitir a transferência dos substratos para o sítio ativo da enzima.

A reação sem enzima conduzida nas condições de razão molar 1:6 (ácido:álcool), 125 rpm e 70 °C, não apresentou consumo de substrato, indicando que não houve conversão ao final de 2 e 24 h, necessitando-se assim, do uso de lipases como catalizadores.

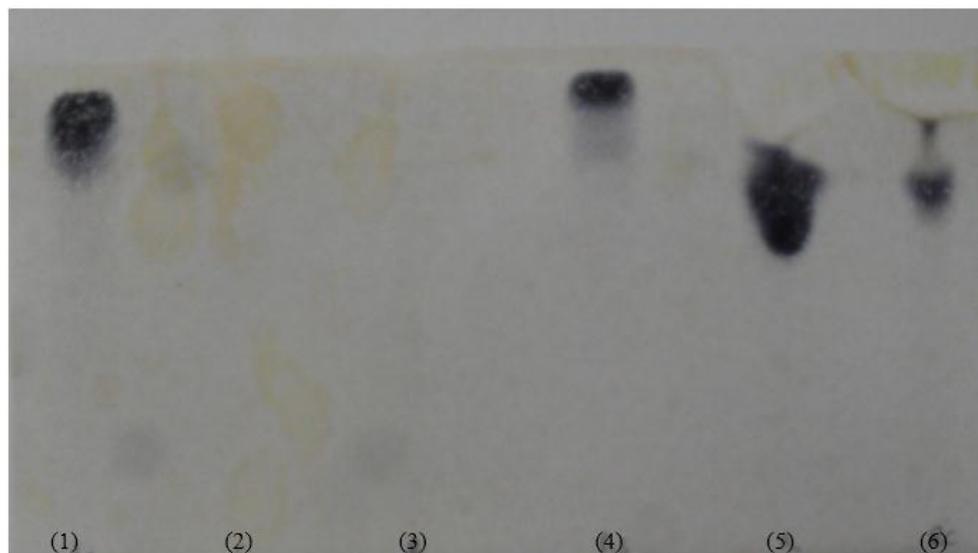
5.3 Isolamento do galato de geranila

Após a separação dos componentes da reação por coluna cromatográfica, verificou-se quais as frações apresentavam coloração azul no teste qualitativo com a solução de cloreto férrico 1%. O empacotamento da coluna pode influenciar na eluição da amostra, mas de forma geral, as frações eluídas com acetato de etila:n-hexano nas proporções 1:9, 2:8 e 3:7 (v/v), possuíam característica oleosa e odor semelhante ao geraniol, sem a presença de coloração azul no teste qualitativo.

As frações eluídas na proporção de acetato de etila:n-hexano 1:1 (v/v) apresentaram coloração azul. Com estas, realizou-se a CCD para acompanhamento do isolamento em CC, onde observou-se que as frações apresentaram uma banda com o valor de R_f entre 0,87 e 0,88, sendo este diferente do valor encontrado para a solução padrão de ácido gálico, que foi de 0,95.

Os cromatogramas obtidos a partir da CCD para os substratos, branco, reação sem enzima, reação sem excesso de ácido gálico e após o isolamento por CC podem ser observados na Figura 9.

Figura 9 - Cromatografia em camada delgada, apresentando as bandas para ácido gálico (1), geraniol (2), branco (3), fração cristalina separada da reação (4), mistura reacional após retirada do excesso de ácido gálico (5) e do produto após CC (6).



A banda do ácido gálico apresentou o valor de Rf de 0,95. O geraniol não apresenta banda visível, assim como a mistura reacional antes da reação (branco) após a retirada do excesso de ácido gálico que também não apresentou banda. A fração sólida separada da reação com extração líquido-líquido com clorofórmio apresentou uma banda correspondente à do ácido gálico ($R_f = 0,95$), representando o excesso de ácido gálico retirado que não foi solúvel em clorofórmio.

A reação após a retirada do excesso de ácido gálico, fração solúvel em clorofórmio apresentou um valor de Rf de 0,80 e o produto (galato de geranila) após a separação por CC apresentou o valor de Rf de 0,87, valor este diferente do ácido gálico ($R_f = 0,95$), podendo-se supor que houve a formação de um composto durante a reação de esterificação enzimática.

5.4 Atividade de esterificação enzimática

Após a reação de esterificação as enzimas foram separadas por filtração, lavadas com álcool etílico e n-hexano e acondicionadas até a determinação da atividade enzimática. Os resultados da atividade de esterificação da lipase Novozym 435 antes e após a reação de esterificação do galato de geranila estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da atividade de esterificação da lipase Novozym 435 antes e após a reação de esterificação com ácido gálico e geraniol.

Lipase Novozym 435	Atividade enzimática (U.g⁻¹)
Antes da reação de esterificação	2754,7 ^a ± 43,9
Após a reação de esterificação (2h)	2275,5 ^b ± 67,1

*Valor médio ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa (p<0,05).

A determinação da atividade de esterificação enzimática é importante para verificar o potencial da enzima como catalizador, bem como averiguar se a mesma mantém sua atividade após a reação (RICHETTI, 2009).

Antes da reação de esterificação o valor de atividade enzimática para a lipase Novozym 435 foi de 2754,7 U.g⁻¹, diferindo significativamente (p<0,05) do valor de atividade enzimática após 2 h de reação (2275,5 U.g⁻¹), representando uma redução de aproximadamente 17% na atividade enzimática.

Staudt (2018) avaliou a atividade de esterificação da lipase comercial Novozym 435 antes e após a reação de esterificação enzimática entre o óleo de citronela e o ácido cinâmico, e encontrou o valor de 1912,5 e 1087,5 U.g⁻¹, respectivamente, representando uma redução de 43% após 48 h de reação e temperatura de 70 °C, segundo a autora, a diminuição pode ter sido causada pela longo período de exposição nessa temperatura.

Dalla Costa (2018) avaliou a atividade de esterificação da lipase comercial Novozym 435, obtendo 2512,13 U.g⁻¹, valor próximo ao encontrado neste estudo, que foi de 2754,7 U.g⁻¹, valores considerados elevados, quando comparados com outras lipases comerciais, confirmando a aplicação desta enzima em reações de esterificação.

5.5 Lipossolubilidade

Os resultados da solubilização em diferentes solventes orgânicos e óleo de soja estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Solubilização do ácido gálico e galato de geraniol em diferentes solventes orgânicos e óleo de soja.

	n-hexano	Diclorometano	Clorofórmio	Éter etílico	Óleo de soja
Ácido gálico	Insolúvel*	Insolúvel*	Insolúvel*	2 g.100mL ⁻¹	Insolúvel*
Éster	Insolúvel*	2 g.100mL ⁻¹	2 g.100mL ⁻¹	2 g.100mL ⁻¹	2 g.100mL ⁻¹

*: teste com 25 mL de diluente.

Observa-se que o ácido gálico foi solúvel somente em éter etílico, nos demais solventes testados houve precipitação do ácido gálico, já o éster apresentou solubilidade no óleo de soja e em todos os solventes orgânicos, exceto o n-hexano.

Esta análise é importante para verificar se a reação de esterificação gerou um produto com solubilidade em meio apolar melhorada em relação ao ácido gálico, o que é esperado, devido a adição de uma estrutura mais hidrofóbica, assim o galato de geranila poderia apresentar uma maior dispersão em meio lipofílico, auxiliando no controle da oxidação lipídica de alimentos e cosméticos.

De acordo com Aruoma et al. (1993), o galato de dodecila, em seu estudo foi mais eficaz que o ácido gálico na prevenção da auto-oxidação ácido linoleico (medido pelo método do tiocianato). O galato de dodecila é uma substância anfifílica que possui seu uso permitido como aditivo antioxidante em alimentos, apresentando tanto uma potente atividade antioxidante de quebra de cadeia e como uma atividade antioxidante preventiva (KUBO et al. 2002a; FIGUEROA-ESPINOZA; VILLENEUVE, 2005).

5.6 Atividades biológicas

5.6.1 Atividade antifúngica

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) sobre os fungos foi considerada como a concentração de amostra capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 10 mm de diâmetro (OSTROSKY et al., 2008).

Os resultados da atividade antifúngica do geraniol sobre *A. flavus*, *A. alternata* e *P. crustosum* encontram-se na Tabela 7, onde pode-se observar que a atividade antifúngica aumenta com o aumento da concentração de geraniol.

Para o fungo *A. alternata* as concentrações de 50 e 37,5 mg.mL⁻¹ não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Já para o fungo *A. flavus* a análise estatística mostrou que as concentrações de 50 e 37,5 mg.mL⁻¹ diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), assim como para *P. crustosum*, nas mesmas concentrações (p<0,05).

Para os três fungos testados, *A. alternata*, *A. flavus* e *P. crustosum*, a CIM foi obtida na concentração de 1,5 mg.mL⁻¹.

Tabela 7 - Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de geraniol sobre *A. alternata*, *A. flavus* e *P. crustosum*.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	<i>A. alternata</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. crustosum</i>
Geraniol	Halo de inibição (mm)		
50,0	36 ^a ± 1	24 ^a ± 1	28 ^a ± 2
37,5	30 ^{ab} ± 3	21 ^b ± 1	26 ^b ± 1
25,0	27 ^{bc} ± 1	19 ^c ± 1	25 ^{bc} ± 1
12,5	25 ^{bcd} ± 1	18 ^c ± 2	24 ^{cd} ± 1
5,0	23 ^{cd} ± 2	17 ^c ± 1	22 ^d ± 1
4,0	20 ^d ± 2	17 ^c ± 0	20 ^e ± 1
2,5	15 ^e ± 1	14 ^d ± 1	18 ^e ± 1
1,5	12 ^e ± 3	10 ^e ± 0	11 ^f ± 1
0,5	0	0	0

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Segundo Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais devido a sua característica lipofílica podem afetar a parede celular, a membrana plasmática e as organelas de células eucarióticas. Essa propriedade citotóxica dos óleos essenciais possibilita a aplicação desses extratos vegetais no controle de fungos (BRUM, 2012).

O potencial antifúngico do geraniol já foi relatado por Aoudou et al. (2010), que utilizaram o método de difusão em discos de papel Whatman (6 mm de diâmetro) com 10 µL de geraniol sobre estes e depositaram sobre uma placa com meio de cultura e fungo, que foi incubada na temperatura de 30 °C por 48 h, onde após este período, *A. flavus* e *Penicillium* spp. formaram um halo de inibição de 34,3 e 44,7 mm, respectivamente.

A Tabela 8 apresenta os valores de diâmetro médio do halo de inibição para diferentes concentrações de ácido gálico sobre os três fungos testados.

Tabela 8 – Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de ácido gálico sobre *A. alternata*, *A. flavus* e *P. crustosum*.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	<i>A. alternata</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. crustosum</i>
Ácido gálico	Halo de inibição (mm)		
50,0	0	20 ^a ± 1	0
37,5	0	15 ^b ± 1	0
25,0	0	14 ^b ± 1	0
12,5	0	0	0

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O ácido gálico não apresentou atividade contra *A. alternata* e *P. crustosum* nas concentrações testadas, já *A. flavus* apresentou halo de inibição de 20 mm na concentração mais elevada avaliada.

Os resultados para o diâmetro médio de inibição do galato de geranila sobre os fungos avaliados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Diâmetro médio de halo (mm) em relação a diferentes concentrações de galato de geranila sobre *A. alternata*, *A. flavus* e *P. crustosum*.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	<i>A. alternata</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. crustosum</i>
Galato de geranila	Halo de inibição (mm)		
50,0	16 ^a ± 1	15 ^a ± 0	21 ^a ± 1
37,5	13 ^a ± 1	14 ^a ± 1	14 ^b ± 1
25,0	0	0	11 ^b ± 1
12,5	0	0	0

O galato de geranila apresentou inibição sobre os três fungos testados, sendo que sobre o *P. crustosum*, a concentração de 50 mg.mL⁻¹ formou um halo de inibição de 21 mm, valor que difere significativamente das concentrações de 37,5 e 25 mg.mL⁻¹, com valores de 14 e 11 mg.mL⁻¹, respectivamente (p<0,05).

Para *A. alternata* os valores do halo de inibição foram 16 e 13 mm para as concentrações de 50 e 37,5 mg.mL⁻¹, respectivamente, não diferindo significativamente entre si (p<0,05). O produto sobre *A. flavus* formou um halo de inibição de 15 mm na concentração de 50 mg.mL⁻¹ e de 14 mm na concentração de 37,5 mg.mL⁻¹, sem diferença significativa entre si (p<0,05).

A CIM do éster para *P. crustosum* foi de 25 mg.mL⁻¹, já para *A. alternata* e *A. flavus* o valor de CIM para ambos os fungos foi de 37,5 mg.mL⁻¹.

Fujita e Kubo (2002) verificaram que o galato de octila foi ativo contra *S. cerevisiae* e *Aspergillus niger*, porém o galato de propila foi inativo, pois segundo os autores, não teria uma cadeia carbônica longa o suficiente para garantir a bioatividade.

Ainda segundo esses autores, a atividade antimicrobiana de galatos seria dependente tanto da porção hidrofílica do composto, como do tamanho da cadeia carbônica alifática. Assim, o galato de geranila possui atividade antifúngica maior que o ácido gálico, provavelmente devido a sua cadeia carbônica alifática maior.

5.6.2 Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) dos substratos e do éster foi realizada por microdiluição em placa sobre dez cepas de bactérias e os resultados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação da concentração inibitória mínima do ácido gálico, geraniol e galato de geranila.

		Geraniol	Ácido gálico	Galato de geranila
Gram positivas	ATCC	(mg.mL ⁻¹)	(mg.mL ⁻¹)	(mg.mL ⁻¹)
<i>L. monocytogenes</i>	7644	6,25	5,00	12,50
<i>S. aureus</i>	25923	50,00	5,00	12,50
<i>B. subtilis</i>	6633	40,00	5,00	12,50
<i>S. mutans</i>	25175	100,00	3,00	12,50
<i>E. faecalis</i>	29212	3,12	2,50	12,50
Gram negativas	ATCC	(mg.mL ⁻¹)	(mg.mL ⁻¹)	(mg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i>	25922	25,00	5,00	12,50
<i>S. choleraesuis</i>	10708	50,00	5,00	10,00
<i>K. pneumoniae</i>	10031	1,50	3,00	6,25
<i>P. aeruginosa</i>	27853	500,00	3,00	12,50
<i>S. flexneri</i>	13047	4,69	5,00	12,50

*ATCC: American Type Culture Collection (USA).

Observa-se que o geraniol apresentou uma ampla faixa de inibição, sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes* as bactérias mais sensíveis, com uma CIM de 1,5, 3,12 e 6,25 mg.mL⁻¹, respectivamente. Já a bactéria mais resistente foi *P. aeruginosa*, com uma CIM de 500 mg.mL⁻¹. Segundo Burt (2004), essa bactéria Gram-negativa mostra pouca sensibilidade a ação de óleos essenciais.

O geraniol apresentou inibição moderada contra *K. pneumoniae*, de acordo com a classificação estabelecida por Duarte et al. (2005) baseados no trabalho de Aligiannis et al. (2001) para a atividade antimicrobiana de derivados vegetais, onde a CIM é considerada forte até 0,5 mg.mL⁻¹, moderada de 0,6 a 1,5 mg.mL⁻¹ e fraca acima de 1,6 mg.mL⁻¹. Para as demais bactérias a inibição apresentada foi fraca.

O ácido gálico apresentou inibição fraca para todas as bactérias testadas, com faixa de inibição entre 2,5 a 5 mg.mL⁻¹. A bactéria mais sensível foi a *E. faecalis*, com uma CIM de 2,5 mg.mL⁻¹.

Os valores para o ácido gálico encontrados neste estudo foram maiores que os relatados por Kang et al. (2018), que verificaram a CIM do ácido gálico sobre *S. flexneri*, obtendo o valor de 2 mg.mL⁻¹. E Borges et al. (2013), que avaliaram a CIM do ácido gálico sobre algumas bactérias e encontraram valores de 0,5 mg.mL⁻¹ para *P. aeruginosa*, 1,5 mg.mL⁻¹ para *E. coli*, 1,75 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e 2 mg.mL⁻¹ para *L. monocytogenes*.

Segundo Borges et al. (2013), o ácido gálico pode induzir alterações irreversíveis na membrana de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, entretanto, é facilmente degradado, pois possui pouca estabilidade a altas temperaturas e luz. De acordo com Wolf (2017), alguns galatos podem desempenhar efeitos biológicos semelhantes ao ácido gálico com maior estabilidade e atividade.

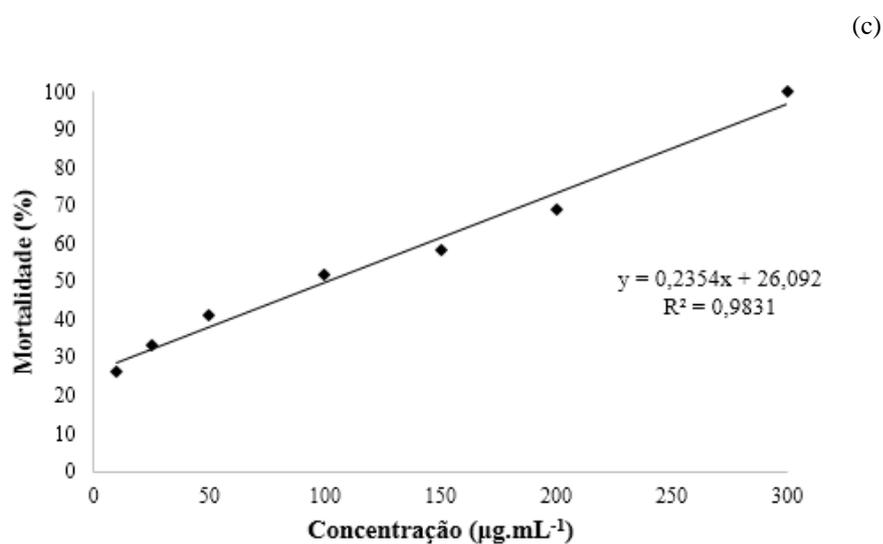
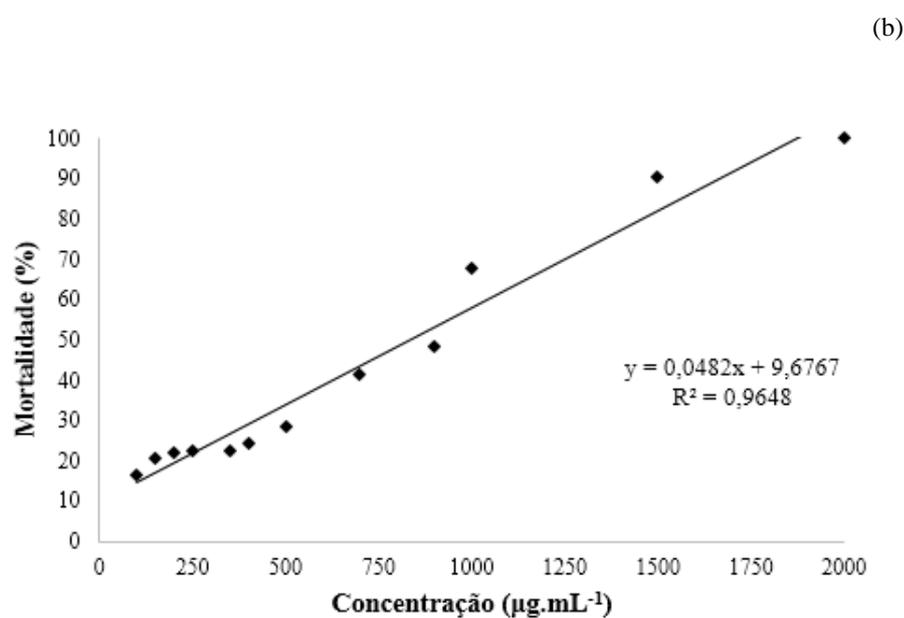
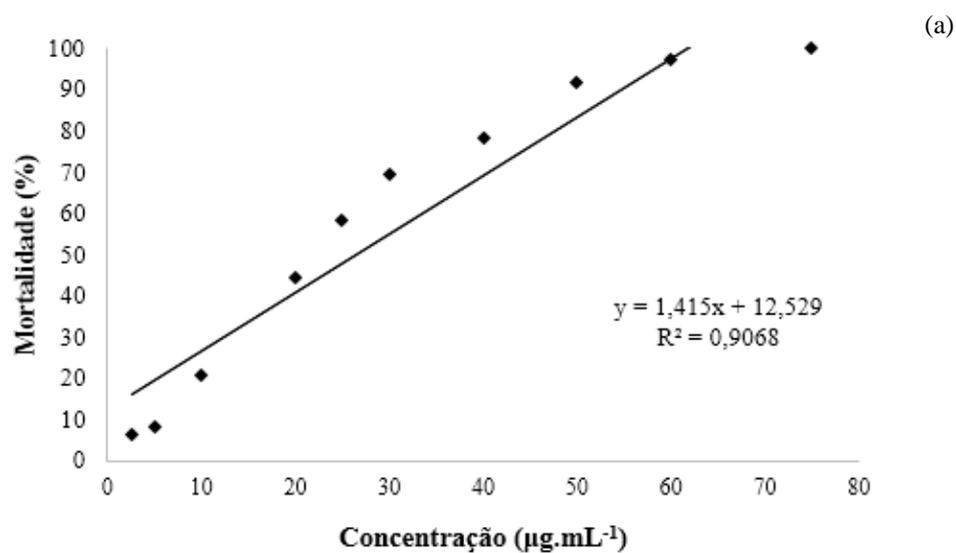
O galato de geranila apresentou uma faixa de CIM entre 6,25 e 12,5 mg.mL⁻¹, sendo esta faixa considerada uma inibição fraca. *K. pneumoniae* foi a bactéria que mostrou maior sensibilidade ao éster (6,25 mg.mL⁻¹).

Quando comparado com os valores do ácido gálico, não houve melhora nos resultados da CIM para o galato de geranila neste estudo, ao contrário do relatado por Kubo, Fujita e Nihei (2002), que avaliaram a CIM do galato de geranila e do ácido gálico contra *S. choleraesuis* ATCC 35640, e encontraram o valor de 0,05 mg.mL⁻¹ para o éster e de 1,6 mg.mL⁻¹ para o ácido gálico. E por Kubo et al. (2004), que avaliaram a CIM de *B. subtilis* ATCC 9372, e encontraram galato de geranila e ácido gálico os valores de 0,025 e 3,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

5.6.3 Toxicidade frente à *A. salina*

Os resultados referentes à toxicidade aguda do geraniol, ácido gálico e do produto sobre *A. salina* estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Percentual de mortalidade da *A. salina* em relação a diferentes concentrações de geraniol (a), ácido gálico (b) e galato de geraniila (c) após 24 h de exposição.



O geraniol (Figura 10a) apresentou uma DL_{50} de $26,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida a partir da equação da reta $y = 1,415x + 12,529$, com um R^2 de 0,9827. O percentual máximo de mortalidade (100%) foi observado na concentração de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, após 24 h de exposição.

A correlação entre o percentual de mortalidade e a concentração de ácido gálico (Figura 10b) forneceu uma equação da reta $y = 0,0482x + 9,6767$ (R^2 de 0,9648), com uma DL_{50} de $836,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A mortalidade máxima foi observada na concentração de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, após 24 h de exposição.

Porfírio et al. (2013) avaliaram a toxicidade do ácido gálico em ensaios com *A. salina*, onde encontraram uma faixa de DL_{50} com valores menores do que este trabalho, entre 150 e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O galato de geranila (Figura 10c) apresentou uma mortalidade máxima na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 h de exposição e a correlação entre o percentual de mortalidade e sua concentração gerou uma equação da reta de $y = 0,2354x + 26,092$ (R^2 de 0,9831), com uma DL_{50} de $101,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

De acordo com a classificação de Meyer et al. (1982), compostos ativos e extratos vegetais, a amostra é considerada tóxica ou ativa para $DL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já amostras com $DL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentam toxicidade ou são inativas. Seguindo este critério de classificação as três amostras apresentam toxicidade.

Outra classificação estabelecida por Dolabela (1997), define o produto como altamente tóxico com $DL_{50} \leq 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderadamente tóxico com DL_{50} entre 80 a $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e pouco tóxico ou atóxico com $DL_{50} \geq 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir deste critério de classificação, o geraniol possui alta toxicidade, enquanto o éster apresenta toxicidade moderada e o ácido gálico possui baixa toxicidade.

O ensaio de toxicidade com *A. salina* apresenta-se como um teste que pode estimar a toxicidade e auxiliar na detecção de compostos bioativos em extratos vegetais (PARRA et al., 2001).

Alguns autores sugerem que há uma boa correlação entre o ensaio com *A. salina* e a atividade antitumoral (McLAUGHLIN; ROGERS, 1988; McLAUGHLIN, 1991; ANDERSON et al., 1991). Segundo Swantara, Rita e Hernindy (2017), a alta toxicidade do composto de testado pode ser correlacionada com a atividade compostos anticarcinogênica, assim a amostra que apresenta uma DL_{50} inferior a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ possui potencial como agente anticancerígeno.

Nesse sentido, o ensaio de toxicidade frente à *A. salina* é um teste válido para triagem de bioatividade em extratos naturais, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos (ARCANJO et al., 2012).

No entanto, para Hisem et al (2011), a toxicidade frente à *A. salina* seria pouco aplicável para estimar o possível risco à saúde de células humanas, sendo mais adequado o ensaio que utiliza células *in vitro* de mamíferos. Dessa forma, são necessários mais ensaios para verificar a toxicidade do éster (galato de geranila) e de seus substratos precursores sobre a saúde humana.

5.7 Atividade antioxidante

O valor de IC_{50} é definido como a capacidade do agente antioxidante de sequestrar 50% dos radicais livres DPPH presente na solução, portanto quanto menor o valor de IC_{50} maior a atividade antioxidante da amostra (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013).

Os resultados do IC_{50} calculados para o ácido gálico e o galato de geranila estão apresentados na Tabela 11 (e os gráficos de regressão linear para cálculos do IC_{50} seguem expostos no Apêndice B).

Tabela 11 - Atividade antioxidante expressa em valores de IC_{50} do ácido gálico e do galato de geranila.

Amostra	Equação da reta	IC_{50} (mg.mL ⁻¹)
Ácido gálico	$y = 16763x - 1,1177$ ($R^2 = 0,9752$)	0,0029
Galato de geranila	$y = 726,18x + 0,8286$ ($R^2 = 0,9715$)	0,0677

A análise dos resultados da mostra que a correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de ácido gálico resultou na equação da reta $y = 16763x - 1,1177$, com $R^2 = 0,9752$, fornecendo um IC_{50} de 0,0029 mg.mL⁻¹ (ou 17,04 μ M). O éster forneceu uma equação da reta $y = 726,18x + 0,8286$ ($R^2 = 0,9715$), com um valor de IC_{50} de 0,0677 mg.mL⁻¹ (ou 220,90 μ M, valor cerca de 12 vezes maior que o do ácido gálico). Já o geraniol não apresentou atividade antioxidante.

Lu, Khoo e Wiart (2014) encontrou para o ácido gálico o valor de IC_{50} de 0,0015 mg.mL⁻¹, já Brighente et al. (2007) verificou o valor de IC_{50} para o ácido gálico de 0,0026 mg.mL⁻¹, corroborando com o valor encontrado neste estudo. Valor próximo também ao encontrado neste estudo para o ácido ascórbico ($IC_{50} = 0,0024 \pm 0,0004$ mg.mL⁻¹).

Khan et al. (2012) em seu estudo encontraram para o galato de propila o valor de IC_{50} de $0,03012 \text{ mg.mL}^{-1}$, obtido pelo método de DPPH[•]. Segundo Kasture et al. (2009), a ordem de eficiência na captura do DPPH[•] por ácido gálico e seus derivados em etanol segue a ordem: ácido gálico > galato de metila > galato de propila. Assim, o aumento da cadeia poderia diminuir a atividade antioxidante.

O galato de geranila apresentou atividade antioxidante menor que o ácido gálico, porém superior ao conservante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) avaliado neste estudo ($IC_{50} = 0,18 \pm 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$), conservante sintético amplamente utilizado na indústria de cosméticos e alimentos. Além disso, o galato de geranila apresenta uma polaridade menor que a do ácido gálico, o que poderia facilitar sua interação em sistemas lipídicos, protegendo os produtos, no qual foi aplicado, da ação de radicais livres.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi realizada a síntese de galato de geranila e posterior análise das atividades biológicas e antioxidante dos substratos e do produto.

O álcool *terc*-butílico não influenciou na atividade enzimática da lipase Novozym 435, mostrando-se um solvente apropriado para solubilizar de forma eficiente os substratos e permitir a reação.

A condição investigada que produziu a maior conversão para a síntese de galato de geranila (21%) foi a temperatura de 70 °C, razão molar dos substratos de 1:6 (ácido:álcool), 10% (m/m substratos) de lipase Novozym 435, adição de 30 mL do solvente álcool *terc*-butílico e agitação de 125 rpm por 2 h. Entretanto, são necessários mais estudos para aumentar a conversão do produto, como por exemplo o uso de peneiras moleculares.

Em relação as atividades biológicas, na atividade antifúngica o geraniol formou halo de inibição para os três fungos testados, mostrando uma boa inibição fúngica. O ácido gálico apresentou halo de inibição, somente contra *A. flavus*, já o éster apresentou halo de inibição sobre os três fungos testados nas maiores concentrações avaliadas, assim os resultados mostram que a esterificação do ácido gálico pode melhorar sua atividade antifúngica.

A concentração inibitória mínima do geraniol variou entre 1,50 a 500 mg.mL⁻¹, para o ácido gálico os valores foram de 2,50 a 5 mg.mL⁻¹, já a faixa de inibição para o éster foi de 6,25 a 12,5 mg.mL⁻¹, sendo necessários mais estudos que verifiquem se o ácido gálico, que é uma substância bastante sensível à luz e a temperatura, após a esterificação apresenta uma melhora na estabilidade, mantendo por mais tempo sua atividade antibacteriana.

A avaliação da toxicidade frente à *A. salina* do ácido gálico, éster e geraniol mostrou que estas substâncias apresentam toxicidade, sendo o galato de geranila foi menos tóxico que o geraniol e mais tóxico que o ácido gálico, devido a sua moderada toxicidade o éster pode ser testado em outras análises farmacológicas, como atividade antitumoral.

O galato de geranila apresentou atividade antioxidante pelo método de DPPH, além disso o éster apresentou maior lipossolubilidade, em solventes orgânicos e no óleo e soja, quando comparado com o ácido gálico, podendo ser usado em diversos produtos onde o ácido gálico não mostre boa solubilidade.

Desta maneira, os resultados obtidos indicam que a esterificação enzimática do geraniol e do ácido gálico pode gerar um produto com potencial a ser investigado para a busca de novos produtos com propriedades antioxidantes e farmacológicas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas:

- Otimizar a esterificação enzimática de galato de geranila com a lipase Novozym 435;
- Confirmar a estrutura do éster por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a atividade antioxidante do ácido gálico e do éster no óleo de soja;
- Avaliar os ciclos de reuso da lipase na reação de esterificação de galato de geranila;
- Utilizar outras lipases para a esterificação de galato de geranila;
- Avaliar a estabilidade do éster em relação a luz, temperatura e presença de oxigênio.
- Realizar a reação de esterificação do ácido gálico com outros álcoois;
- Avaliar a concentração bactericida mínima (CBM) do galato de geranila, bem como de seus substratos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do galato de geranila com *A. salina*.

REFERÊNCIAS

- ABE, I.; KASHIWAGI, Y.; NOGUCHI, H. Inhibition of vertebrate squalene epoxidase by isoprenyl gallates and phenylalkyl gallates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 2525-2528, 2000a.
- ABE, I.; KASHIWAGI, Y.; NOGUCHI, H. Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloylesters. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n.1, p. 137-140, 2000b.
- ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-398, 1998.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ANDERSON, J.E. et al. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem Analysis**, v. 2, p. 107-111, 1991.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANON. **Code of Federal Regulations**, Title 40, Part 158, 1985.
- AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS’ SOCIETY. **Official and tentative methods of the American Oil Chemist’s Society**. 1998. Disponível em: <http://www.aocs/Methods/content.cfm?ItemNumber=40798>. Acesso em: 29 out. 2018.
- AOUDOU, Y. et al. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.
- ARACIL, J.; GARCIA, T.; MARTINEZ, M. Enzymatic synthesis of an analogue of jojoba oil: optimization by statistical analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 7, p. 607-611, 1993.
- ARBOS, K.A.; STEVANI, P.C.; CASTANHA, R.F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.
- ARCANJO, D.D.R. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ARUOMA, O.I. et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1880-1885, 1993.

BAILEY, A.E.; **Bailey's industrial oil and fat products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, v. 3.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALEN, M. et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl ester derived from linoleic acid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 265-270, 2017.

BALEN, M. et al. Novozym[®] 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 514-520, 2015.

BALEN, M. **Síntese enzimática de ascorbil oleato utilizando tecnologias alternativas**. 2016. 155 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, V. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo***. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, p. 534-538, 1988.

BARZCA, M.V. **Esterificação: Processos químicos industriais III**. In: Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP. 2011. Disponível em <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Esterificacao.pdf>> Acesso em: 13 maio 2018.

BENETI, S.C. et al. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 348-354, 2011.

BIROŠOVÁ, L.; MIKULÁŠOVÁ, M.; VAVERKOVÁ, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, Czech Republic, v. 149, p. 489-91, 2005.

BLANK, A.F. et al. Espaçamento de plantio e intervalos de colheita na biomassa e no óleo essencial de gerânio. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 740-746, 2012.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthase: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 4126-4133, 1998.

BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.

BOUAZIZ, A. et al. Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system: optimization by response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 242–250, 2010.

BOYD, L.; BEVERIDGE, E.G. Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5 trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate. **Microbios**, v. 120, n. 30, p. 73–85, 1981.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução - RDC nº 23**, de 15 de fevereiro de 2005, “Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de fevereiro de 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm>. Acesso em: 02 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. **Resolução – CNS/MS nº 04**, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III, IV e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, Diário Oficial, Brasília, 19 de dezembro de 1988, Seção I, p. 24716-24723. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao_04_1988.pdf/7317a4d9-d5db-44d6-adbd-c7e6891d079d. Acesso em: 02 jan. 2019.

BRIGHENTE, I.M.C. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 156–161, 2007.

BRUHN, F.H.P. **Estudo da retenção de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis empregando cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência e desenvolvimento de métodos de acordo com os conceitos de *analytical quality by design***. 2018. 154 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

BRUM, R.B.C.S. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**. 12th ed. White House Station: Merck, 1996.

BURKE, Y.D. et al. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**, v. 32, p. 151–156, 1997.

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

CALVO, T. R. et al. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 451-459, 2007.

CARBALLO, J.L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CARNESECCHI, S. et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 1, p. 197-200, 2001.

CARNESECCHI, S. et al. Geraniol, a component of plant essential oils, modulate DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 215, p. 53-59, 2004.

CARVALHO, P.O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H.F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Síntese de esteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p. 224-228, 1997.

CHEN, J.-P. Production of ethyl butyrate using *Candida cylindracea* lipase gel. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 404-409, 1996.

CHEN, S.-C.; CHUNG, K-T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1-5, 2000.

CHEN, W.; VILJOEN, A.M. Geraniol — a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 643-651, 2010.

CHIARADIA, V. et al. Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livre de solvente. **Revista Perspectiva**, v. 131, n. 35, p. 35-42, 2011.

CHOI, H.-S. et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1- diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 4156-4161, 2000.

CUSTODIO, A.A.C. et al. Determinação da atividade antioxidante do ácido gálico pelo método ABTS e DPPH para sua utilização como ativo cosmético. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 38, Supl. 1, 2017.

DACRE, J.C. Long-term toxicity study of n-propyl gallate in mice. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 12, p. 125-129, 1994.

DALLA COSTA, K.A. **Síntese enzimática e encapsulamento de oleato de ascorbila**. 2018. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2018.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DOLABELA, M.E. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti-*T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos**. 1997. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DOLLAHITE, J.W.; PIGEON, R.F.; CAMP, B.J. The toxicity of gallic acid, pyrogallol, tannic acid, and *Quercus havardi* in the rabbit. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 1264–1267, 1961.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUBEY, V.S.; LUTHRA, R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia) inflorescence development. **Phytochemistry**, v. 57, p. 675–680, 2001.

DU, X.; FINN, C.E.; QIAN, M.C. Bound volatile precursors in genotypes in the pedigree of ‘Marion’ blackberry (*Rubus* sp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3694–3699, 2010.

DZIEDZIC, S.Z., HUDSON, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v. 14, p. 45-51, 1984.

FELIPE, L.O.; BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association). Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additives amendment 3. GRAS Substances. **Food Technology**, v. 19 (2 part 2), p. 151–197, 1965.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Synthesis of propyl gallate by transesterification of tannic acid in aqueous media catalysed by immobilised derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v. 128, p. 214–217, 2011.

FERRAZ, L.I.R. et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 44–48, 2015.

FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; VILLENEUVE, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2779-2787, 2005.

FRIEDMAN, M., HENIKA, P.R., MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 10, p. 1545–1560, 2002.

FUJITA, K.-I.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 193 – 201, 2002.

GAIO, I. et al. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 10, p. 323–329, 2015.

GRAEBIN, N. G. et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 2, p. 406-412, 2012.

GRUNDHÖFER, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57; p. 915-927, 2001.

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

HADACECK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemistry Anal**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HALLING, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 3, p. 178-206, 1994.

HARI, K.S.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: a kinetic study, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547, n. 2, p. 262-267, 2001.

HIERRO, I. et al. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. **Phytomedicine**, v. 11, p. 77–82, 2004.

HISEM, D. et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, v. 57, p. 76–83, 2011.

HOEPFNER, E.M.; RENG, A.; SCHIMIDT, P.C. **Fiedler encyclopedia of excipients for pharmaceutical, cosmetics and related area**. 5th ed. Aulendorf: Cantor, 2002. 2 v.

INOUE, M. et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 1526-1530, 1995.

JANG, A. et al. Biological functions of a synthetic compound, octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-hydroxybenzoate, from gallic acid–linoleic acid ester. **Food Chemistry**, v. 112, p. 369–373, 2009.

JECFA (Joint FAO, WHO Expert Committee on Food Additives). Evaluation of certain food additives and contaminants, forty-sixth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO). **WHO Technical Report Series**, v. 868, p. 15-16, 1996.

JEON, J.H., LEE, C.H., LEE, H.S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1468–1471, 2009.

JI, H.-F.; ZHANG, H.-Y.; SHEN, L. Proton dissociation is important to understanding structure–activity relationships of gallic acid antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 15, p. 4095-4098, 2006.

KANG, J. et al. Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing *mdoH* gene expression. **Food Control**, v. 94, p. 147-154, 2018.

KARIMI, E.; JAAFAR, H.Z.; AHMAD, S. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4438-4450, 2011.

KASTURE, V.S. et al. Antioxidant and antiparkinson activity of gallic acid derivatives. **Pharmacology Online**, v. 1, p. 385–395, 2009.

KAWADA, M. et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 10, p. 847-852, 2001.

KHALLAAYOUNE, K. et al. Efficacy of 1% geraniol (Fulltec) as a tick repellent. **Parasite**, v. 16, p. 223–226, 2009.

KHAN, M. et al. Acylhydrazide schiff bases: DPPH radical and superoxide anion scavengers. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 705-710, 2012.

KHATKAR, A. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of gallic acid derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2870–2880, 2017.

KIM, J.Y. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, 2007.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Response surface modeling of lipase-catalyzed isoamyl propionate synthesis. **Journal of Food Science**, v.67, n.1, p. 32-36, 2002

KROES, B.H. et al. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Medica**, v. 58, p. 499-504, 1992.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1072-1076, 2004.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3533-3539, 2002a.

KUBO, I. et al. Molecular design of antifungal agents. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3992-3998, 2002b.

KUBO, I.; FUJITA, K.-I.; NIHEI, K.-I. Anti-*Salmonella* activity of alkyl gallates. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6692-6696, 2002.

KUBO, I.; FUJITA, K.-I.; NIHEI, K.-I. Molecular design of multifunctional antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4255-4262, 2003.

KUBO, I. Molecular design of antioxidative and antimicrobial agents. **Chemtech**, v. 29, p. 37-42, 1999.

KUMARAN, A.M. et al. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 957, 2003.

KUPERKAR, V.V. et al. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, 2014.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 160-170, 2008.

LAUXEN, F.R. **Estudo do efeito repelente, inseticida e antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. no controle de insetos e fungos em grãos armazenados.** 2012. p.64. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2012.

LEITE, M.C.A. et al. Investigation the antifungal activity and mechanism(s) geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015.

LERIN, L.A. et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in organic solvents: process optimization and kinetic evaluation. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1068-1076, 2012.

LERIN, L. et al. Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 181-188, 2011.

LETELIER, M.E. et al. *Trypanosoma cruzi*: A possible control of transfusion- induced chagas disease by phenolic antioxidants. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 357-363, 1990.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, v. 2, p. 197-201, 2006.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.

LOPES, L.S. **Otimização da determinação de atividade enzimática como metodologia para avaliação em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.** 2009. 58 p. Monografia (Especialização) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

LU, Y.; KHOO, T.J.; WIART, C. Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods". **Pharmacology & Pharmacy**, v. 5, p. 395-400, 2014.

LU, Z. et al. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, p. 263–274, 2006.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, S.; PONGSAWATMANIT, R. Assesment of phenolic content and radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, 2007.

MANSOURI, M.T. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1028–1033, 2013.

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. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311–2316, 2011.

McLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**, p.1-32, 1991.

McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1988.

MEDINA-TORRES, L. et al. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 642-650, 2013.

MELO, C.M.T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pimenta *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade *praetermissum* (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta). **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient geral biosaay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MORENO-PEREZ, S. et al. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, p. 48-54, 2013.

NABAVI, S.F. et al. Protective role of gallic acid on sodium fluoride induced oxidative stress in rat brain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 73–77, 2012.

NAGAKAWA, Y.; TAYAMA, S. Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes, **Archives of Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 204–208, 1995.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273, 1990.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, P. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, 2009.

NICULAU, E.dosS. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

NIE, G. et al. Synthesis of propyl gallate from tannic acid catalyzed by tannase from *Aspergillus oryzae*: process optimization of transesterification in anhydrous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 102–108, 2012.

NIHO, N. et al. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 1063–1070, 2001.

NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 127-133, 2008.

NOVO NORDISK. **Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions**. Technical Report A-05948, 1992.

O'BRIEN, N.M.; O'CONNOR, T.P. Milk Lipids: Lipid Oxidation. University College, Cork, Ireland, **Reference Module in Food Sciences**, 2016.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1981.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006.

OLIVEIRA, D.V. **Estudo da influência da agitação e da quantidade de catalisador na produção de biodiesel a partir do óleo de soja e etanol**. 2014. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, P.C. et al. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

ORDÓÑEZ, J.A. (Org.). **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

ORTEN, J.M.; KUYPER, A.C.; SMITH, A.H. Studies on the toxicity of propyl gallate and of antioxidant mixtures containing propyl gallate. **Food Technology**, v. 2, p. 308, 1948.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 140–145, 2010.

PAROUL, N. et al. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

PARRA, A.L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

PASANPHAN, W.; CHIRACHANCHAI, S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: an approach for green and water-based antioxidant. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 169-177, 2008.

PIASSÃO, J.F.G. **Avaliação da toxicidade do herbicida 2,4-D sobre a morfologia de *Artemia salina* (Leach, 1819)**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, Erechim, 2018.

PICERNO, P. et al. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 705-712, 2011.

PORFÍRIO, B. et al. Ensaio de toxicidade do ácido 3,4,5-triidróxibenzóico pelo teste de letalidade para *Artemia salina* LEACH. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 1, n. 2, p. 1, 2013.

PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. *In*: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M.T. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. p.54-71. (ACS Symposium Series, n.507).

QUEIROZ, C.R.A.A.; DE MORAIS, S.A.L.M.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAJALAKSHMI, K.; DEVARAJ, H.; NIRANJALI DEVARAJ, S. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 919–922, 2001.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207-219, 2009.

RAJESWARA RAO, B.R. et al. Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 344–350, 2004.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RASHID, K.A. et al. Mutagenicity tests with gallic and tannic acid in the *Salmonella*/mammalian microsome assay. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B 20, p. 153–165, 1985.

REED, G. **Enzymes in food processing**, 2nd edn., Academic Press, New York, 1975.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. In: AHOH, C.C; MIN, D.B. (Eds.). **Chemistry, Nutrition and Biotechnology**, Marcel Dekker, New York, p. 423-448, 1998.

RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT—Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132–1137, 2010.

RICHETTI, A. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

RODWELL, V.W. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30 ed. Porto Alegre: AMGH, 2017, p. 249.

ROESLER, B.C.S.; VANZIN, D.C.C.; BURKERT, A.V. Síntese de ésteres de isoamila por diferentes lipases microbianas comerciais. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 37, p. 25-30, 2017.

ROSSO, R. **Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido**. 2005. 143 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

RYDER, N.S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 774-777, 1991.

SÁ, A.G.A. et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

SABALLY, K. et al. Enzymatic esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 1, p. 37-44, 2005.

SAEKI, K. et al. Apoptosis inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1391–1394, 2000.

SAKAGUCHI, N. Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 5, p. 471-475, 1999.

SALVI, H.M.; KAMBLE, M.P.; YADAV, G.D. Synthesis of geraniol esters in a continuous-flow packed-bed reactor of immobilized lipase: optimization of process parameters and kinetic modeling. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, v. 184, p. 630–643, 2018.

SANTIBANEZ, L.; WILSON, L.; ILLANES, A. Synthesis of ascorbyl palmitate with immobilized lipase from *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, p. 405-410, 2014.

SANTOS, A.S.dos. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol against food-relevant dematiaceous fungi *Cladosporium* spp. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. 1732-1740, 2017.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 323-353.

SARANGARAJAN, R. et al. Antioxidants: friend or foe? **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1111–1116, 2017.

SBARDELOTTO, C.R. et al. Optimization of solvent-free geranyl butanoate production using Novozyme 435 and homemade polyurethane immobilized Novozyme NZL-102-LYO-HQ as catalyts. **Química Nova**, v. 41, n. 8, p. 905-911, 2018.

SHARMA, A. et al. Fabrication and functionalization of magnesium nanoparticle for lipase immobilization in n-propyl gallate synthesis. **Journal of King Saud University – Science**, v. 29, p. 536–546, 2017.

SHARMA, S. et al. Gallic acid-based alkyl esters synthesis in a water-free system by celite-bound lipase of *Bacillus licheniformis* SCD11501. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 3, 2015.

SHARMA, S.; GUPTA, M.N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in nonaqueous media. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 395–397, 2003.

SHI, Z.-H. et al. Microwave-assisted esterification of gallic acid. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 1351-1354, 2015.

SHEN, L. et al. Effects of diffusion controlled release of tocopherol on lipid oxidation. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 129–133, 2018.

SHOFF, S.M. et al. Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Research**, v. 51, p. 37-42, 1991.

SILVA, M.L.C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669- 682, 2010.

SILVESTRI, J.D.F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SI, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 296–305, 2006.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 10 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. v. 2.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P.J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, p. 524–530, 2006.

SOROUR, N. et al. Enzymatic synthesis of phenolic lipids in solvent-free medium using flaxseed oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1813-1819, 2012.

SOUZA de, M.C.M. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 03, p. 681 – 690, 2017.

STAUDT, A. **Esterificação enzimática de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) com ácido cinâmico e avaliação das atividades biológicas**. 2018. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2018.

STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859, 2013.

SUGANTHY, N.; MUNIASAMY, S.; ARCHUNAN, G. Safety assessment of methanolic extract of *Terminalia chebula* fruit, *Terminalia arjuna* bark and its bioactive constituent 7-methyl gallic acid: *in vitro* and *in vivo* studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 347–357, 2018.

SUGATANI, J. et al. Tea polyphenols inhibit acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine cetyltransferase (a key enzyme in platelet-activating factor biosynthesis) and platelet-activating factor-induced platelet aggregation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 134, p. 17–28, 2004.

SUN, J. et al. Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: Is it esterification or transesterification?. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2828–2832, 2013.

SWANTARA, I.M.D.; RITA, W.S.; HERNINDY, Rr.A. Isolation and phytochemical test of anticancer isolate of sponge *Hyrtios erecta*. **Journal of Health Sciences and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 16-20, 2017.

TANAKA, H.; CHINO, A.; TAKAHASHI, T. Reagent-controlled stereoselective synthesis of (±)-gallo- and (±)-epigallo-catechin gallates. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 2493–2495, 2012.

THANYACHAROEN, T. et al. Development of a gallic acid-loaded chitosan and polyvinyl alcohol hydrogel composite: release characteristics and antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 363–370, 2018.

TIWARI, M.; KAKKAR, P. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 295–301, 2009.

TRAINA, O. et al. *In vitro* acaricidal activity of four monoterpenes and solvents against *Otodectes cynotis* (Acari: Psoroptidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 141–146, 2005.

VAN DER HEIJDEN, C.A.; JANSSEN, P.J.C.M.; STRIK, J.J.T.W.A. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 1067–1070, 1986.

VARIYA, B.C. et al. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 101, p. 71–78, 2019.

VARMA, M.N.; MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2342–2354, 2010.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515–536, 2007.

XU, C. et al. Ultrasound irradiation promoted enzymatic alcoholysis for synthesis of monoglyceryl phenolic acids in a solvent-free system. **Sonochhchemistry Ultrasonics**, v. 41, p. 120-126, 2018.

YADAV, G.D.; KAMBLE, M.P. A green process for synthesis of geraniol esters by immobilized lipase from *Candida Antarctica B* fraction in non-aqueous reaction media: optimization and kinetic modeling. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 20170179, p. 1-14, 2018.

YANG, Z.; GUO, Z.; XU, X. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1311-1315, 2012.

YEE, L.N.; AKOH, C.C.; PHILLIPS, R.S. Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl caproate: Effect of reaction parameters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p 255–260, 1997.

YU, S.G.; ANDERSON, P.J.; ELSON, C.E. Efficacy of beta-ionone in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 2144–2147, 1995.

YU, S.G.; HILDEBRANDT, L.A.; ELSON, C.E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. **Journal of Nutrient**, v. 125, p. 2763–2767, 1995.

YU, X.; LI, Y; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 69–73, 2004.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag. 1984. 320p.

WEETALL, H.H. Enzymatic synthesis of gallic acid esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 11, p. 25-28, 1985.

WOLF, V.G. **Ácido gálico e seus ésteres como agentes anti – *Helicobacter pylori* e sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos**. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2017.

APÊNDICE A

Cálculo do valor de pH para neutralização do ácido gálico por titulação

A estequiometria da reação de neutralização do ácido gálico com o hidróxido de sódio (NaOH) está apresentada na Equação 1.



O valor do pka do ácido gálico na função ácido carboxílico é 4,5, dessa forma, utilizou-se a Equação 2 para determinar até que pH deveria ser conduzida a titulação.

$$\text{pH} = 7 + \frac{\text{pka}}{2} \quad (2)$$

APÊNDICE B

Atividade antioxidante (IC₅₀)

A determinação do IC₅₀ foi realizada através do ajuste dos dados de atividade antioxidante no gráfico de regressão linear, onde obteve-se a equação da reta do ácido gálico e do galato de geranila, gráficos estes apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1 – Regressão linear para determinação do IC₅₀ do ácido gálico.

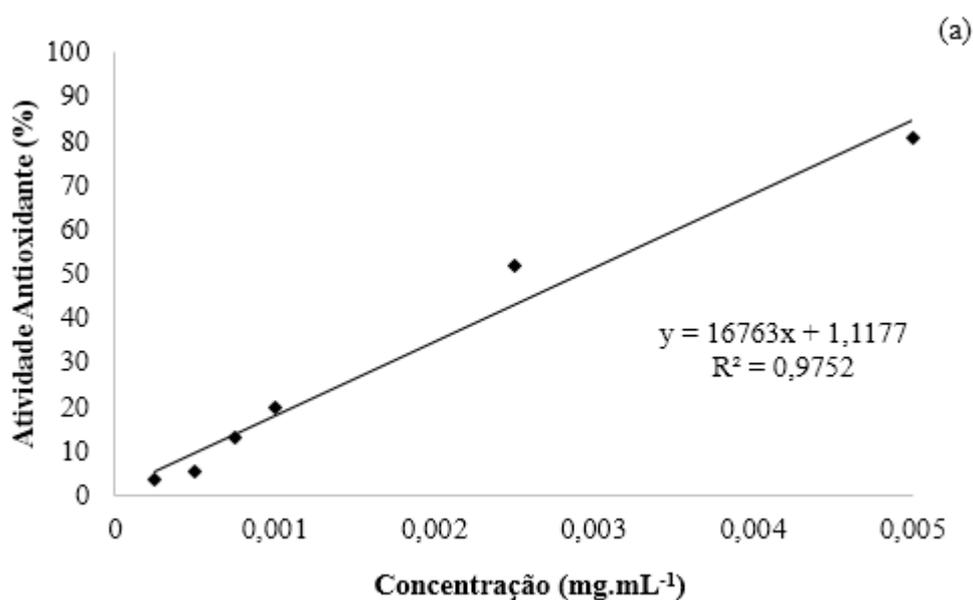


Figura 2 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ do galato de geranila.

