



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

Rubieli Carla Frezza Zeferino

Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos

Florianópolis

2021

Rubieli Carla Frezza Zeferino

Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.

Coorientadores: Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a

Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Zeferino, Rubieli Carla Frezza

Síntese de acetato de geranila e acetato de nerila via catálise heterogênea com resina de troca iônica e caracterização dos ésteres para potenciais aplicações como aditivos antimicrobianos / Rubieli Carla Frezza Zeferino ; orientador, Humberto Gracher Riella, coorientadora, Cíntia Soares, coorientador, Márcio Antônio Fiori, 2021. 202 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Reações de esterificação. 3. Acetato de geranila. 4. Acetato de nerila. 5. Catálise heterogênea. I. Riella, Humberto Gracher. II. Soares, Cíntia. III. Fiori, Márcio Antônio IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Rubieli Carla Frezza Zeferino

Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Micheli Zanetti, Dr.^a

Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ)

Prof. Gustavo Lopes Colpani, Dr.

Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ)

Prof. Rodrigo Brackmann, Dr.

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado ao meu esposo Adriano.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Em especial ao meu esposo Adriano por entender e compreender todos os momentos de ausência e estar ao meu lado, me dando apoio, amor e carinho durante a maior parte da minha vida.

A minha família, meus pais, Rogério e Neiva, meus irmãos, Allison e Daniela, por entenderem a importância da minha profissão.

Aos professores Humberto, Cíntia e Márcio, por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências, auxiliando na orientação e construção deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por me proporcionar esta oportunidade.

Aos colegas Liz Girardi Müller e Jacir Dal Magro pelas suas contribuições para o trabalho.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, que me acompanharam durante os 4 anos no desenvolvimento deste trabalho, Vinicius Aleixo Angonese Piaia e Vinicius Tres Orso, pela dedicação e auxílio. Aos demais alunos de iniciação científica que contribuíram em etapas da pesquisa, Vítor Machado Pinheiro, Amanda Rebonatto Oltramari, Mikaela Scatolin e Jean Felipe Calisto Fossá.

Enfim a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Aditivos antimicrobianos são empregados em diversas aplicações industriais, dentre elas na produção de alimentos, embalagens, cosméticos, perfumaria, produtos de higiene, fármacos, nutrição animal e produtos dedicados à saúde. Alguns produtos de origem natural, principalmente derivados de óleos essenciais, apresentam ação antimicrobiana frente a diversos micro-organismos e têm sido aplicados com esta função. O acetato de geranila e o acetato de nerila são ésteres derivados do geraniol e do nerol, e são encontrados em óleos essenciais de diversas plantas, porém em quantidades relativamente baixas, o que inviabiliza a sua extração e torna necessário a sua produção por meio de reações de esterificação. Nas reações de esterificação para a síntese desses compostos catalisadores homogêneos ácidos têm sido empregados, porém estes apresentam diversas desvantagens, dentre elas a dificuldade de separação e à agressão aos equipamentos e ao meio ambiente. Além disso, enzimas têm sido utilizadas como catalisadores heterogêneos, porém estas apresentam sensibilidade elevada às condições operacionais e maior dificuldade para o controle reacional. Neste contexto, o objetivo desta tese foi sintetizar os acetatos de geranila e nerila a partir da esterificação direta entre geraniol e nerol com anidrido acético, via catálise heterogênea, utilizando a resina de troca iônica Lewatit® GF 101 como catalisador, bem como, avaliar os ésteres obtidos quanto à atividade antimicrobiana e à toxicidade oral com vistas em aplicações futuras como aditivos antimicrobianos. Os resultados mostraram que é possível realizar a síntese dos ésteres com elevadas eficiências de conversão e seletividade, com condição experimental ótima de temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7% e razão molar de 1:4 (álcool:anidrido acético). A conversão completa do geraniol foi alcançada aos 70 minutos de reação com 95,94% de seletividade para o acetato de geranila, enquanto a conversão completa do nerol foi alcançada em 40 minutos com 82,34% de seletividade para o acetato de nerila. A taxa de reação foi controlada apenas pelo decaimento do álcool. O valor obtido para a constante cinética da reação principal, encontrada por um modelo pseudo-homogêneo, foi 31 vezes maior que o da reação paralela para a síntese do acetato de geranila e 6 vezes maior para a síntese do acetato de nerila. A resina demonstrou baixa perda da atividade catalítica por 3 ciclos de reutilização. Os compostos demonstraram ação antimicrobiana para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) com concentração inibitória mínima entre 3 mg·mL⁻¹ e 85 mg·mL⁻¹ e para fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*) com concentrações entre 75 µg·mL⁻¹ e 400 µg·mL⁻¹. A avaliação da toxicidade oral dos compostos demonstrou que a dose letal está entre 2000 mg·kg⁻¹ e 5000 mg·kg⁻¹, sendo que quando ingeridos em doses repetidas de até 1 mg·kg⁻¹ os compostos não apresentaram toxicidade. A combinação dos resultados obtidos permite concluir que a síntese de acetato de geranila e nerila pela rota proposta é viável e que os mesmos possuem potencial para serem utilizados como aditivos antimicrobianos atóxicos para diversas aplicações na indústria.

Palavras-chave: Acetato de geranila. Acetato de nerila. Catálise heterogênea.

ABSTRACT

Antimicrobial additives are used in several industrial applications, as in the production of food, packaging, cosmetics, perfumery, hygiene products, pharmaceuticals, animal nutrition and products dedicated to health. Some products of natural origin, mainly derived from essential oils, present an antimicrobial action against several microorganisms and have been applied with this function. Geranyl acetate and neryl acetate are esters derived from geraniol and nerol, are found in essential oils of several plants, but in relatively low amounts, which makes their extraction unfeasible and makes its production through esterification reactions necessary. In the esterification reactions for the synthesis of these compounds, acidic homogeneous catalysts have been used, which have several disadvantages, including the difficulty of separation, aggression to equipment and the environment. Furthermore, enzymes have been used as heterogeneous catalyst, but they have high sensitivity to operating conditions and greater difficulty for the reaction control. In this context, the objective of this thesis was to synthesize geranyl and neryl acetates from direct esterification between geraniol and nerol with acetic anhydride by heterogeneous catalysis using the Lewatit® GF 101 ion exchange resin as catalyst, as well as, evaluate the esters obtained for antimicrobial activity and oral toxicity with a view to future applications as antimicrobial additives. The results showed that it is possible to carry out ester synthesis with high conversion efficiencies and selectivity, with optimal experimental condition at temperature of 40 °C, catalyst content of 7% and molar ratio of 1:4 (alcohol:acetic anhydride). Complete conversion of geraniol was achieved in 70 minutes of reaction with 95.94% selectivity for geranyl acetate, while complete conversion of nerol was achieved in 40 minutes with 82.34% selectivity for neryl acetate. The reaction rate was controlled only by the alcohol decay. The value obtained for the main reaction kinetic constant found by a pseudo-homogeneous model was 31 times greater than that of the parallel reaction for the geranyl acetate synthesis and 6 times greater for the neryl acetate synthesis. The resin demonstrated low loss of catalytic activity for 3 reuse cycles. The compounds showed antimicrobial action for Gram-positive (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) with a minimum inhibitory concentration between 3 mg·mL⁻¹ – 85 mg·mL⁻¹ and for fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*) with concentrations between 75 µg·mL⁻¹ – 400 µg·mL⁻¹. The evaluation of the compounds' oral toxicity showed that the lethal dose is between 2000 mg·kg⁻¹ and 5000 mg·kg⁻¹ and when ingested in repeated doses of up to 1 mg·kg⁻¹ the compounds do not showed toxicity. The combination of the obtained results allows concluding the synthesis of geranyl and neryl acetate by the proposed route is viable and that they have potential to be used as non-toxic antimicrobial additives for several applications in the industry.

Keywords: Geranyl acetate. Neryl acetate. Heterogeneous catalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geraniol: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.	29
Figura 2 – Nerol: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.	30
Figura 3 – Acetato de geranila: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.	32
Figura 4 – Acetato de nerila: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.	32
Figura 5 – Reação de esterificação entre álcool e ácido carboxílico via catálise ácida.	36
Figura 6 – Fluxograma com as principais etapas das metodologias empregadas no trabalho.	65
Figura 7 – Microplacas utilizadas no teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	77
Figura 8 – Cromatograma de CG–FID para a síntese do acetato de geranila nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (geraniol:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de geraniol de 3 mmol e tempo de reação de 2 h sem a utilização de catalisador (a) e com a utilização de 3% (m/m) do catalisador Lewatit® GF 101 (b).	88
Figura 9 – Cromatograma de CG–FID para a síntese do acetato de nerila nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (nerol:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de nerol de 3 mmol e tempo de reação de 2 h sem a utilização de catalisador (a) e com a utilização de 3% (m/m) do catalisador Lewatit® GF 101 (b).	89
Figura 10 – Esquema para a reação de esterificação na síntese de acetato de geranila (a) e acetato de nerila (b).	90
Figura 11 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para a conversão de geraniol em relação à interação de teor de catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (geraniol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (geraniol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.	93
Figura 12 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para o rendimento de acetato de geranila em relação à interação de teor de catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (geraniol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (geraniol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.	94
Figura 13 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para a conversão de nerol em relação à interação de teor catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (nerol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (nerol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.	96
Figura 14 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para o rendimento de acetato de nerila em relação à interação de conteúdo do catalisador com temperatura (a) e (b), razão	

molar (nerol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (nerol:anidrido acético) com conteúdo de catalisador (e) e (f), respectivamente.....	97
Figura 15 – Conversão e seletividade em função do tempo nas condições de reação ótimas obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.	99
Figura 16 – Concentração em função do tempo em condições ótimas de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.	102
Figura 17 – Taxa de reação em função da concentração de álcool em condições ótimas de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.....	103
Figura 18 – Esquema sugerido para o mecanismo da síntese de (a) acetato de geranila a partir da esterificação do geraniol e (b) acetato de nerila a partir da reação de esterificação do nerol com anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101.	106
Figura 19 – Conversão e seletividade da reação nos ciclos de reutilização da resina Lewatit® GF 101 como catalisador em condições ótimas obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila em 70 min de reação e (b) acetato de nerila em 40 min de reação.....	107
Figura 20 – Espectro de FTIR obtido para a resina Lewatit® GF 101 usada como catalisador na reação de esterificação para síntese do acetato de geranila a partir de geraniol e anidrido acético.....	109
Figura 21 – Espectro obtido com o acetato de geranila sintetizado a partir da reação de geraniol e anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 de (a) RMN ¹³ C, (b) DEPT 135 de RMN ¹³ C e (c) RMN ¹ H.	111
Figura 22 – Espectro obtido com o acetato de nerila sintetizado a partir da reação de nerol e anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 de (a) RMN ¹³ C, (b) DEPT 135 de RMN ¹³ C e (c) RMN ¹ H.....	113
Figura 23 – Espectro de FTIR obtido para as amostras de geraniol, acetato de geranila e anidrido acético nos números de onda de (a) 4000 cm ⁻¹ a 500 cm ⁻¹ , (b) 3800 cm ⁻¹ a 2200 cm ⁻¹ , (c) 2200 cm ⁻¹ a 1600 cm ⁻¹ e (d) 1600 cm ⁻¹ a 500 cm ⁻¹	116

Figura 24 – Espectro de FTIR obtido para as amostras de nerol, acetato de nerila e anidrido acético nos números de onda de (a) 4000 cm ⁻¹ a 500 cm ⁻¹ , (b) 3800 cm ⁻¹ a 2200 cm ⁻¹ , (c) 2200 cm ⁻¹ a 1600 cm ⁻¹ e (d) 1600 cm ⁻¹ a 500 cm ⁻¹	117
Figura 25 – Cromatograma de CG–FID para as amostras de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.	119
Figura 26 – Termogramas obtidos pela TGA para as amostras de (a) geraniol, (b) acetato de geranila, (c) nerol e (d) acetato de nerila.	120
Figura 27 – Difusão em ágar com inóculo de 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹ para a atividade antibacteriana de geraniol (I), acetato de geranila (II), nerol (III) e acetato de nerila (IV) com: (a) <i>B. cereus</i> , (b) <i>E. coli</i> , (c) <i>P. aeruginosa</i> , (d) <i>P. mirabilis</i> , (e) <i>S. aureus</i> e (f) <i>S. typhimurium</i>	122
Figura 28 – Microdiluição em caldo com inóculo de 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de geraniol (I, colunas 1, 2 e 3), acetato de geranila (I, colunas 5, 6 e 7), nerol (II, colunas 1, 2 e 3) e acetato de nerila (II, colunas 5, 6 e 7) com (a) <i>B. cereus</i> , (b) <i>E. coli</i> , (c) <i>P. aeruginosa</i> , (d) <i>P. mirabilis</i> , (e) <i>S. aureus</i> e (f) <i>S. typhimurium</i>	125
Figura 29 – Microdiluição em caldo com inóculo de 10 ⁸ UFC·mL ⁻¹ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acetato de nerila (colunas 1, 2 e 3) frente à bactéria <i>P. mirabilis</i> com a concentração de composto de 85 mg·mL ⁻¹ na linha A e demais diluições reduzindo proporcionalmente pela metade até a linha H.	127
Figura 30 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra a levedura <i>C. albicans</i> (24 h) em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) 1,00 µg·mL ⁻¹ , (c) 0,50 µg·mL ⁻¹ , (d) 0,25 µg·mL ⁻¹ , (e) 0,12 µg·mL ⁻¹ e (f) 0,06 µg·mL ⁻¹ , (III) acetato de geranila e (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) 125,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 100,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 75,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 62,5 µg·mL ⁻¹ e (f) 50,0 µg·mL ⁻¹	131
Figura 31 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra o fungo <i>A. flavus</i> em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) 8,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 4,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 2,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 1,0 µg·mL ⁻¹ e (f) 0,5 µg·mL ⁻¹ , (III) acetato de geranila para (a) amostra controle, (b) 125,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 100,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 75,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 50,0 µg·mL ⁻¹ e (f) 25,0 µg·mL ⁻¹ , (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) 400,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 375,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 350,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 325,0 µg·mL ⁻¹ e (f) 300,0 µg·mL ⁻¹	132
Figura 32 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra o fungo <i>A. niger</i> em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) 8,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 4,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 2,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 1,0 µg·mL ⁻¹ e (f) 0,5 µg·mL ⁻¹ , (III) acetato de geranila para (a) amostra controle, (b) 250,0 µg·mL ⁻¹ , (c) 200,0 µg·mL ⁻¹ , (d) 150,0 µg·mL ⁻¹ , (e) 100,0	

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) $350,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $300,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $250,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $200,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $150,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	133
Figura 33 – Efeito do tratamento agudo com geraniol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.....	138
Figura 34 – Efeito do tratamento agudo com geraniol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado pelo teste <i>t</i> não pareado para (a) baço e (b) glândulas suprarrenais.	139
Figura 35 – Efeito do tratamento agudo com nerol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar. ...	139
Figura 36 – Efeito do tratamento agudo com acetato de geranila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.....	140
Figura 37 – Efeito do tratamento agudo com acetato de nerila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.....	141
Figura 38 – Efeito do tratamento agudo com acetato de nerila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo do baço em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado pelo teste <i>t</i> não pareado.....	142
Figura 39 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).	145
Figura 40 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).	146
Figura 41 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas	

bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	152
Figura 42 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	153
Figura 43 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	159
Figura 44 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	160
Figura 45 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	166
Figura 46 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional <i>post hoc</i> Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores utilizados no DCCR para 3 fatores na esterificação de geraniol e nerol com anidrido acético.....	69
Tabela 2 – Concentrações de composto na solução e nos micropoços usados no teste de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima de geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila frente a cada bactéria.	78
Tabela 3 – Concentrações de composto usadas no teste de diluição em ágar para determinação da concentração inibitória mínima de geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila contra cada fungo.....	81
Tabela 4 – Conversão e seletividade para a reação de síntese de acetato de geranila e acetato de nerila com e sem o uso de catalisador nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (álcool:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de álcool de 3 mmol e tempo de reação de 2 h.	91
Tabela 5 – Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de conversão de geraniol e rendimento de acetato de geranila para o tempo de reação de 15 min, agitação controlada de 250 rpm e conteúdo inicial de geraniol de 3 mmol.	92
Tabela 6 – Matriz de delineamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de conversão de nerol e rendimento de acetato de nerila para o tempo de reação de 15 min, agitação controlada de 250 rpm e conteúdo inicial de nerol de 3 mmol.	95
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos e estatísticos nas condições ideais de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol).	104
Tabela 8 – Espessuras dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em ágar para determinação da atividade antibacteriana dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila frente às bactérias <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. typhimurium</i>	123
Tabela 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila obtida pela técnica da microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL ⁻¹ frente às bactérias <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. typhimurium</i>	127

Tabela 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila obtida pela técnica da diluição frente à levedura <i>C. albicans</i> e aos fungos <i>A. flavus</i> e <i>A. niger</i>	134
Tabela 11 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	148
Tabela 12 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	149
Tabela 13 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ , via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	150
Tabela 14 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	150
Tabela 15 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	151
Tabela 16 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	151
Tabela 17 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	154
Tabela 18 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	155
Tabela 19 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	156
Tabela 20 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	156

Tabela 21 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	157
Tabela 22 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	158
Tabela 23 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	161
Tabela 24 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	162
Tabela 25 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	163
Tabela 26 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	163
Tabela 27 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	164
Tabela 28 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geranila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	165
Tabela 29 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	168
Tabela 30 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	169
Tabela 31 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	170

Tabela 32 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	170
Tabela 33 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).....	171
Tabela 34 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerila (1 mg·kg ⁻¹ , 2 mg·kg ⁻¹ e 4 mg·kg ⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).	171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BF ₃	Trifluoreto de boro
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Biocida Mínima
CCAC	<i>Canadian Council on Animal Care</i>
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
CG-FID	Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama
CG-MS	Cromatografia gasosa com Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
ClO ₂	Dióxido de cloro
COL	Colesterol total
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRE	Creatinina
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E	Eosinófilos
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeCl ₃	Cloreto férrico
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
GLU	Glicose

Hb	Hemoglobina
HCT	Hematócitos
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HF	Ácido fluorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
L	Linfócitos
LD ₅₀	<i>Lethal Dose</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LOAEL	<i>Lowest Observable Adverse Effect Level</i>
M	Monócitos
MCH	<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
MCHC	<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i>
N	Neutrófilos
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBR	<i>Packed Bed Reactor</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SbF ₅	Pentafluoreto de antimônio
SDT	Sólidos Dissolvidos Totais
SiF ₄	Tetrafluoreto de silício
SO ₂	Dióxido de enxofre
SnCl ₄	Tetracloroeto de estanho
SSE	<i>Sum Square Error</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TiCl ₄	Tetracloroeto de titânio

TiO ₂	Dióxido de titânio
TRI	Triglicerídeos
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
ZnCl ₂	Cloreto de zinco
ZrCl ₄	Tetracloreto de zircônio

LISTA DE SÍMBOLOS

α, β, γ	Constantes de ordem de reação
C_A	Concentração de álcool (geraniol ou nerol)
C_B	Concentração de anidrido acético
C_C	Concentração de éster (acetato de geranila ou acetato de nerila)
C_D	Concentração de ácido acético
C_E	Concentração de subprodutos
C_{A0}	Concentração inicial de álcool (geraniol ou nerol)
C_{B0}	Concentração inicial de anidrido acético
C_{C0}	Concentração inicial de éster (acetato de geranila ou acetato de nerila)
C_{E0}	Concentração inicial de subprodutos
k_1, k_2	Constantes cinética das reações
p	Probabilidade de significância
R^2	Coefficiente de determinação
$R^2_{adj.}$	Coefficiente de determinação ajustado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	OBJETIVOS.....	28
1.1.1	Objetivo Geral	28
1.1.2	Objetivos Específicos.....	28
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	29
2.1	ÁLCOOIS E ÉSTERES TERPENÍLICOS	29
2.1.1	Geraniol e nerol	29
2.1.2	Acetato de geranila e acetato de nerila	31
2.2	REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO	35
2.2.1	Catálise homogênea	37
2.2.2	Catálise heterogênea.....	37
2.2.3	Resinas de troca iônica.....	38
2.2.4	Parâmetros que influenciam na reação de esterificação.....	40
2.3	ADITIVOS ANTIMICROBIANOS	41
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	45
3.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS	45
3.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS	54
3.3	TOXICIDADE DOS COMPOSTOS	61
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS	66
4.1.1	Avaliação do uso do catalisador	66
4.1.2	Efeito das variáveis nas reações de esterificação	69
4.2	ESTUDO CINÉTICO.....	70
4.3	AVALIAÇÃO DOS CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR	71
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	72
4.4.1	Caracterização química	73
4.4.2	Caracterização térmica	74
4.4.3	Avaliação da ação antibacteriana	75
4.4.4	Avaliação da ação antifúngica.....	80
4.4.5	Avaliação da toxicidade	82
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS	87

5.1.1	Avaliação do uso do catalisador	87
5.1.2	Efeito das variáveis nas reações de esterificação	91
5.2	ESTUDO CINÉTICO E MECANISMO PROPOSTO	98
5.2.1	Cinética das reações de esterificação	98
5.2.2	Taxa de reação	101
5.2.3	Mecanismo proposto	105
5.3	AVALIAÇÃO DOS CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR	107
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	111
5.4.1	Caracterização química	111
5.4.2	Caracterização térmica	120
5.4.3	Avaliação da ação antibacteriana	121
5.4.4	Avaliação da ação antifúngica	130
5.4.5	Avaliação da toxicidade dos compostos	137
6	CONCLUSÕES	176
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	178
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Sintetizar acetato de geranila e acetato de nerila a partir de reação de esterificação via catálise heterogênea, pela utilização da resina de troca iônica Lewatit® GF 101 como catalisador.

Por que?

- ✓ O acetato de geranila e o acetato de nerila são ésteres com potencial atividade antimicrobiana.
- ✓ São compostos naturais que podem, *in tese*, ser obtidos pela reação de esterificação de geraniol e nerol com ácido acético ou anidrido acético.
- ✓ Para produzir compostos com maior estabilidade química e térmica e com menor toxicidade no intuito de serem empregados como agentes antimicrobianos.
- ✓ Para aumentar a viabilidade de produção desses compostos por rotas sustentáveis.
- ✓ Para alcançar elevadas eficiências de conversão por rotas com maior controle reacional e fácil separação do catalisador, aumentando a compatibilidade com os processos industriais.

Quem já fez?

- ✓ Poucos trabalhos foram encontrados na literatura com a produção de acetato de geranila e nerila via reação de esterificação.
- ✓ A maioria dos trabalhos realizados trata de catálise enzimática. São escassos os trabalhos de catálise heterogênea com resina de troca iônica para estes compostos.
- ✓ Nenhum trabalho foi encontrado para a produção dos compostos abordados utilizando a resina de troca iônica Lewatit® GF 101.
- ✓ Apenas um trabalho envolvendo a resina de troca iônica Lewatit® GF 101 foi encontrado e foi para a produção de acetato de eugenila.
- ✓ A maioria dos estudos da atividade antimicrobiana envolvendo esses compostos aborda a presença dos mesmos em óleos essenciais juntamente com diversos outros compostos. São escassos os trabalhos abordando os compostos isolados ou em nível de pureza elevado.
- ✓ São escassos os trabalhos referentes à toxicidade dos compostos abordados.

Hipóteses

- ✓ É possível obter acetato de geranila e nerila via reação de esterificação direta de geraniol e nerol com anidrido acético catalisada pela resina de troca iônica Lewatit® GF 101.
- ✓ O emprego deste catalisador proporciona altas conversões de reação.
- ✓ Os compostos acetato de geranila e acetato de nerila apresentam ação antimicrobiana quando isolados ou em grau de pureza elevado.
- ✓ Os compostos acetato de geranila e acetato de nerila apresentam grau de toxicidade aceitável para seu uso como aditivo antimicrobiano.

Métodos experimentais

- ✓ Ensaios das reações de esterificação (acompanhamento por CG-FID).
- ✓ Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos (difusão em ágar, microdiluição em caldo).
- ✓ Avaliação da atividade antifúngica dos compostos (diluição em ágar).
- ✓ Avaliação da toxicidade dos compostos (aguda e subaguda).
- ✓ Caracterização química e térmica dos compostos (CG-MS, FTIR, RMN, TGA).
- ✓ Avaliação da influência das variáveis e otimização das condições operacionais (acompanhamento por CG-FID).
- ✓ Estudo cinético e reutilização do catalisador (acompanhamento por CG-FID).

Respostas

- ✓ Determinar as condições ótimas para produção dos ésteres em elevadas conversões.
- ✓ Determinar a capacidade dos ésteres atuarem como agentes antimicrobianos atóxicos.
- ✓ Avaliar a cinética reacional e a reutilização do catalisador.

1 INTRODUÇÃO

O controle microbiológico é um processo que está relacionado com a redução e a prevenção de doenças e é necessário em diversas áreas de aplicação, como na indústria de alimentos, de fármacos, de cosméticos, de produtos para a nutrição animal e para a saúde, entre outros. Para estes processos, a indústria busca constantemente novos materiais e agentes antimicrobianos para atender as demandas do mercado. Os agentes antimicrobianos são conhecidos como compostos que possuem a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos, como bactérias e fungos.

Características especiais, como a ação antimicrobiana, podem ser agregadas aos produtos durante o seu processo de produção por meio do uso de aditivos, principalmente de origem orgânica, natural ou sintética. Embora os agentes antimicrobianos sintéticos inibam efetivamente o crescimento de micro-organismos, a maioria deles é tóxica e pode causar efeitos adversos na saúde humana, além de problemas ambientais, como é o caso dos compostos à base de triclosan. Porém, vários extratos de plantas podem ser eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dependendo do tipo de componente químico presente (BABU; RAVINDRA, 2014).

O interesse do uso de compostos antibacterianos naturais, como os óleos essenciais e os extratos de várias espécies de plantas comestíveis e medicinais, bem como de ervas e especiarias, cresce continuamente. Tais compostos são usados como agentes antimicrobianos naturais para a preservação de alimentos e bebidas, em produtos de higiene, em fármacos, cosméticos, entre outros, devido à presença de moléculas com o princípio ativo antibacteriano e antifúngico (TIAN et al., 2017; CHINTALURI et al., 2014; NYCHAS; TASSOU; SKANDAMIS, 2003).

Em geral, os óleos essenciais derivados de plantas são considerados compostos potencialmente eficazes contra micro-organismos e são líquidos oleosos aromáticos, voláteis à temperatura ambiente, caracterizados por um forte aroma, sendo raramente coloridos e geralmente tendo densidade menor que a água. São misturas de diferentes compostos, mas os principais componentes são terpenóides e terpenos (hidrocarbonetos cíclicos). As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais dependem da combinação e das proporções dos diferentes compostos encontrados na sua constituição (MIHAI; POPA, 2015; PAUL; DUBEY; KANG, 2011; RUIZ; FLOTATS, 2014).

O nerol é um exemplo de monoterpreno. Este álcool é líquido e volátil nas condições normais de temperatura e pressão, sendo um importante componente de óleos essenciais. Este

composto é extraído a partir de especiarias, tais como neroli (*Citrus aurantium*), roseira (*Rosa damascena*) e lavanda (*Lavandula dentata*, *Lavandula stoechas* e *lavandula multifida*) (WANG et al., 2015; TIAN et al., 2013). A atividade antimicrobiana do nerol contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra alguns fungos como *Cândida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* é comprovada (WANG et al., 2015; TIAN et al., 2013; JIROVETZ et al., 2007). Além disso, este monoterpene mostra um elevado potencial para aumentar a vida útil e a segurança de alimentos perecíveis (HOLLEY; PATEL, 2005).

O geraniol, por sua vez, também é um álcool monoterpene e isômero do nerol, sendo extraído com elevada concentração do óleo de palmarosa (FAHLBUSCH et al., 2003; SCHERER et al., 2009). Este composto também possui ação antimicrobiana comprovada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DUARTE et al., 2005; JIROVETZ et al., 2007; CHEN; VILJOEN, 2010) e frente a fungos, como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014; MARTINS; SOUZA, 2015; PEREIRA; LIMA, 2017).

A principal desvantagem do uso de óleos essenciais em aplicações industriais como aditivos antimicrobianos é a sua volatilidade. Muitos processos envolvem altas temperaturas, superiores às temperaturas de volatilização dos óleos essenciais. Assim, uma alternativa que vem sendo estudada é a utilização de ésteres derivados dos álcoois presentes nos óleos essenciais, pois os ésteres apresentam propriedades físicas, químicas e térmicas mais estáveis que o seu precursor (álcool), tal como maiores temperaturas de volatilização.

Os ésteres são substâncias orgânicas frequentemente encontradas na natureza e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios para realçar e imitar sabores e aromas (OLIVEIRA et al., 2014).

O acetato de geranila é considerado um dos ésteres derivados do geraniol de maior valor agregado devido às suas propriedades organolépticas, cor, sabor e aroma, sendo amplamente utilizado na indústria. Apresenta um sabor frutado doce e aroma de rosa, sendo classificado como aroma comestível para que seu uso também seja permitido na indústria de alimentos (XIONG et al., 2014). Já o acetato de nerila é um dos principais ésteres derivados do nerol e possui propriedades e aplicações semelhantes ao seu isômero (acetato de geranila), sendo que sua principal aplicação atualmente é na perfumaria, tal como o acetato de geranila. Além disso, alguns estudos associam a presença do acetato de geranila e do acetato de nerila

em óleos essenciais com a atividade antimicrobiana dos óleos contra alguns fungos e bactérias (JULIANO et al., 2018; BLAŽEKOVIĆ et al., 2018).

O método mais comum para a obtenção de ésteres, tanto em processos industriais quanto em escala laboratorial, tem sido a partir de reações diretas entre ácidos carboxílicos e álcoois. Essas reações são conhecidas como reações de esterificação de Fisher (OLIVEIRA et al., 2014). Nestas reações, os ésteres derivados dos ácidos carboxílicos são produzidos a partir de álcoois com ácidos (CAVALCANTE et al., 2015), sendo as propriedades físicas e químicas do éster formado determinadas pelos compostos empregados.

Para que as reações de esterificação sejam viáveis industrialmente, é necessário o emprego de catalisadores. Nas principais reações de esterificação, os catalisadores geralmente usados são ácidos inorgânicos fortes solúveis, caracterizando-se como uma catálise homogênea. Entretanto, o seu uso apresenta diversas desvantagens, dentre as quais se destaca a dificuldade de separação do catalisador do meio reacional, a baixa seletividade e a ocorrência de reações paralelas. Estes fatores influenciam no grau de pureza do produto final, limitando as aplicações. Além disso, a corrosão do equipamento e a poluição ambiental também são limitações para o emprego da catálise homogênea (OTERA; NISHIKIDO, 2009; BHAVSAR; YADAV, 2019).

A utilização de catálise heterogênea nas reações de esterificação tem sido uma alternativa estudada na literatura científica e apresenta diversas vantagens em relação à catálise homogênea, tais como, a facilidade de separação do meio reacional, a possibilidade de reutilização do catalisador, a facilidade de manuseio e armazenamento, dentre outras (YADAV; RAHUMAN, 2003). Entretanto, para os compostos estudados neste trabalho, a maioria das reações de esterificação direta por catálise heterogênea envolve a utilização de enzimas como catalisadores (CLAON; AKOH, 1994; BARTLING et al., 2001; IKEDA; KUROKAWA, 2001; CHEN; LIN; CHANG, 2002; PERES; SILVA; BARREIROS, 2003; COUTO, et al., 2011; LOZANO; BERNAL; NAVARRO, 2012). Apesar de elevadas eficiências de conversão serem atingidas com a catálise enzimática, este tipo de reação apresenta grande dificuldade de controle, pois requer o monitoramento e controle de diversos parâmetros reacionais, o que torna o processo oneroso. Neste sentido, as rotas químicas com a utilização de catalisadores heterogêneos que possam ser substitutos das enzimas vêm ganhando destaque, dentre os quais, encontram-se as resinas de troca iônica (CHEN et al., 2016).

A utilização das resinas de troca iônica para catalisar reações de esterificação tem sido uma tendência, principalmente para produção de biodiesel, pois tem apresentado elevadas

conversões e alta seletividade. As resinas de troca iônica apresentam as vantagens já citadas dos catalisadores heterogêneos em relação aos homogêneos. Além disso, quando comparada à catálise enzimática, a utilização das resinas de troca iônica apresenta outras vantagens, tais como, maior estabilidade à temperatura e ao pH do meio reacional, o que aumenta o *range* para aplicação e a possibilidade de controlar um menor número de parâmetros reacionais, o que reduz o custo do processo (YADAV; RAHUMAN, 2003).

Entretanto, apesar de todas as vantagens citadas, poucos trabalhos foram encontrados na literatura para a síntese do acetato de geranila e do acetato de nerila via reação de esterificação direta catalisada por resinas de troca iônica (CHEN et al., 2016), o que mostra a necessidade e a oportunidade de estudos com essa rota. Não foram encontrados trabalhos na literatura que correlacionem a obtenção dos ésteres citados via reação de esterificação com catálise heterogênea usando, como catalisador, a resina de troca iônica Lewatit® GF 101, sendo que a maioria dos trabalhos referem-se à catálise enzimática e poucos a outros catalisadores sólidos. Além disso, poucos estudos têm sido encontrados na literatura sobre a atividade antimicrobiana do acetato de geranila e do acetato de nerila, sendo que a maioria dos trabalhos referem-se aos óleos essenciais contendo os ésteres em sua composição, a exemplo dos trabalhos relatados por Djihane et al. (2016), Dănilă et al. (2018), Khayyat e Sameeh (2018) e Yi et al. (2019). Também, destaca-se que não foram encontrados trabalhos detalhados na literatura que relatam a toxicidade do acetato de geranila e do acetato de nerila em elevado grau de pureza.

Neste contexto, verifica-se que a realização de estudos que empreguem rotas de reação de esterificação para produção dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila a partir de catálise heterogênea com resina de troca iônica contribuirá para a implantação de processos com elevada eficiência de conversão, maior compatibilidade com as necessidades industriais e maior sustentabilidade. Tais fatos poderão conduzir à obtenção de compostos com elevado grau de pureza, com potencial atividade antimicrobiana e baixa toxicidade. Os resultados pretendidos são uma necessidade e uma oportunidade para diversos segmentos industriais, considerando a potencial aplicação destes compostos como aditivos antimicrobianos num mercado muito grande de aditivos aplicados em alimentos, fármacos e de novos materiais antibacterianos e antifúngicos.

Desta forma, neste trabalho, pretende-se sintetizar os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, derivados dos compostos naturais geraniol e nerol, por meio de reação de esterificação direta via catálise heterogênea utilizando uma resina de troca iônica comercial e

com altas conversões, obtendo compostos com ação antimicrobiana e atóxicos com maior estabilidade química e térmica do que seus compostos precursores.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese.

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar o acetato de geranila e o acetato de nerila via reações de esterificação catalisadas pela resina de troca iônica Lewatit® GF 101 e avaliar os ésteres obtidos quanto à atividade antimicrobiana e à toxicidade oral.

1.1.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, destacam-se:

- ✓ verificar se o catalisador proposto pode ser empregado na reação de esterificação para a síntese dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila;
- ✓ avaliar a influência das principais variáveis (temperatura, teor de catalisador e razão molar entre álcool e anidrido acético) e definir as condições operacionais ótimas das reações de esterificação de síntese do acetato de geranila e acetato de nerila com o catalisador Lewatit® GF 101 com vistas à eficiência de conversão química;
- ✓ avaliar as cinéticas das reações de esterificação do acetato de geranila e acetato de nerila e propor um mecanismo para estas reações;
- ✓ avaliar a possibilidade de reutilização do catalisador nas reações de esterificação de síntese do acetato de geranila e do acetato de nerila;
- ✓ analisar se os compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos pela rota proposta apresentam ação antimicrobiana frente a fungos e bactérias;
- ✓ avaliar a toxicidade oral dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila sintetizados pela reação de esterificação proposta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção são abordados conceitos fundamentais sobre a reação de esterificação, bem como das principais propriedades físicas e químicas dos compostos geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila. Também é explanado a respeito dos principais catalisadores de reações de esterificação.

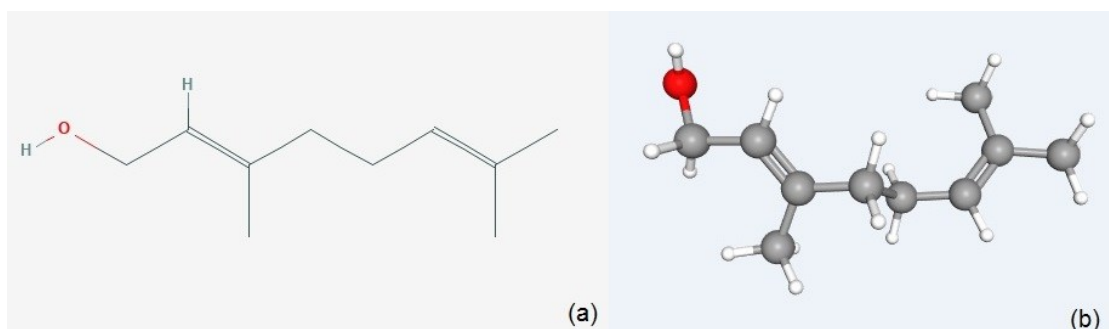
2.1 ÁLCOOIS E ÉSTERES TERPENÍLICOS

Os conceitos abordados nesta seção estão subdivididos para os álcoois geraniol e nerol e para os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, os reagentes e os produtos das reações de esterificação estudadas nesta tese.

2.1.1 Geraniol e nerol

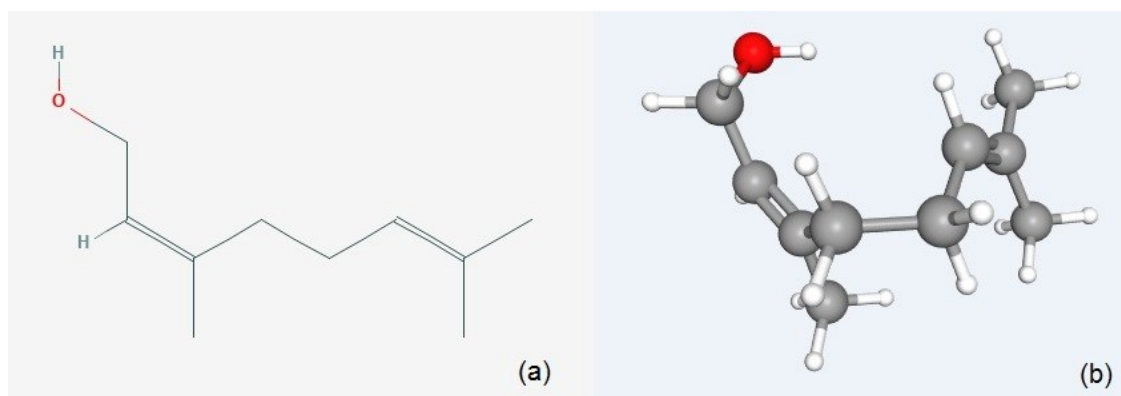
O álcool geraniol e seu isômero nerol (*trans* e *cis* de 3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-ol) são classificados como álcoois terpenos primários acíclicos. Estes compostos antimicrobianos são naturalmente encontrados como componentes de óleos essenciais em citronela, rosa, limão e gerânio (GUPTA et al., 2007; PAROUL et al., 2010). Possuem fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$, são líquidos lípidos incolores, insolúveis em água e solúveis na maioria dos solventes orgânicos, com massa molecular de $154,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e densidade relativa de 0,8894 e 0,8810 para geraniol e nerol, respectivamente (PUBCHEM, 2019). A estrutura química e a conformação molecular 3D do geraniol são apresentadas na Figura 1 e do nerol, na Figura 2.

Figura 1 – Geraniol: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.



Fonte: PUBCHEM (2019).

Figura 2 – Nerol: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.



Fonte: PUBCHEM (2019).

O geraniol também é chamado de rodinol e é o principal constituinte do óleo de rosa e palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia), com cerca de 80% da composição do óleo essencial. Seu aroma está associado à rosa doce, um dos principais motivos pelo qual é comumente usado em perfumes, sendo um dos álcoois mais importantes para os produtos de fragrâncias. Devido ao alto teor no óleo de palmarosa, o geraniol é aplicado como um composto antisséptico, repelente de mosquitos e como analgésico. Baixos teores de éster, principalmente o acetato de geranila, também estão presentes no óleo de palmarosa. Estes baixos teores são produzidos por reações de esterificação do geraniol, formando o acetato correspondente que, quando hidrolisado, volta a formar novamente as moléculas de geraniol. Essas reações são aceleradas por meio de mecanismos biocatalíticos realizados pelas enzimas esterases, que ocasionam variações nos teores destes compostos nos óleos essenciais ao longo do período de inflorescência, no qual as plantas são mais susceptíveis a estes mecanismos, sendo fundamentais para a formação do aroma característico do óleo (DUBEY; LUTHRA, 2000).

O nerol também possui um agradável odor de rosa doce e é encontrado em pequenas concentrações em diversos óleos essenciais (FAHLBUSCH et al., 2003). Dentre os principais, destacam-se o óleo de rosa damascena, os óleos essenciais de *Lavandula stoechas* e *Lavandula multifida* e o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (WANG et al., 2015; TIAN et al., 2013). Quanto à toxicidade do nerol, a JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), em conjunto com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO e a Organização Mundial da Saúde – OMS concluíram que este álcool terpeno não apresenta riscos quanto a sua ingestão por humanos e animais (BELSITO et al., 2008).

Diferentes atividades biológicas têm sido atribuídas aos isômeros geraniol e nerol. O geraniol tem sido associado à inibição de compostos que favorecem o crescimento de células cancerígenas, bem como contribui para a potencialização de efeitos antitumorais (GUPTA et al., 2007). Além disso, o geraniol possui propriedades anti-infecciosas, imunoestimulantes, bactericidas e atua como agente pesticida com baixa toxicidade (MURCIA et al., 2018). Derivados de geraniol e de nerol, principalmente ésteres como acetato de geranila e acetato de nerila, também têm sido associados a efeitos supressores de proliferação de células cancerígenas (TATMAN; MO, 2002) e inseticidas para o controle de pragas (XIE et al., 2014).

As formas de obtenção mais comuns de nerol e de geraniol são por isolamento de óleos essenciais de plantas (FAHLBUSCH et al., 2003). Entretanto, a separação dos isômeros geraniol e nerol é difícil, mesmo com o uso de destilação fracionada de alta eficiência, pois os pontos de ebulição são muito próximos (227 °C – 228 °C para o nerol e 229 °C – 230 °C para o geraniol), o que contribui para que coexistam em equilíbrio nos óleos essenciais, sendo um deles, geralmente o geraniol, majoritário sobre o outro (GUPTA et al., 2007).

O geraniol apresenta certo grau de toxicidade, o que limita seu uso na aplicação direta em produtos cosméticos e em alimentos. No entanto, se transformado no seu éster correspondente, o acetato de geranila, pode ser utilizado, apresentando os benefícios do geraniol, porém sem apresentar toxicidade para o produto resultante (XIONG et al., 2014; MURCIA et al., 2018).

2.1.2 Acetato de geranila e acetato de nerila

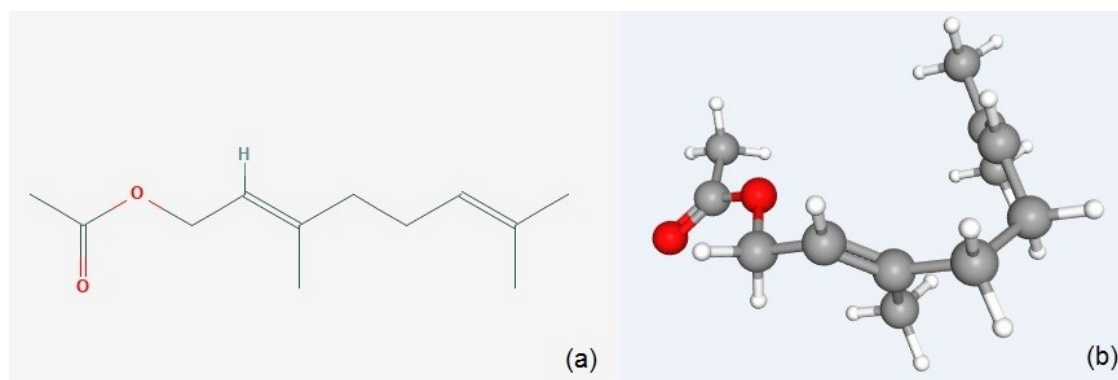
De uma forma geral, as propriedades organolépticas dos ésteres derivados de álcoois terpenílicos contribuem para que sejam amplamente aplicáveis em alimentos, fragrâncias e cosméticos (BELSITO et al., 2008).

Os ésteres derivados do geraniol possuem sabor e aroma agradáveis, dentre os quais se destaca o acetato de geranila, que é um dos principais constituintes de vários óleos essenciais e possui valor econômico considerável (CLAON; AKOH, 1994).

O acetato de geranila é um líquido de leve coloração amarelo claro, com agradável aroma floral e frutado. Pode ser utilizado como agente aromatizante e na produção de fragrâncias (AL-BAWAB et al., 2010; BADGUJAR; BHANAGE, 2014). É um líquido límpido e com odor de lavanda (LEWIS, 2001). É um éster que possui fórmula molecular $C_{12}H_{20}O_2$, peso molecular de $196,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, densidade relativa de 0,907 e ponto de ebulição

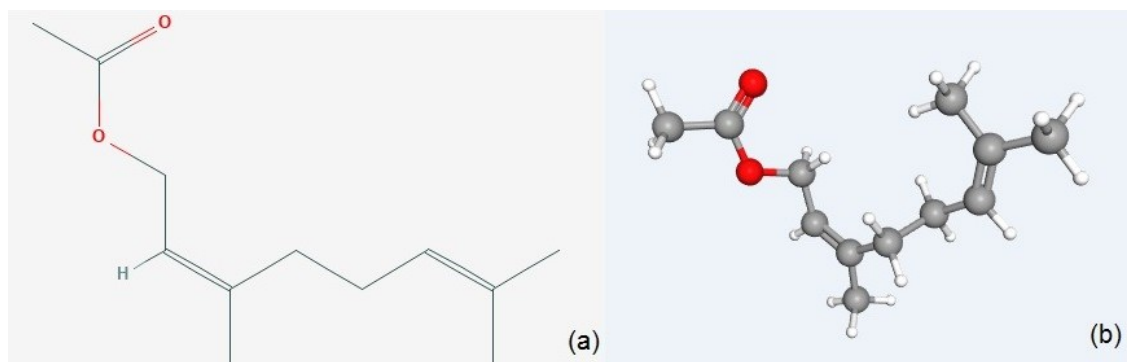
de 245 °C. Seu nome na IUPAC é [(2~{E})-3,7-dimetilocta-2,6-dienil] acetato ou também etanoato de 3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ilo. Seu isômero, o acetato de nerila, é um éster com coloração e aroma semelhantes, denominado pela IUPAC de [(2~{Z})-3,7-dimetilocta-2,6-dienil] acetato, com densidade relativa de 0,9174 e ponto de ebulição de 242 °C (PUBCHEM, 2019). A estrutura química e conformação molecular 3D do acetato de geranila são apresentadas na Figura 3 e do acetato de nerila, na Figura 4.

Figura 3 – Acetato de geranila: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.



Fonte: PUBCHEM (2019).

Figura 4 – Acetato de nerila: (a) estrutura química e (b) conformação molecular 3D.



Fonte: PUBCHEM (2019).

Estes ésteres também podem ser encontrados em compostos naturais, porém geralmente em pequenas quantidades e na presença de vários outros componentes. Bhuiyan, Begum e Sultana (2009) avaliaram o óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum* L), uma erva da família da salsa conhecida por suas propriedades inseticidas e constataram que, dentre os 44 compostos presentes, o acetato de geranila encontrou-se entre os majoritários, com 17,6% da composição, superado apenas pelo linalol, sendo que o geraniol também foi encontrado, mas em quantidades abaixo de 2%. Msaada et al. (2007) avaliaram a composição

do óleo essencial do fruto de coentro (*Coriandrum sativum* L.) em diferentes estágios de maturação e identificaram no primeiro estágio, com os frutos ainda verdes, que a composição predominante foi de acetato de geranila, com aproximadamente 46,3%. Fakhari et al. (2005) encontraram acetato de geranila entre os principais constituintes do óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill), detectando também nerol e acetato de nerila, porém em menores quantidades. Pitarokili et al. (2002) identificaram o acetato de geranila como o terceiro componente em maior quantidade no óleo essencial de salvia (*Salvia sclarea*), com cerca de 12,1% da composição.

Bianchini et al. (2003) avaliaram a composição do óleo essencial de *Helichrysum italicum* (Roth), uma planta mediterrânea de flores amarelas e com característica de arbusto, de diferentes regiões da Europa, e observaram a predominância de ésteres de nerol, sendo o acetato de nerila, o propionato de nerila e o nerol, respectivamente, os compostos com maior presença. Leonardi et al. (2013) avaliaram a composição de 21 amostras de óleo essencial isoladas de *Helichrysum italicum*, as quais foram coletadas em diferentes locais da Toscana na Itália. Nestas, foram identificados 115 componentes, sendo que os óleos foram caracterizados com alto teor de monoterpenos oxigenados, com a presença majoritária do nerol, variando de 2,8% a 12,8%, e de seu derivado éster acetato de nerila, variando entre 5,6% e 45,9% das amostras. Paolini et al. (2006) investigaram a composição de óleos essenciais de *Helichrysum italicum* (Roth) de ilhas toscanas e identificaram o acetato de nerila como principal componente, com variações de 14,9% a 44,5%, enquanto Tucker et al. (1997) encontraram variações de aproximadamente 23,5% a 53,5% de acetato de nerila em óleos de *H. italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.).

Outros estudos em relação à presença destes compostos em óleos essenciais também foram encontrados na literatura. Ebrahimi, Hadian e Ranjbar (2010) encontraram 34 compostos diferentes no óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum* L.), sendo que o acetato de nerila apresentou-se com composição entre 2,3% e 14,2%, abaixo apenas do linalol. Eleni et al. (2009) identificaram 9,44% de acetato de geranila e 4,85% de acetato de nerila dentre os 5 principais componentes do óleo essencial de bergamota (*Citrus aurantium* subsp. *Bergamia*) destilado, sendo que os compostos nerol e geraniol também foram encontrados em menores quantidades. Petrakis et al. (2001) encontraram os acetatos de nerila e geranila dentre os principais componentes dos óleos essenciais das folhas de 5 espécies de *Pinus*, com variações entre 20,9% a 72,9% e 16,7% a 69,9%, respectivamente, dependendo da espécie.

Ganjewala e Luthra (2009) estudaram o óleo essencial isolado de capim limão (*Cymbopogon fl exuosus*) mutante cv., o qual se apresentou rico em geraniol. Os autores observaram que o óleo é composto, principalmente, de geraniol e acetato de geranila, sendo que a proporção entre os dois varia em função do desenvolvimento da folha, pois nos estágios iniciais a composição de acetato de geranila é maior que a do geraniol e, à medida que a folha cresce, a proporção se inverte. Os autores atribuem este efeito à ação da enzima esterase, que atua como catalisador da reação de biossíntese destes compostos. Comportamento semelhante ao citado em relação à composição do álcool e éster ao longo da maturação da folha foi encontrado por Smitha e Rana (2015) para o óleo de palmarosa (*Cymbopogon martini* var. Motia).

O método de extração destes compostos naturais também foi avaliado na literatura. Kakasy et al. (2006) encontraram o geraniol, o nerol, o geranial, o neral, o acetato de geranila e o acetato de nerila como principais constituintes do óleo essencial obtido por hidrodestilação e por extração supercrítica com dióxido de carbono do *Dracocephalum moldavica* L, uma planta herbácea aromática, sendo que os dois compostos majoritários foram o geraniol e o acetato de geranila. Os autores observaram que o extrato supercrítico foi mais rico em acetato de nerila (1,96%) do que o extrato convencional (1,24%), enquanto que, para o acetato de geranila, o extrato convencional apresentou maior composição (27,48%) do que o extrato supercrítico (3,14%). Já para o nerol e para o geraniol, o extrato convencional apresentou maior composição (2,39% e 33,13%) que o supercrítico (0,62% e 1,04%), mostrando que o método de extração interfere na quantidade extraída desses compostos e na reação de esterificação do álcool no éster correspondente.

O acetato de geranila e o acetato de nerila podem ser isolados por fracionamento a vácuo de óleos essenciais. Entretanto, a disponibilidade limitada das fontes naturais dos óleos torna esse método inadequado para a produção industrial em larga escala. Desta forma, outros métodos são necessários para a produção destes ésteres, tais como síntese química, extração enzimática ou biocatálise (XIONG et al., 2014; MURCIA et al., 2018).

Além da disponibilidade limitada das plantas, na maior parte das fontes naturais abordadas, a presença dos acetatos em estágio adequado de colheita para uma produção sustentável é relativamente baixa, apresentando amplas variações na composição. Isto deve-se ao fato de que, à medida que a planta cresce, a transformação dos acetatos em álcoois correspondentes aumenta, o que viabiliza a extração dos álcoois e não dos ésteres, reforçando a importância da síntese destes ésteres a partir de seus álcoois.

2.2 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Os ésteres constituem uma das classes de substâncias químicas largamente encontradas na natureza. Alguns ésteres de baixo peso molecular tendem a apresentar sabor e aroma agradáveis e, por isso, são bastante usados em alimentos e bebidas industrializadas. Normalmente, são usados como aditivos para realçar o aroma de uma bebida ou de um alimento. Na maior parte das vezes, o aroma encontrado em alimentos industrializados é devido à presença dessas substâncias (OLIVEIRA et al., 2014).

Ésteres derivados dos álcoois terpenílicos, dentre eles o acetato de geranila e o acetato de nerila, são considerados produtos naturais devido às suas propriedades organolépticas e amplas aplicações em alimentos, fragrâncias, aditivos, cosméticos, produtos farmacêuticos e de cuidados domiciliares (DHAKE et al., 2011^a; BADGUJAR; BHANAGE, 2014).

A síntese química convencional ou a extração a partir dos recursos vegetais são as formas mais comuns de obtenção de ésteres de álcoois terpenílicos. A principal desvantagem do método de extração é o baixo rendimento e o alto custo com solventes. Já em relação aos métodos de síntese química convencional, destacam-se, como desvantagens, as condições severas de reação, o uso de produtos químicos perigosos, a baixa seletividade, a formação de produtos secundários e a alta ativação energética (DHAKE et al., 2011^b; BADGUJAR; BHANAGE, 2014).

As reações de acilação e esterificação são comercialmente muito importantes, sendo utilizadas na produção de cetonas e ésteres que são empregados como precursores ou aditivos para uma grande variedade de produtos relacionados a perfumes, sabores, produtos farmacêuticos, cosméticos, agroquímicos, alimentos e polímeros, envolvendo a produção de milhares de toneladas ao ano (YADAV; RAHUMAN, 2002).

A produção de ésteres pode ser realizada por diversos tipos de reações, tipicamente classificadas como reações solvolíticas, reações de condensação, processos por radicais livres e sínteses diversas. As reações solvolíticas envolvem a conversão direta de ácidos carboxílicos ou ésteres derivados de ácidos por reação com compostos hidroxílicos, incluindo a esterificação direta de ácidos, a alquilação de sais carboxílicos, a alcóolise de halogenatos de acilo, anidridos, nitrilos, amidas e cetonas, e a transesterificação (YADAV, METHA, 1994; OTERA; NISHIKIDO, 2009).

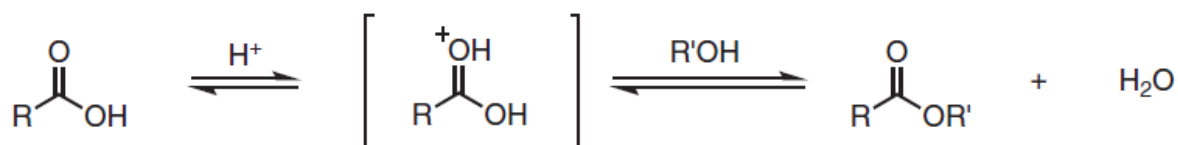
Embora as reações de esterificação ocorram naturalmente na ausência de catalisador, o processo requer elevadas temperaturas e resulta em baixas conversões e, como geralmente os

compostos envolvidos são voláteis, para viabilizar o processo é necessária a utilização de catalisadores (OTERA; NISHIKIDO, 2009).

A produção de ésteres é realizada por diversas rotas. Entretanto, a mais utilizada é a reação de um ácido carboxílico com um álcool na presença de um catalisador, usualmente um ácido (YADAV; METHA, 1994). Como a reação é reversível, estratégias são utilizadas para favorecer a reação direta, tais como a utilização de excesso de reagente e a remoção contínua do éster formado ou do coproduto (água). Este tipo de reação geralmente ocorre em reatores operando em batelada (YADAV; RAHUMAN, 2003).

A catálise ácida é um dos métodos mais populares para este tipo de esterificação. Quando os substratos são resistentes aos ácidos, a reação é geralmente realizada na presença de um ácido de Brønsted (OTERA; NISHIKIDO, 2009). A Figura 5 apresenta a reação de esterificação por catálise ácida.

Figura 5 – Reação de esterificação entre álcool e ácido carboxílico via catálise ácida.



Fonte: OTERA; NISHIKIDO (2009).

Os principais catalisadores utilizados são ácidos de Brønsted, como ácido fluorídrico (HF), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido p-toluenossulfônico, ácido dihidroxifluorobórico, entre outros; ácidos de Lewis, como cloreto de alumínio (AlCl₃), trifluoreto de boro (BF₃), cloreto de zinco (ZnCl₂), tetracloreto de titânio (TiCl₄), tetracloreto de estanho (SnCl₄), cloreto férrico (FeCl₃), pentafluoreto de antimônio (SbF₅), tetracloreto de zircônio (ZrCl₄), tetrafluoreto de silício (SiF₄), entre outros; e metais como estanho, cobre, prata e chumbo, finamente divididos, em conjunção com um reagente onde o ácido é gerado *in situ* (YADAV; RAHUMAN, 2002; YADAV; RAHUMAN, 2003).

A acilação de álcoois é frequentemente realizada por tratamento com ácidos anidridos por serem mais reativos, tornando a reação irreversível. Os ácidos de Brønsted mais utilizados para a reação entre álcoois e anidridos ácidos são ácidos sulfônicos, ácido sulfúrico e ácido perclórico. A principal diferença da utilização de anidridos ácidos em vez de ácidos carboxílicos é que, em vez da formação de água como coproduto, ocorre a formação de ácido (OTERA; NISHIKIDO, 2009).

2.2.1 Catálise homogênea

Os ésteres são quimicamente sintetizados por reações de esterificação usando ácidos orgânicos e inorgânicos fortes. O ácido trifluorometanossulfônico e o ácido sulfúrico são conhecidos como catalisadores homogêneos de reações de esterificação considerados poluentes na indústria (OTERA; NISHIKIDO, 2009; BHAVSAR; YADAV, 2019). No final da reação, os catalisadores homogêneos são neutralizados por meio da formação de sais, procedimento que ocasiona a perda de rendimento, corrosão e geração de resíduo indesejado, que, dependendo do número de estágios e funcionalidade introduzida em cada etapa, pode chegar até a 100 kg para cada kg de produto desejado (YADAV; RAHUMAN, 2003).

Nesse sentido, os principais problemas causados pelo uso de catalisadores homogêneos envolvem a corrosão do equipamento, os riscos de manuseio dos ácidos que não são reutilizados, a neutralização da massa de reação e geração de grandes quantidades de sais dissolvidos, incluindo perda de conversão, rendimento e seletividade. No que tange à poluição ambiental, as estações de tratamento de efluentes envolvem altas cargas de demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos dissolvidos totais (SDT). Além disso, os preços desses produtos finos são muito altos e os volumes são baixos, sendo que a recuperação do catalisador é inviável (YADAV; RAHUMAN, 2002).

Estes catalisadores não são apropriados para a obtenção de ésteres de perfumaria, pois tais aplicações requerem alto grau de pureza. Diferentes técnicas são utilizadas na esterificação dessa classe de compostos e têm sido exploradas como alternativas. Dentre elas estão as reações catalisadas com ácidos sólidos, com resinas de troca iônica, óxidos metálicos, zeólitas, argilas tratadas e catálise enzimática (YADAV; MEHTA, 1994; YADAV; RAHUMAN, 2002; YADAV; RAHUMAN, 2003; YADAV; KADAM, 2012; BHAVSAR; YADAV, 2019).

2.2.2 Catálise heterogênea

A utilização de catálise heterogênea em reações de esterificação envolve várias vantagens. Estes catalisadores são não corrosivos, são fáceis de separar da mistura reacional, podem ser usados repetidamente durante um período prolongado, apresentam facilidade no manuseio e armazenamento, podem ser empregados em diversas configurações de reatores e modos de operação e podem ser empregados em reações catalíticas sólido-fluido, o que possibilita melhor controle de processo e economia (YADAV; RAHUMAN, 2003).

O ácido acético tem sido convencionalmente usado como doador de acila para a síntese de ésteres em reações de esterificação diretas. Em reações catalisadas por enzimas, ele atua como um potente inibidor da atividade enzimática, deixando a taxa de reação inicial e a conversão mais lenta. Por esse motivo, nestas reações, a síntese de ésteres pode ser feita por transesterificação de álcoois com acetatos usando acetato de etila ou acetato de vinila (RIZZI, 1992). Entretanto, quando o acetato de etila é usado como doador de acila, libera o álcool etílico como um subproduto que compete com o geraniol e com o nerol por ataque nucleofílico ao éster carbonílico, inibindo a taxa de reação (BADGUJAR; BHANAGE, 2014).

Uma rota para a produção do acetato de geranila é a esterificação do geraniol com ácido acético. Neste tipo de reação, a catálise heterogênea tem sido utilizada com enzimas imobilizadas, geralmente lipases (CLAON; AKOH, 1994; BARTLING et al., 2001). Em relação à síntese direta, o anidrido acético pode ser utilizado em substituição ao ácido acético por possuir dois grupos acilo, o que aumenta sua reatividade nas reações de esterificação para produção de acetatos (ROMERO et al., 2007).

2.2.3 Resinas de troca iônica

Gelbard (2005) classifica os materiais de troca iônica em três famílias: resinas de troca aniônica em bases com espécies HO^- , RO^- , HCO_3^- ou com ânions orgânicos em reações de substituição; resinas de troca catiônica como ácidos de Brønsted ou Lewis, nas formas de H^+ ou metálicas M^+ ; e resinas de troca aniônica ou catiônica para imobilização de enzimas ou complexos organometálicos.

As resinas de troca iônica têm sido usadas como catalisadores sólidos em reações com temperaturas relativamente baixas e estão disponíveis em uma variedade de formas, sendo que a principal vantagem é a fácil separação e purificação dos produtos. Vários novos catalisadores de resina de troca iônica estão disponíveis no mercado e, em particular, para reações de esterificação. As resinas têm a sua superfície funcionalizada com grupos ácidos extremamente fortes (Brønsted) para minimizar a formação de subprodutos, tais como éteres e olefinas, durante a desidratação do álcool. Assim, os ésteres podem ser produzidos com uma formação mínima de éter como subproduto por meio da reação de um ácido ou éster orgânico com um álcool. Apesar de serem aplicadas para reações com temperatura relativamente baixas, podem ser utilizadas em elevadas temperaturas, dependendo dos reagentes visto que a maioria das resinas comerciais são termicamente estáveis até aproximadamente 120 °C a 150 °C (YADAV; RAHUMAN, 2003).

Geralmente, as resinas possuem elevada seletividade, em função dessa funcionalização superficial e podem ser reutilizadas com perda relativamente baixa da atividade catalítica. As propriedades ácidas obtidas pela funcionalização tornam as resinas de troca iônica catalisadores muito eficientes para as reações de esterificação. As resinas mais indicadas para uso em reações de esterificação direta entre álcoois e ácidos carboxílicos são as resinas fortemente ácidas, essencialmente com a presença de grupos sulfônicos. Quando se utiliza anidridos ácidos, apesar de serem muito mais eletrofílicos do que os ácidos carboxílicos, as resinas sulfônicas ainda assim são frequentemente necessárias para catalisar a reação de esterificação (GELBARD, 2005).

2.2.3.1 Resina polimérica Lewatit® GF 101

A resina Lewatit® GF 101 é uma resina de troca iônica sólida, de base polimérica, formato esférico, aparência opaca, fortemente ácida e com a presença de grupos sulfônicos (ácido sulfônico). Possui uma estrutura porosa, elevado grau de reticulação, boa estabilidade mecânica e pode ser utilizada em meios polares ou apolares. O tamanho da partícula varia entre 0,4 mm e 1,25 mm, com tamanho efetivo de 0,5 mm a 0,62 mm, a densidade é 1,15 g·mL⁻¹ e a densidade aparente é de 760 g·L⁻¹ com desvio de ± 5%. A capacidade de retenção de água é de 60% (base mássica) com ± 5% de variação. O coeficiente de uniformidade máximo é de 1,6 e a capacidade total seca mínima é de 4,7 eq·kg⁻¹. Esta resina é estável termicamente na faixa de -20 °C a 130 °C, podendo ser armazenada por 2 anos em local seco, fresco e na ausência de iluminação. Além disso, o custo da resina Lewatit® GF 101 é competitivo no mercado comparado aos produtos semelhantes disponíveis e ela tem sido utilizada como catalisador em reações de transesterificação de ácidos graxos livres em triglicerídeos na produção de biodiesel com metanol ou etanol (LANXESS, 2014).

No trabalho desenvolvido por Tischer et al. (2019), os autores estudaram a produção de acetato de eugenila por meio de esterificação do eugenol com anidrido acético utilizando a resina comercial Lewatit® GF 101 como catalisador. A conversão de 94,85% foi obtida após 10 min de reação, com a proporção molar de 1:1 entre os reagentes, 1% em massa de catalisador e temperatura de 70 °C. Nessas condições, em 45 min de reação a conversão completa foi alcançada. A reutilização do catalisador foi investigada e, após 10 ciclos de reutilização, não foi observada perda de atividade catalítica. O efeito da temperatura e da quantidade de catalisador foi analisado e os autores observaram aumento da conversão da reação com o aumento da temperatura de 30 °C para 70 °C e da quantidade de catalisador de

1% para 5% em base mássica. O aumento da proporção molar dos reagentes não apresentou efeito significativo. Com a temperatura de 30 °C, 1% de catalisador e proporção molar de 1:1 entre os reagentes, o aumento da conversão da reação sem a presença de catalisador para a reação catalisada com a resina Lewatit® GF 101 foi de aproximadamente 93% em 1 h de reação, mostrando que esta resina é um catalisador em potencial para as reações de esterificação de produção de acetatos.

2.2.4 Parâmetros que influenciam na reação de esterificação

As reações de esterificação tais como as empregadas neste trabalho são influenciadas por diversos parâmetros. Dentre os principais estão a concentração de catalisador, a concentração e/ou a proporção dos reagentes, o tempo e a temperatura da reação e a presença de solventes (CLAON, AKOH, 1994). Ferraz et al. (2015) relatam que o aumento da maioria desses parâmetros tende a favorecer a conversão da reação até o tempo onde a conversão atinge o estado estacionário.

Em relação à utilização de enzimas como catalisadores na transesterificação dos compostos acetato de geranila e nerila, Gupta et al. (2007) observaram que o aumento da concentração de enzima foi prejudicial para a seletividade da reação. No entanto, concentrações muito baixas reduziram a taxa de reação. Os autores justificaram a queda da seletividade em concentrações mais altas como função da presença de outras lipases em organismos menores, os quais podem estar competindo pelo substrato. Os autores também observaram que o agente de acilação interferiu na taxa de reação, apesar de não influenciar na conversão final, o que atribuíram como função da reatividade, onde mesmo anidridos isômeros alteraram a taxa.

O doador de acila interfere na reação, seja pelo tamanho da cadeia, seja pela acessibilidade aos grupos reativos, diferentes doadores de acila podem ser utilizados para obtenção do mesmo produto final, diferenciando-se pelo subproduto formado. O modo de operação do reator, contínuo ou batelada, também pode ser avaliado (SALVI; KAMBLE; YADAV, 2017).

Nicoletti et al. (2015) sugerem que, para reações catalisadas por enzimas, o suporte e o método de imobilização da enzima também influenciam no resultado da reação, bem como a agitação do meio reacional.

Yadav e Rahuman (2003) avaliaram a atividade de catalisadores de resina de troca iônica (H⁺) Amberlyst – 36, Indion – 130, Amberlyst – 15, Dowex – M31 e Amberlyst – 18

para reações de esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois para a síntese de ésteres de perfumaria. Os autores avaliaram o efeito da agitação do meio reacional e constataram que não houve influência na conversão da reação quando alterada a velocidade de rotação na faixa estudada. Entretanto, foi observada a influência da alteração da proporção de reagentes, concentração de catalisador e temperatura reacional na conversão e na taxa de reação, cujo aumento de ambos apresentou efeito positivo. O tamanho dos poros e o teor de água inicial das resinas demonstrou influência na conversão da reação visto que o aumento de sítios ativos H^+ favoreceram a esterificação.

2.3 ADITIVOS ANTIMICROBIANOS

A preocupação com micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos tem aumentado devido ao crescimento dos surtos de doenças transmitidas. Neste contexto, a identificação e avaliação de produtos para o controle desses agentes de modo a garantir aos consumidores um abastecimento seguro, saudável e nutritivo pode ser considerado um importante desafio inovador internacional em tecnologia de alimentos (PAUL et al., 2011).

O controle de micro-organismos é essencial em diversas áreas pois muitos materiais não possuem ação antimicrobiana natural, permitindo que ocorra crescimento de micro-organismos, o que pode gerar a formação de biofilmes (LITTUNEN et al., 2016). Quando o biofilme é formado, ele atua como protetor dos micro-organismos, aumentando a resistência aos processos de descontaminação. Além disso, os micro-organismos que compõem o biofilme muitas vezes excretam substâncias tóxicas que podem danificar o material em questão (SIEDENBIEDEL; TILLER, 2012). Portanto, se os materiais possuírem características intrínsecas de ação antimicrobiana, os métodos de descontaminação podem ser eliminados (KENAWY; WORLEY; BROUGHTON, 2007).

Os agentes antimicrobianos podem diferir em termos de estrutura química, eficácia, método de aplicação, efeito sobre os seres humanos e sobre o meio ambiente, bem como em relação ao custo (SIMONCIC; TOMSIC, 2010). Além disso, devem ser eficazes contra uma variada gama de micro-organismos, apresentar baixa toxicidade para os consumidores e permanecer ativos durante um longo período de tempo. Também é importante que o agente antimicrobiano seja compatível com os processos químicos industriais (SALGUEIRO et al., 2017).

Em geral, a atividade antimicrobiana é classificada como biocida ou biostática. Os biocidas incluem os agentes que matam bactérias e fungos, enquanto os biostáticos inibem o

crescimento destes micro-organismos. O modo de ação está diretamente relacionado à concentração da substância ativa, chamada de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração biocida mínima (CBM) (SIMONCIC; TOMSIC, 2010).

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos são diferentes, mas, em geral, estão associados a fatores essenciais para a sobrevivência da célula. Por exemplo, podem prejudicar a parede celular ou alterar a permeabilidade da membrana celular, desnaturar as proteínas, inibir a atividade enzimática ou inibir a síntese de lipídeos (SALGUEIRO et al., 2017).

Segundo Larson e Klibanov (2013), a incorporação de compostos biocidas em materiais vem sendo largamente utilizada em embalagens ativas, principalmente naquelas aplicadas na indústria de alimentos e produtos farmacêuticos. Nesse sentido, as embalagens bioativas são classificadas quanto ao modo de liberação do composto da embalagem, os quais são denominados de antimicrobianos por lixiviação ou antimicrobianos ligados. No primeiro caso, um agente antimicrobiano, ou o seu precursor, está incorporado (ou embebido) na embalagem, de modo que sua liberação ocorre ao longo do tempo. Os agentes usados neste grupo dividem-se em não voláteis (antibióticos, enzimas, nanopartículas de prata, iodo, sais de amônio quaternário, triclosan e peptídeos antimicrobianos), trocadores iônicos (adsorvem a bactéria presente na solução aquosa), revestimentos inteligentes (liberam o agente somente quando ativados por um micro-organismo) e voláteis (álcoois de baixo ponto de ebulição, SO₂, ClO₂, óxidos de etileno, ozônio e espécies reativas de oxigênio). No segundo caso, o agente é imobilizado na superfície da embalagem, o que pode ocorrer via depósito físico, via insolubilidade em água, ou via ligação covalente de antibióticos ou de polímeros anfífilos de cadeia longa.

Alguns materiais celulósicos, por exemplo, principalmente os utilizados com cuidados de higiene e saúde, tais como tecidos de papel e os materiais de higiene não tecidos, por serem feitos de fibras naturais, apresentam certa tendência para desenvolvimento de micro-organismos. Na produção deste tipo de material, são utilizados diferentes tipos de agentes antimicrobianos (SALGUEIRO et al., 2017).

Os agentes utilizados incluem compostos de amônio quaternário, N-halaminas, quitosana, polibiguanidas, triclosan, nanopartículas de metais nobres e óxidos metálicos (principalmente prata), derivados de polímeros naturais, polímeros sintéticos, além de produtos bioativos à base de plantas. A escolha do agente varia em função do mecanismo de atividade antimicrobiana, da toxicidade, da durabilidade e da aceitabilidade ecológica. O uso de antimicrobianos ligados tem ganhado destaque nessa área, principalmente quando

preparados usando polimerização para funcionalização de grupos específicos com compostos de amônio quaternário, cátions reativos, agentes de reticulação e incorporação de nanopartículas em matrizes poliméricas (SIMONCIC; TOMSIC, 2010; LARSON; KLIBANOV, 2013).

Óleos essenciais e alguns de seus constituintes, além de serem muito empregados em produtos farmacêuticos (fitoterápicos), têm sido utilizados como aditivos para produtos de consumo humano e animal, como conservantes de alimentos, cosméticos, perfumes e agricultura (GONÇALVES et al., 2012).

Os agentes bioativos naturais com propriedades antimicrobianas tornaram-se cada vez mais importantes. Estes compostos são extraídos principalmente de plantas e incluem compostos fenólicos e polifenóis, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, lecitinas, polipeptídios e poliácetilenos. Estes agentes podem ser incorporados por diferentes métodos, tais como por meio de um agente de reticulação com uma resina, via microcápsulas, através do aprisionamento do óleo essencial dentro de uma matriz gel, entre outros (SIMONCIC; TOMSIC, 2010).

Compostos terpenílicos como álcoois e ésteres estão entre os principais na composição de diversos óleos essenciais com características antimicrobianas. Por suas características relacionadas com sabor e aroma, são aplicados em diversas áreas e oferecem uma grande oportunidade para o desenvolvimento de aditivos antimicrobianos de origem natural uma vez que geralmente não são tóxicos e possuem propriedades para preservação de alimentos (ZANETTI et al., 2018).

Segundo Dannenberg et al. (2017), embalagens ativas controlam a contaminação por meio de micro-organismos e reduzem a necessidade de conservantes adicionados diretamente aos alimentos. Seu caráter ativo pode ser obtido pela adição de óleos essenciais, que são extratos naturais com propriedades antimicrobianas. De acordo com Calo et al. (2015), o uso de compostos naturais, como os óleos essenciais, direto ou indireto nos alimentos, proporciona uma sensação de segurança aos consumidores.

Neste contexto, a produção de compostos que possam ser utilizados como aditivos antimicrobianos em diversas áreas de aplicações como, por exemplo, em materiais celulósicos, em embalagens ativa ou diretamente em alimentos e fármacos, que sejam derivados de fontes naturais, que apresentem atividade antimicrobiana, maior estabilidade e que não sejam tóxicos à saúde humana, ainda apresenta campo para exploração. Considerando que os compostos em questão, acetato de geranila e acetato de nerila, também são utilizados em outras aplicações, as quais também requerem um grau de pureza elevado, o

desenvolvimento de rotas mais eficientes e sustentáveis para a sua produção ainda apresenta um amplo campo para estudos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A explanação realizada neste capítulo tem o intuito de abordar as principais contribuições até o momento em temas associados com a síntese dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, bem como versar sobre as últimas pesquisas publicadas e os resultados obtidos para demonstrar que tal processo necessita do emprego de catalisador.

Salienta-se aqui que esta tese proposta refere-se ao emprego de uma resina polimérica como catalisador em uma reação química de esterificação. Todavia, é de suma importância que sejam apresentadas as pesquisas de forma ampla, expondo também as publicações que envolvem outros catalisadores no intuito de realizar um embasamento detalhado.

Nada havendo na literatura sobre as reações químicas de esterificação dos compostos de interesse com o catalisador proposto nesse trabalho (Lewatit® GF 101), as abordagens serão feitas de forma separada.

Por fim, apresentam-se as pesquisas relativas à avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade dos compostos. Tal abordagem tem o intuito de demonstrar que os compostos obtidos possuem potencial para serem utilizados como aditivo antimicrobiano no desenvolvimento de novos materiais em pesquisas futuras.

3.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

O primeiro trabalho relacionado com a síntese do acetato de geranila foi desenvolvido por Chulalaksananukul, Condoret e Combes (1992), que realizaram a síntese de acetato de geranila por transesterificação do geraniol (30 mM) com diferentes doadores de acilo, catalisada por lipase imobilizada de *Mucor miehei* com n-hexano como solvente. Os melhores resultados foram obtidos com o acetato de propila (600 mM) e 50 mg de lipase, em 100 h de reação, onde o percentual de conversão foi próximo de 80%.

No ano seguinte, Chulalaksananukul, Condoret e Combes (1993) realizaram a síntese de acetato de geranila por transesterificação do geraniol (60 mM) e acetato de propila (200 mM) catalisada por lipase imobilizada de *Mucor miehei* com dióxido de carbono como fluido supercrítico. Neste estudo foram utilizados 50 mg de catalisador, 140 bar de pressão e temperatura de 40 °C, sendo que a conversão atingida nessas condições foi de 30% em 3 dias de reação.

Claon e Akoh (1994) obtiveram acetato de geranila via esterificação direta entre ácido acético e geraniol utilizando como solvente n-hexano e como catalisador lipase de *Candida*

antarctica imobilizada em resina acrílica. Os autores obtiveram conversões entre 95% e 99% com as lipases SP435 e SP382, respectivamente, variando entre 2% e 15% em proporção mássica em relação à massa de reagentes (geraniol 0,12 M e ácido acético 0,1 M) em 16 h de reação. Uma redução drástica na conversão da reação foi observada para temperaturas maiores que 40 °C com ambas as enzimas, o que os autores atribuíram como consequência da volatilidade dos reagentes e da atividade enzimática. O aumento da concentração de geraniol não influenciou a conversão da reação com ambas as lipases. No entanto, o aumento da concentração de ácido acético contribuiu para a redução da conversão com as duas lipases, comportamento que os autores atribuíram à inibição da atividade enzimática pelo ácido. Por outro lado, o aumento da concentração de enzima contribuiu para o aumento da conversão para a lipase SP382 e não influenciou na conversão para a SP435. A reutilização da enzima foi avaliada durante 10 ciclos, na qual a conversão foi decrescente, apresentando valores abaixo de 50% após 7 ciclos.

Yee, Akoh e Phillips (1995) imobilizaram lipase de *Pseudomonas* sp. por adsorção em cinco suportes diferentes e testaram a capacidade de sintetizar acetato de geranila usando triacilgliceróis de cadeia curta como doadores de acilo. As reações foram conduzidas com 2 mL de n-hexano como solvente, 0,1 M de geraniol, 0,03 M de triacilglicerol, 200 unidades de lipase, incubadas a 30 °C e 200 rpm por 24 h. A produção do acetato de geranila teve melhor desempenho com Duolite como suporte, atingindo 77,5% de conversão nas condições citadas.

Ainda nessa linha, Yee e Akoh (1996) imobilizaram lipases de *Pseudomonas* sp. por adsorção em esferas de vidro e utilizaram como catalisador na síntese de acetato de geranila por transesterificação com anidrido acético como o doador de acilo. As reações foram realizadas em n-hexano contendo 0,1 M de geraniol, 0,1 M de anidrido acético, temperatura de 30 °C, agitação de 200 rpm e 11% em base mássica de lipase. Nestas condições, a conversão da reação atingiu aproximadamente 96% em 24 h, sendo que o aumento da concentração de lipase favoreceu a conversão da reação até o valor de 11%, quando o estado estacionário foi atingido. O aumento da temperatura teve efeito positivo até 50 °C. O aumento da concentração de geraniol inibiu a atividade enzimática e reduziu a conversão da reação, enquanto o aumento da concentração de anidrido acético não alterou a conversão da reação catalisada pela lipase. Após 15 ciclos de uso do catalisador, a conversão reduziu para aproximadamente 30%.

Dois anos mais tarde, Akoh e Yee (1998) testaram a capacidade de lipases microbianas imobilizadas em resina acrílica em catalisar a síntese de ésteres geranílicos em meios orgânicos utilizando ésteres vinílicos como agentes de acilação em reações de

transesterificação. Os melhores resultados foram obtidos para a lipase SP 435 de *Candida antarctica*, quando utilizada na proporção de 10% em massa em relação à massa de reagentes (geraniol e acetato de vinila 0,1 M), com temperatura de 30 °C e utilizando n-hexano como solvente orgânico. O efeito do solvente foi avaliado, sendo que os melhores resultados foram obtidos com n-hexano, heptano, ciclohexano e iso-octano. A reação para a síntese de acetato de geranila atingiu conversão próxima de 100% em 8 h. Em relação ao efeito da temperatura, os autores observaram pequeno aumento na conversão quando a temperatura foi elevada de 20 °C para 30 °C, seguido de pequena redução na conversão quando a temperatura foi aumentada de 30 °C para 40 °C e de 40 °C para 50 °C.

Stamatis et al. (1998) sintetizaram ésteres de geraniol de cadeia curta catalisada com esterase isolada de *Fusarium oxysporum* em reações de esterificação em solventes orgânicos. Dentre os ésteres obtidos, encontra-se o acetato de geranila a partir do diacetato de etilenoglicol como doador de acila. A enzima foi usada como um pó seco e não foi imobilizada. Elevados rendimentos (80% a 90%) foram obtidos em n-hexano na temperatura de 45 °C e na proporção molar 1:1 (300 mM:150 mM) após 96 h de reação com a concentração de enzima de 20 mg·mL⁻¹. A enzima foi capaz de manter sua atividade catalítica mesmo após o quinto reuso em n-hexano. O aumento da concentração de enzima e da proporção molar de reagentes (geraniol) apresentou efeito positivo na taxa de reação.

Após 3 anos, Bartling et al. (2001) estudaram a síntese de acetato de geranila a partir da esterificação do geraniol com ácido acético, utilizando como catalisador uma lipase comercial de *Candida antarctica* e solvente n-hexano. Os resultados obtidos mostraram conversão de 94% em 14 h, com a temperatura reacional em 30 °C, concentração dos reagentes em 0,1 M e concentração de enzima de 2,15 mg·mL⁻¹ sem a remoção da água do meio reacional. Quando a água foi removida, a conversão da reação nestas condições foi próxima de 100% em 8 h de reação. O aumento da concentração de enzima e da temperatura até 50 °C teve efeito positivo na conversão da reação.

No mesmo ano, Ikeda e Kurokawa (2001) realizaram a síntese do acetato de geranila a partir de geraniol e ácido acético utilizando como catalisador lipase de *Candida antarctica* imobilizada em compósito de acetato de celulose-TiO₂. A conversão atingida foi de 85% na melhor condição após 100 h de reação na temperatura de 30 °C com 20 mg de enzima para cada g de compósito. A proporção de reagentes foi alterada para avaliação do efeito na reação. Quando a concentração de ácido acético foi mantida constante em 0,2 M e a concentração de geraniol foi aumentada gradativamente de 0,1 M para 0,7 M, a variação na atividade catalítica foi pequena, tendo um pequeno aumento ao longo de toda a faixa. Entretanto, quando a

alteração inversa foi realizada, a atividade catalítica apresentou um aumento linear até 0,4 M de ácido acético e, para maiores concentrações, a redução ocorreu com o mesmo comportamento. O aumento da temperatura favoreceu a reação até aproximadamente 40 °C, sendo que para temperaturas maiores a influência foi negativa.

Chen, Lin e Chang (2002) investigaram a síntese de acetato de geranila via esterificação de geraniol e ácido acético catalisada por lipase de *Candida cylindracea* livre e imobilizada. A conversão utilizando 100 mg de enzima livre para cada 10 mL de solvente foi de 15% após 24 h, em contraste com 95% quando foi utilizada a enzima imobilizada na mesma quantidade, considerando as mesmas condições do meio reacional. Uma perda inicial de 14% a 18% da atividade catalítica foi observada após três ou quatro ciclos, sendo que, do quinto até o décimo ciclo, a atividade permaneceu aproximadamente constante entre 82% e 86% da atividade inicial.

A síntese do acetato de geranila também foi estudada por Peres, Silva e Barreiros (2003), que realizaram a esterificação do geraniol com o ácido acético catalisada pela lipase Novozyme 435 utilizando como fluidos supercríticos, etano e dióxido de carbono. Os autores obtiveram, em 10 h de reação, conversões de 98% e 73%, respectivamente, com 40 °C, 100 bar, 100 mM de geraniol, 100 mM de ácido acético e 2,2 mg·cm⁻³ de enzima.

Larios et al. (2004) avaliaram a esterificação do geraniol com diferentes doadores de acila em n-hexano catalisada por lipase de *Candida antarctica*. Na produção de acetato de geranila e butirato de geranila, as conversões foram semelhantes nas mesmas condições reacionais. No entanto, na produção de isovalerato de geranila, a conversão foi bem abaixo das demais, mostrando a interferência da característica da cadeia do doador de acila visto que ácido acético e ácido n-butírico são acíclicos, enquanto o ácido isovalérico é cíclico.

Anos mais tarde, Mahapatra et al. (2009) estudaram a síntese de acetato de geranila utilizando lipase de *Rhizopus oligosporus* imobilizada em sílica como catalisador em meio livre de solvente. A reação de transesterificação foi realizada com geraniol e acetato de vinila. O acetato de vinila foi utilizado em grande excesso em relação ao geraniol, o que fez a reação apresentar cinética de pseudo-primeira ordem em relação ao geraniol. Para obter o maior rendimento de acetato de geranila, vários parâmetros físicos relevantes que influenciam a atividade da lipase foram investigados, tais como a velocidade de agitação, o tempo de reação, a concentração de enzima, a quantidade inicial de água e a temperatura de reação. Uma conversão molar máxima de 67% foi obtida após 48 h de reação a 30 °C, em uma concentração de enzima de 25% (massa de enzima em relação ao volume da mistura reacional). A conversão do substrato permaneceu constante por cinco ciclos sucessivos de uso

do catalisador, sendo que após 10 ciclos a conversão caiu para 44%. A velocidade de agitação apresentou influência positiva na conversão até 300 rpm. O aumento do conteúdo inicial de água apresentou efeito inverso na conversão da reação e no pH visto que afeta a atividade enzimática. O aumento da temperatura favoreceu a conversão até 40 °C ao longo das 48 h. Para temperaturas maiores, a influência foi negativa após 24 h de reação, e, em tempos anteriores a este, a conversão foi menor comparada com as temperaturas de 30 °C e 40 °C. O aumento da concentração de enzima apresentou efeito positivo na conversão em concentrações de até 30%.

Couto et al. (2011) realizaram a reação de esterificação de geraniol com ácido acético (100 mM:100 mM) catalisada por lipase B (Novozyme 435) de *Candida antarctica* imobilizada utilizando dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂) e sc-etano em reator de leito fixo (PBR). As reações foram conduzidas a 35 °C e 100 bar. A conversão atingiu valores próximos de 80% com 900 mg de enzima em 4 dias na vazão de fluido de 0,25 mL·min⁻¹. O aumento da vazão reduziu a conversão em função da diminuição do tempo de residência. O aumento da massa de catalisador aumentou a conversão, mantendo-se as demais condições constantes. Com etano, as conversões foram maiores do que com o CO₂ em função da interferência do solvente na solubilidade da água formada na reação visto que a esterificação é favorecida quando a solubilidade da água no solvente é baixa.

No ano seguinte, Lozano, Bernal e Navarro (2012) estudaram a esterificação de ácido acético com geraniol e nerol para produção de acetato de geranila e acetato de nerila catalisada por lipase imobilizada de *Candida antarctica* B (Novozyme 435) em líquido iônico, N,N',N'',N'''-hexadeciltrimetilamônio bis (trifluorometilsulfonyl) imida [C₁₆mim][NTf₂]. Para duas horas de reação, com 20 mg de catalisador, 2 mmol de ácido acético e 3 mmol de álcool a 50 °C com a presença de 50% em base mássica do líquido iônico, a atividade catalítica foi maior para o geraniol do que para o nerol. Em 4 h de reação, a conversão chegou a 99,9% para ambos os compostos com 40 mg de catalisador e 60% de líquido iônico, mantendo-se as demais condições.

Gupta et al. (2013) utilizaram lipase imobilizada isolada de *Thermomyces lanuginosus* como catalisador na síntese de acetato de geranila a partir de geraniol e acetato de vinila. Os autores observaram que o aumento da temperatura da reação até aproximadamente 40 °C favoreceu a conversão, bem como o aumento da proporção de reagentes, sendo que os maiores valores foram obtidos na proporção molar de 1:5 (geraniol:acetato de vinila). Nestas condições, a conversão máxima foi atingida próxima a 90% em 24 h de reação, quando a concentração de enzima utilizada foi de 30 mg em 200 rpm de agitação. Também foi

observado que a redução da concentração de enzima fez com que a conversão da reação diminuísse. Os resultados também foram influenciados pela matriz utilizada na imobilização. Após 8 ciclos de uso do catalisador, a conversão da reação diminuiu em aproximadamente 25% em relação à conversão do primeiro uso nas condições ótimas.

No trabalho desenvolvido por Badgujar e Bhanage (2014), os autores realizaram a síntese de acetato de geranila em meio não aquoso utilizando, como catalisador, lipase de *Pseudomonas cepacea* imobilizada em filme polimérico biodegradável (ácido polilático, quitosana e álcool polivinílico) via reação de transesterificação do geraniol com acetato de vinila. Os autores também avaliaram o uso de diferentes solventes visto que o mesmo interfere no poder catalítico da enzima. A reação utilizando 50 mg de lipase imobilizada na temperatura de 55 °C atingiu 99% de conversão no tempo de 3 h para n-hexano e para tolueno como solvente nas proporções de 1:4 (em mmol, geraniol:acetato de vinila). A agitação do meio reacional foi avaliada e os resultados mostraram acréscimo considerável na conversão da reação com o aumento da rotação de 40 rpm para 140 rpm, enquanto que o aumento de 140 rpm para 160 rpm apresentou pouca influência na conversão da reação. O efeito da proporção de reagentes também foi avaliado com a concentração do geraniol mantida constante e a concentração de acetato de vinila aumentando gradualmente de 1 mmol para 4 mmol, o que influenciou no aumento gradual da conversão da reação. Foram avaliados 5 ciclos de uso da enzima, sendo que houve redução da conversão de aproximadamente 17%.

Xiong et al. (2014) sintetizaram acetato de geranila a partir de reação de transesterificação do geraniol com acetato de vinila utilizando lipase de diferentes micro-organismos como catalisador em solventes orgânicos. Os autores identificaram que a lipase obtida de *Pseudomonas fluorescens* apresentou maior atividade catalítica nas mesmas condições reacionais do que as demais lipases. Dentre os solventes orgânicos testados, os melhores resultados foram obtidos com o próprio acetato de vinila, que também é o doador de acilo. O aumento da concentração de catalisador teve efeito positivo na conversão da reação até a concentração de 15 mg·mL⁻¹. O aumento da temperatura e da agitação do meio teve efeito positivo até 35 °C e 240 rpm. A conversão se aproximou de 100% em 4 h de reação, com temperatura de 30 °C, agitação de 240 rpm, concentração de enzima de 12 mg·mL⁻¹, concentração de geraniol de 300 mM e 3 mL de acetato de vinila. O aumento da concentração de geraniol teve efeito positivo na concentração do produto. A atividade da lipase foi mantida com 9 ciclos de uso.

A síntese do acetato de geranila também foi realizada por Patel et al. (2016) por transesterificação de geraniol e acetato de vinila em diferentes solventes orgânicos, utilizando,

como catalisador, lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suportes de polietilenoimina com nanopartículas de óxido de zinco. As condições que maximizaram a produção de acetato de geranila resultaram no rendimento de 94% em 6 h na proporção de 0,1:0,4 M (geraniol:acetato de vinila), com n-hexano como solvente, na temperatura de 40 °C, com 50 mg·mL⁻¹ de catalisador e agitação de 150 rpm. O aumento da temperatura teve efeito positivo na conversão até 50 °C. O aumento da concentração molar de geraniol teve efeito negativo sobre a conversão e o aumento da concentração molar de acetato de vinila não apresentou efeito nas condições estudadas. Após 2 ciclos de uso, a lipase manteve aproximadamente 70% de sua atividade inicial.

Em seu trabalho, Chen et al. (2016) avaliaram a síntese de acetato de geranila a partir da esterificação equimolar do geraniol com anidrido acético na temperatura de 50 °C por 2 h utilizando diferentes catalisadores na concentração de 2% em base molar. Dentre os catalisadores utilizados, estão a resina de troca iônica Lewatit® K 2620, a resina D 72, catalisadores homogêneos (ácido sulfúrico e ácido metilsulfônico) e catalisadores heterogêneos à base de 1,10 fenantrolina (PHEN) funcionalizada com haletos de hidrogênio (HX) em diferentes proporções (HF:PHEN) e com ácidos fortes (ácido sulfúrico, ácido metilsulfônico e ácido p-tolueno sulfônico). Os resultados mostraram conversão de 83,2% e 72,3% e seletividade de 77,4% e 83,3% com as resinas Lewatit® K 2620 e D 72, respectivamente. Com os ácidos livres na catálise homogênea, a conversão foi de 100%, mas a seletividade foi baixa. Com os catalisadores funcionalizados, a seletividade foi alta e a conversão variou em função do ácido usado na funcionalização e das proporções HX:PHEN, sendo que a conversão foi máxima com a proporção de 2:1 quando o ácido sulfúrico e o ácido metilsulfônico foram utilizados. No entanto, com os mesmos ácidos, a conversão foi reduzida ao se usar a proporção HF:PHEN de 1:1. O aumento da temperatura da reação aumentou a conversão, porém, reduziu a seletividade, efeito que também foi observado para o aumento da concentração de catalisador para diferentes catalisadores heterogêneos.

Kirdi, Akacha e Gargouri (2016) investigaram a produção de acetato de geranila via reação de transesterificação do geraniol com acetato de etila em solvente orgânico catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei*. O maior rendimento foi de 82%, alcançado em condições quase anidras a 55 °C usando uma concentração de enzima de 6% em base mássica, uma razão molar de geraniol para acetato de etila de 1:5 e tempo de reação de 6 h. A lipase imobilizada foi usada repetidamente durante quatro ciclos sem diminuição no rendimento da reação. O aumento da concentração de enzima teve efeito positivo sobre a conversão, com o estado estacionário sendo atingido em 6%. O aumento da razão molar de reagentes apresentou

efeito positivo, atingindo o estado estacionário na razão de geraniol para acetato de etila de 1:5.

No ano seguinte, Rosa et al. (2017) investigaram a síntese de acetato de geranila utilizando, como catalisador, a lipase de *Candida rugosa* concentrada por precipitação com acetona seguida de liofilização. A condição ótima para a síntese de acetato de geranila foi à temperatura de 45 °C, com 12,5% de catalisador (relação mássica de lipase/geraniol) e razão molar 1:1,5 (geraniol:acetato de vinila) em 8 h de reação com n-hexano como solvente. Tal condição resultou em 79% de rendimento e produtividade de 9,88% a cada hora.

Bourkaib et al. (2018) estudaram a síntese enzimática do acetato de geranila em um reator de leito fixo (PBR) utilizando CO₂ supercrítico como solvente e lipase B (Lipozyme® 435) imobilizada de *Candida antarctica* como catalisador via esterificação com ácido acético. A melhor taxa de conversão foi observada a 65 °C e 150 bar com mistura equimolar dos reagentes, alcançando o valor de $73,8 \pm 0,9\%$ com aproximadamente 20 min de reação. O efeito do aumento da temperatura e da pressão foi crescente e linear sobre a conversão da reação, sendo que a temperatura teve maior influência que a pressão. Entretanto, quando combinados o aumento da pressão e da temperatura, o efeito foi negativo sobre a conversão. O catalisador manteve a conversão da reação com pequenas variações após 6 ciclos de uso. O aumento do tempo de residência do fluido supercrítico contribuiu para o aumento da conversão reacional.

Já Yadav e Kamble (2018) realizaram a síntese enzimática do acetato de geranila a partir de geraniol e acetato de vinila com diferentes lipases de *Candida antarctica* imobilizadas como catalisador. A reação catalisada com a lipase Novozyme® 435 apresentou os melhores resultados, atingindo conversões próximas a 96% em 1 h de reação nas condições ótimas. O aumento das variáveis teve efeito positivo para velocidade de agitação até 300 rpm, para concentração de catalisador até 0,06% em base mássica e para temperatura até 55 °C. O melhor solvente encontrado foi o n-heptano, entretanto com resultados próximos aos obtidos com n-hexano. O efeito do aumento da razão molar entre os reagentes foi positivo até 1:4 (geraniol:acetato de vinila). Outros doadores de acila foram estudados e verificou-se que os ésteres vinílicos apresentaram maiores conversões (77% a 100%) quando comparados com ésteres aromáticos (5% a 82%) e ácidos carboxílicos (7% a 31%). Com 5 ciclos de uso do catalisador, a redução na conversão nas condições ótimas foi de 7%.

No trabalho de Wu et al. (2018), os autores obtiveram *S. cerevisiae* modificada geneticamente para utilização na síntese do acetato de geranila utilizando uma via heteróloga.

Através da otimização das condições de fermentação, os autores conseguiram alcançar a produção de $22,49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato de geranila.

No mesmo ano, Murcia et al. (2018) avaliaram a reação de transesterificação entre geraniol e acetato de vinila para a síntese enzimática de acetato de geranila, utilizando Novozyme® 435 como catalisador. O efeito da quantidade de enzima, da taxa de agitação, da temperatura, da concentração inicial de substratos e da razão molar de substratos na conversão foi investigado. O aumento da quantidade de enzima teve efeito positivo na conversão da reação até 50 mg de enzima, sendo a variável que apresentou maior influência. O aumento da concentração molar inicial de substratos e o aumento da agitação apresentaram efeito positivo, mas de magnitude muito baixa, podendo ser desprezados. O aumento da temperatura e da proporção molar dos reagentes apresentou efeito positivo considerável nas condições estudadas. A conversão de acetato de geranila de 98,4% foi obtida nas melhores condições experimentais: a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 rpm, com 50 mg de enzima, proporção molar entre geraniol e acetato de vinila de 1:1,5 e concentração inicial de geraniol de 50 mM.

No ano seguinte, Bhavsar e Yadav (2019) sintetizaram acetato de geranila a partir da transesterificação de geraniol com acetato de etila utilizando, como catalisador, lipase de *Candida antarctica* em sistema livre de solvente. Os resultados mostraram 83% de conversão de geraniol com 100% de seletividade em acetato de geranila a uma razão molar de 1:7 de geraniol para o acetato de etila, usando $12,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Novozyme® 435 em $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. O efeito da agitação do meio reacional foi avaliado e os autores observaram aumento na conversão da reação em função do aumento da rotação de 200 rpm para 400 rpm com intervalo de 100 rpm, quando mantidas constantes as demais condições reacionais. O aumento na quantidade de catalisador também apresentou efeito positivo na conversão da reação. O aumento da razão molar do acetato de etila em relação ao geraniol contribuiu para o aumento da conversão de acetato de geranila. O efeito da temperatura, quando alterada de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ até $70 \text{ }^\circ\text{C}$ com intervalo de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, foi positivo e considerável para as temperaturas de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$. No entanto, entre $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pequena alteração foi observada apenas para a taxa inicial da reação, sendo que, a partir de 30 min, a conversão apresentou valores próximos aos obtidos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 3 ciclos de uso do catalisador, a conversão da reação reduziu em aproximadamente 18%.

No trabalho de Zong et al. (2020), os autores utilizaram *E. coli* recombinante para a biossíntese do acetato de nerila utilizando uma via heteróloga. Através da otimização das condições de fermentação, os autores conseguiram alcançar a produção de $11,712 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato de nerila.

Recentemente, Jiang e Cheng (2020) estudaram a síntese enzimática de acetato de nerila a partir da transesterificação de nerol com acetato de etila em um sistema livre de solvente. O efeito da velocidade de agitação foi positivo na conversão e na taxa inicial de 200 rpm a 400 rpm. Entretanto, em valor igual ou acima de 400 rpm, o efeito foi insignificante, indicando que a conversão e a taxa de reação não foram mais limitadas pela resistência à transferência de massa. O efeito do aumento do teor de catalisador foi positivo de 1,0% para 3,0%, enquanto o efeito do aumento da razão molar de nerol para acetato de etila foi positivo até 1:15. O aumento da temperatura favoreceu a conversão até 50 °C. Acima deste valor, o efeito foi negativo. Os resultados mostraram 91,6% de conversão de nerol com 100% de seletividade para acetato de nerila sob as condições ótimas de proporção molar de 1:12,6 (nerol:acetato de etila), 2,6% em base mássica de Novozyme® 435 a 52,7 °C em 2 h de reação.

A partir do exposto, é possível verificar que a maioria dos trabalhos desenvolvidos na literatura para a síntese de acetato de geranila com catalisadores heterogêneos envolvem o emprego de enzimas, especialmente lipases, sendo escassos os trabalhos que envolvem a utilização de resinas de troca iônica. Com o catalisador proposto nesta tese (Lewatit® GF 101), nenhum trabalho de síntese de acetato de geranila ou acetato de nerila foi encontrado. Para a síntese do acetato de nerila, poucos trabalhos foram encontrados e também envolveram a catálise enzimática. Em relação à resina de troca iônica proposta, para a síntese de ésteres acetatos, apenas um trabalho envolvendo o acetato de eugenila foi encontrado. Neste contexto, verifica-se que o campo de estudos para emprego de catalisadores heterogêneos, especialmente as resinas de troca iônica, ainda é vasto para a síntese de ésteres. Especificamente, a síntese dos isômeros acetato de geranila e acetato de nerila utilizando a resina de troca iônica Lewatit® GF 101 como catalisador é inédita na literatura, sendo esta a proposta do presente trabalho.

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS

A atividade biológica, especialmente a ação antimicrobiana envolvendo os compostos abordados neste trabalho, principalmente na composição de óleos essenciais, tem sido estudada na literatura. Chang, Chen e Chang (2001) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas de canela (*Cinnamomum osmophloeum*) e seus constituintes. Dentre os constituintes majoritários, o acetato de geranila e o geraniol estão presentes em teores somente inferiores ao cinamaldeído. Os resultados mostraram excelente efeito inibitório, com

concentração mínima inibitória de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* sp. e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Vibrio parahemolyticus*. Os autores concluíram que os resultados obtidos sugerem que o óleo essencial de folha de *C. osmophloeum* é benéfico para a saúde, tendo o potencial para ser usado para fins médicos e para ser utilizado como aditivos antibacterianos na fabricação de papel.

Friedman et al. (2002) verificaram a excelente ação antimicrobiana de diferentes óleos essenciais e constataram que dos que apresentaram maior atividade frente a *Campylobacter jejuni* estavam aqueles que possuíam em sua composição acetato de geranila dentre os compostos majoritários.

No ano seguinte, Angioni et al. (2003) avaliaram a composição química e a atividade antifúngica do óleo essencial da planta de *curry* (*Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum*). Os resultados mostraram que o acetato de nerila apresentou-se como componente majoritário, sendo que sua composição nas flores variou entre 21,5% e 26,1%. A concentração de nerol e seus ésteres (acetato e propionato de nerila) atingiram valores maiores durante o estágio de floração, tanto em caules quanto nas flores. Em relação à atividade antifúngica, 11 fungos foram testados, sendo *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium graminearum*, *Helminthosporium oryzae*, *Pythium ultimum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora capsici* e *Septoria tritici*. O óleo essencial com predominância de acetato de nerila demonstrou ação antimicrobiana contra todas as cepas testadas, sendo que a concentração fungicida mínima variou para cada fungo, apresentando valores entre $62 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Bezić et al. (2003) avaliaram a composição do óleo essencial de *Achillea clavennae* L e encontraram 4,2% de acetato de geranila, 0,7% de geranial, 0,2% de isogeraniol e 0,9% de geraniol, sendo que o acetato de geranila encontra-se entre os componentes majoritários do óleo. A atividade antimicrobiana do óleo foi testada frente a diversos micro-organismos e os resultados mostraram ação antimicrobiana baixa (halo de inibição menor que 9 mm) frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, ação antimicrobiana moderada (halo de inibição entre 10 mm e 12 mm) frente a *Escherichia coli* e ação antimicrobiana forte (halo de inibição maior que 13 mm) frente *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. Para a bactéria *Bacillus cereus*, o óleo não demonstrou ação inibitória.

Ainda no mesmo ano, Prashar et al. (2003) identificaram que o óleo essencial extraído de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) tem propriedades antimicrobianas contra células de *Saccharomyces cerevisiae*. Em baixas concentrações (0,1%), o óleo com predominância de 54% geraniol e 20% de acetato de geranila inibiu completamente o crescimento das células, sendo que a ação combinada dos dois compostos foi maior que isoladamente.

Anos mais tarde, Matsuura, Ukeda e Sawamura (2006) avaliaram os constituintes de óleos essenciais cítricos e sua atividade inibitória da tirosinase, enzima que provoca o escurecimento dos frutos. Dentre os principais componentes, estão presentes o acetato de geranila e o acetato de nerila, sendo que ambos, quando avaliados isoladamente, apresentaram excelente ação inibitória da tirosinase (cerca de 85%) na concentração de $167 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Dehghan et al. (2007) analisaram a composição química dos óleos essenciais obtidos a partir de caule/folhas e flores/frutos de *Ferula szovitsiana* (*Umbelliferae*) e identificaram 51 e 47 compostos, respectivamente, sendo que ambos os óleos apresentaram o acetato de nerila como componente principal, com 33,0% (caule/folhas) e 41,5% (flores/frutos). Nerol, geraniol e acetato de geranila também foram encontrados em menores proporções. Os autores também avaliaram a ação dos óleos frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e dois fungos patogênicos. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima do óleo de *F. szovitsiana* para inibição de *Bacillus subtilis* foi de $1,25 \text{ mg}\cdot\text{disco}^{-1}$, para *S. aureus* foi de $10 \text{ mg}\cdot\text{disco}^{-1}$ e para os demais micro-organismos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger* e *C. albicans*) foi maior que $20 \text{ mg}\cdot\text{disco}^{-1}$.

No trabalho de Duarte et al. (2007), os autores realizaram análise química do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* e identificaram a presença de compostos com atividade antimicrobiana, incluindo geraniol (63,46%) e acetato de geranila (28,83%). Os compostos foram avaliados separadamente e tanto o geraniol quanto o acetato de geranila apresentaram ação antimicrobiana frente a *E. coli*. A concentração inibitória mínima de geraniol foi de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os sorotipos ETEC 5041-1 e EPEC 0031-2, respectivamente, enquanto os valores obtidos para o acetato de geranila foram de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Chutia et al. (2009) analisaram o óleo essencial da casca de frutos amadurecidos de *Citrus reticulata* e observaram 37 componentes diferentes, constituindo, aproximadamente, 99% do óleo. Dentre os principais, destacam-se 19,0% de geranial, 14,5% de neral, 3,9% de acetato de geranila, 3,5% de geraniol, 2,3% de nerol e 1,1% de acetato de nerila. Os autores avaliaram a atividade antifúngica do óleo frente a cinco fungos patogênicos de plantas: *Alternaria alternata* (Aa), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Curvularia lunata* (Cl), *Fusarium oxysporum* (Fo) e *Helminthosporium oryzae* (Ho). A concentração inibitória mínima (CIM)

encontrada para Aa, Rs e Cl foi de $0,2 \text{ mL} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ e maior que $0,2 \text{ mL} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ para Fo e Ho. A esporulação fúngica também foi completamente inibida na concentração de $2 \text{ mL} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, exceto para Cl e Ho, que foi de apenas 0,5% e 0,25%.

No mesmo ano, Maxia et al. (2009) investigaram a composição de óleos essenciais de *Daucus carota* portugueses e verificaram a predominância de acetato de geranila em quantidade de até 65% da composição do óleo. O acetato de nerila, o nerol e o geraniol também foram encontrados em menores quantidades. A atividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada frente a diferentes micro-organismos, dentre eles cepas de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os óleos demonstraram ação antifúngica mais acentuada frente a dermatófitos e a *Cryptococcus neoformans*, com valores de concentração inibitória mínima de $0,16 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $0,64 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$.

O trabalho de Zore et al. (2010) demonstrou que o óleo essencial de gerânio e seus constituintes majoritários isolados, dentre eles o acetato de geranila, apresentam excelente atividade contra *Candida albicans* em concentrações que não afetaram a viabilidade de células mamíferas, sendo considerados não tóxicos nesta faixa. A concentração mínima fungicida para o geraniol e para o acetato de geranila foi de 0,064%, em base volumétrica, o que corresponde a $561 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $584 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Em relação ao acetato de geranila, em uma concentração duas vezes maior, isto é, 0,128% ($1168 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ocorreu a morte de apenas 3% das células mamíferas no teste de citotoxicidade, sendo ainda considerado não tóxico.

Campêlo et al. (2011) verificaram a presença de acetato de geranila, nerol e neral, totalizando em torno de 25% da composição do óleo essencial de limão (*Citrus limon*), sendo que o acetato de geranila é o segundo composto em maior composição. Os autores também constataram efeito sedativo e ansiolítico do óleo.

Gonçalves et al. (2012) encontraram aproximadamente 83% de acetato de geranila ao analisar a composição do óleo essencial de *Thapsia minor*, uma planta da família Apiaceae, a qual é comum na região mediterrânea e península Ibérica, sendo utilizada como especiaria. Acetato de nerila e geraniol também foram encontrados em menores quantidades. A atividade antimicrobiana do óleo foi avaliada contra várias cepas fúngicas e foi constatada a ação antifúngica para diferentes cepas de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A maior atividade encontrada foi contra cepas de dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida guilliermondii*, com valores de concentrações inibitórias de $0,32 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $1,25 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Além disso, o óleo demonstrou ter potente atividade anti-inflamatória *in vitro*, em concentrações que não afetaram a viabilidade

de macrófagos e queratinócitos, indicando as propriedades anti-inflamatórias do óleo. Os autores sugerem que a atividade antifúngica e anti-inflamatória pode estar associada com a contribuição majoritária do acetato de geranila no óleo, sendo este o composto ativo para tais propriedades visto que o acetato de geranila isolado também foi avaliado e os resultados para óleo e composto foram próximos.

Um ano depois, Adaszyńska et al. (2013) avaliaram a composição química dos óleos essenciais de cinco variedades de lavanda (*Lavandula angustifolia* L.) e sua atividade biológica contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. As variedades estudadas foram a “Munstead”, a “Munstead Strain”, a “Lavender Lady”, a “Ellegance Purple” e a “Blue River”. O geraniol foi encontrado na composição dos óleos das 5 variedades avaliadas, em quantidades próximas a 1,5%, exceto para a “Blue River”, cujo valor foi de 8,83%. O nerol foi encontrado somente no óleo da variedade “Munstead”, em 1,57%. O acetato de nerila não foi encontrado no óleo da “Blue River”, sendo que nos demais sua presença variou em aproximadamente 1,5% a 2,6% na composição. O acetato de geranila foi encontrado em todos os óleos avaliados em quantidades próximas a 2,4% até 4,1%, exceto para a “Munstead”, cujo valor foi de 10,61%. Também foi encontrado o propionato de nerila no óleo da “Blue River” em 2,82%. Os óleos da variedade “Munstead” e “Blue River” apresentaram inibição para as duas bactérias testadas. A zona de inibição média aproximada foi de 15 mm a 19 mm para *Staphylococcus aureus* e 9,5 mm a 10 mm para *Pseudomonas aeruginosa*. Para estas duas variedades, a soma das quantidades dos compostos citados acima totalizaram 16,18% e 15,77%, respectivamente, sendo a composição majoritária para o primeiro e segunda maior composição para o segundo, o que pode estar relacionado com a ação antibacteriana.

No trabalho de Andrade et al. (2013), os autores constataram ação antimicrobiana dos óleos essenciais de gerânio (*Pelargonium graveolens*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e ylang ylang (*Cananga odorata*) contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O primeiro apresentou em sua composição 25,47% de geraniol, o segundo 57,49% de geraniol e 13,56% de acetato de geranila, enquanto o terceiro 9,87% de acetato de geranila. Quintans-Júnior et al. (2013) avaliaram a atividade antinociceptiva do acetato de geranila e verificaram que na dose de 200 mg·kg⁻¹ o composto apresenta atividade significativa. Além disso, o composto também apresentou certa atividade antioxidante. Tais resultados indicam que o composto pode apresentar propriedades farmacológicas interessantes relacionadas à inflamação e aos processos relacionados à dor, sendo potencialmente útil para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Em seu trabalho, Chen et al. (2014) avaliaram a composição do óleo essencial de *Citrus wilsonii* e encontraram acetato de nerila como o segundo componente majoritário, presente em 10,35%. A bioatividade do óleo e dos componentes separados foi avaliada. O acetato de nerila apresentou ação repelente de 86% frente à *Tribolium castaneum*.

No ano seguinte, Judzentiene, Garjonyte e Budiene (2015) analisaram o óleo essencial de *Eupatorium cannabinum* L e encontraram o acetato de nerila entre os principais componentes, com 20% da composição, atrás apenas do germacreno D, que apresentou 22% da composição. A toxicidade foi testada em camarões e os autores observaram que o óleo foi notavelmente tóxico em concentrações de 16,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Entretanto, não foi identificado se esta toxicidade foi ocasionada por um composto ou pela combinação de vários compostos presentes na composição visto que apenas o óleo foi analisado. Todavia, os autores sugerem, através da comparação com a literatura, que a toxicidade pode ser oriunda da presença do germacreno D.

Ornano et al. (2015) investigaram a composição do óleo essencial de *Helichrysum microphyllum* e identificaram o acetato de nerila como componente majoritário, com 18,2%. A citotoxicidade do óleo foi testada e foi observada forte atividade inibitória de melanomas malignos na concentração de 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além de atividade antioxidante nesta concentração.

Em paralelo, Djihane et al. (2016) identificaram 67 compostos no óleo essencial de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Dentre os majoritários, encontram-se acetato de geranila (10,05%), nerol (5,04%) e acetato de nerila (4,91%). A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a 12 bactérias, duas leveduras e 4 fungos. Os resultados mostraram que o óleo de *H. italicum* inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados, exceto para três bactérias: *E. coli*, *K. pneumonia* e *L. monocytogenes*. A bactéria mais sensível foi a *E. cereus* com concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de 0,79 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentração fungicida e fungistática mínimas foram de 12,65 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 6,325 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, frente a *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Para os fungos, a resistência foi maior e variou de 6,325 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 50,6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em relação ao diâmetro de inibição para as bactérias, os valores variaram de 17 mm a 30 mm e para os fungos de 13 mm a 29 mm.

Em seu trabalho, İşcan (2017) investigou a ação antimicrobiana do acetato de geranila com grau de pureza superior a 97% contra diferentes micro-organismos e observou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans*, bem como contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O acetato de geranila apresentou valores de CIM de 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 e *B. cereus*, 16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e *P. aeruginosa* e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans*.

No ano seguinte, Blažeković et al. (2018) identificaram a presença de geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila no óleo essencial de duas espécies de lavanda e observaram a ação antimicrobiana do óleo frente a várias bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Vinte anos antes, Caccioni et al. (1998) verificaram atividade antifúngica frente a *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* do óleo essencial de duas variedades de limão (*C. limon* e “Femminello”) que apresentaram altos teores de monoterpenos oxigenados, sendo que nos frutos colhidos durante o mês de fevereiro destacou-se a quantidade elevada de nerol, neral, geraniol, geranial e os ésteres derivados destes compostos.

Dănilă et al. (2018) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *L. angustifolia* para o tratamento de infecções por *Staphylococcus epidermidis*. O acetato de nerila esteve entre os componentes majoritários e o acetato de geranila também foi detectado na composição o óleo em menores quantidades. A atividade antimicrobiana foi constatada para a concentração inibitória mínima de $15,63 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os autores acreditam que o acetato de nerila e o acetato de geranila, quando na presença de limoneno, podem ter seu efeito antimicrobiano potencializado.

No mesmo ano, Juliano et al. (2018) avaliaram a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos de *Helichrysum microphyllum* subsp. *tyrrhenicum* coletado em quatro locais diferentes no sudoeste da Sardenha. Um dos óleos revelou a presença de quantidade significativa de acetato de nerila (33,6%). A ação antimicrobiana foi avaliada frente a diferentes espécies de *Candida* e os resultados mostraram concentração inibitória mínima de $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e concentração fungicida mínima de $4 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Khayyat e Sameeh (2018) realizaram estudos antifúngicos com acetato de geranila e seus derivados e verificaram atividade, principalmente frente a *Microsporum gypsum*, *Trichophyton vercossum* e *Candida tropicalis*, com zonas de inibição com o acetato de geranila de 22,6 mm, 14,0 mm e 13,1 mm, respectivamente. Os autores acreditam que os resultados obtidos mostraram que o composto apresenta potencial para ser utilizado em medicamentos, sendo benéfico à saúde humana.

A partir da avaliação dos trabalhos apresentados, é possível verificar que a maioria dos estudos relacionados com a ação antimicrobiana dos compostos abordados nesta proposta de tese, acetato de geranila e acetato de nerila, envolve a presença dos ésteres na composição de óleos essenciais e não na forma isolada ou em elevado grau de pureza. Mesmo com a composição majoritária destes ésteres nos óleos, a maioria dos óleos apresenta concentrações dos ésteres inferiores a 50% visto que o número de componentes geralmente é alto, sendo que são escassos os trabalhos envolvendo a ação antimicrobiana dos compostos isolados ou em concentrações acima de 80%, mostrando a necessidade de mais estudos da atividade

antimicrobiana nessas condições. Tal caracterização é um dos objetivos propostos no presente trabalho.

3.3 TOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Estudos de toxicidade oral aguda dos compostos foram realizadas pelo *U.S. Department of Health and Human Services* vinculado ao *National Toxicology Program* (NTP) (1987) do *National Institute of Environmental Health Sciences* e por outros autores.

A toxicidade de um óleo essencial composto por acetato de geranila (79%) e acetato de citronelila (21%), denominada de acetato de geranila de grau alimentício, foi avaliada pelo NTP (1987). Em teste de exposição aguda com grupos de F344/N (5 machos e 5 fêmeas por grupo) e camundongos B6C3F₁ (5 machos e 5 fêmeas por grupo), os animais receberam uma dose única de acetato de geranila de grau alimentício (500 mg·kg⁻¹, 1000 mg·kg⁻¹, 2000 mg·kg⁻¹, 4000 mg·kg⁻¹ ou 8000 mg·kg⁻¹ de peso corporal) em óleo de milho por gavagem. Não foram usados animais para grupo controle. Todos os ratos que receberam 8000 mg·kg⁻¹ morreram no segundo dia. Nenhuma morte ocorreu entre os ratos tratados com as demais doses, sendo que na dose de 2000 mg·kg⁻¹ a toxicidade foi considerada baixa (NTP, 1987).

Acetato de geranila (produto químico de suporte - componente principal do mirceno acetilado - composto por 60% a 65% acetato de geranila e acetato de nerila, 10% limoneno, 2,5% nerol e geraniol, 2,5% acetato de linalila e outros componentes < 3%) foi testado em ratos Osborne-Mendel (5 machos e 5 fêmeas), que receberam a substância de teste por via oral via gavagem (doses não especificadas) e foram observados por 2 semanas. As mortes ocorreram entre 4 h e 96 h após a administração. O número de mortes por dose não foi relatado. O LD₅₀ (dose letal necessária para matar 50% de uma população teste, normalmente medida em mg de substância por kg de peso corporal dos indivíduos testados) foi de 6330 mg·kg⁻¹ (JENNER et al., 1964; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009).

O geraniol foi testado em ratos Osborne-Mendel (5 machos e 5 fêmeas), que receberam a substância de teste via gavagem oral (doses não especificadas). A morte ocorreu entre 4 h e 18 h, embora o número de mortes por dose não foi relatado. O LD₅₀ obtido foi de 3600 mg·kg⁻¹ (JENNER et al., 1964; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009).

O nerol foi testado em ratos Wistar (10 machos por dose), que receberam a substância de teste em 2560 mg·kg⁻¹ a 9800 mg·kg⁻¹ e foram observados durante 14 dias. O número de mortes por dose foi 1, 4, 7 e 10 para as doses de 2560 mg·kg⁻¹, 4000 mg·kg⁻¹, 6250 mg·kg⁻¹ e

9800 mg·kg⁻¹, respectivamente. Todas as mortes ocorreram dentro de dois dias após a administração da dose. O LD₅₀ obtido foi de 4500 mg·kg⁻¹ (OPDYKE, 1976; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; PUBCHEM, 2019). A toxicidade oral aguda em ratos apresentou valor de LD₅₀ para acetato de nerila de 5000 mg·kg⁻¹ (OPDYKE, 1976). Não há detalhes sobre a pureza dos compostos nos estudos da toxicidade aguda de geraniol, nerol e acetato de nerila, bem como não há estudos detalhados para a toxicidade oral em doses repetidas de nerol a acetato de nerila.

Estudos de toxicidade oral em doses repetidas do acetato de geranila também foram realizadas pelo *U.S. Department of Health and Human Services* vinculado ao *National Toxicology Program* (NTP) (1987) do *National Institute of Environmental Health Sciences* e outros autores.

Em um estudo da NTP (1987), ratos F344/N (10 machos e 10 fêmeas por dose) receberam uma mistura de 71% de acetato de geranila e 29% de acetato de citronelila em óleo de milho via gavagem oral a 0 mg·kg⁻¹, 250 mg·kg⁻¹, 500 mg·kg⁻¹, 1000 mg·kg⁻¹, 2000 mg·kg⁻¹ ou 4000 mg·kg⁻¹ ao dia, 5 dias por semana, durante 13 semanas. Sinais clínicos e pesos corporais foram registrados. As necropsias foram realizadas e os tecidos examinados em grupos de alta dose e controles. Com 4000 mg·kg⁻¹ ao dia, uma fêmea e 2 machos morreram, sendo que o ganho médio de peso corporal diminuiu nos machos em 19% e nas fêmeas em 8%. Não foram observadas alterações histopatológicas relacionadas ao tratamento (NTP, 1987). O LOAEL (nível do menor efeito adverso observável) foi de 4000 mg·kg⁻¹ ao dia (com base na mortalidade e no ganho de peso corporal diminuído) e o NOAEL (nível sem efeito adverso observável) foi de 2000 mg·kg⁻¹ ao dia (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; NTP, 1987).

A mistura com 71% de acetato de geranila e 29% de acetato de citronelila, denominada acetato de geranila de grau alimentício, também foi avaliada pela NTP (1987) em camundongos B6C3F₁ (10 machos e 10 fêmeas por dose) que receberam a mistura em óleo de milho via gavagem oral a 0 mg·kg⁻¹, 125 mg·kg⁻¹, 250 mg·kg⁻¹, 500 mg·kg⁻¹, 1000 mg·kg⁻¹ ou 2000 mg·kg⁻¹ ao dia, 5 dias por semana, durante 13 semanas. Sinais clínicos e pesos corporais foram registrados. As necropsias foram realizadas e os tecidos examinados em grupos de alta dose e controles. Com 2000 mg·kg⁻¹ ao dia, 7 machos e 9 fêmeas morreram, sendo que o peso corporal dos machos diminuiu em comparação com os controles. Com esta dose, foi observada inflamação ou edema no estômago e vacuolização citoplasmática (lipidose) no fígado, rim e miocárdio. Nenhum outro efeito foi relatado (NTP, 1987). O LOAEL foi de 2000 mg·kg⁻¹ ao dia (com base na mortalidade, vacuolização, lesões estomacais e diminuição

do peso corporal) e o NOAEL foi de 1000 mg·kg⁻¹ ao dia (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; NTP, 1987).

O estudo em ratos F344/N com a mistura de 71% de acetato de geranila e 29% de acetato de citronelila em óleo de milho também foi realizado em grupo maior (50 machos e 50 fêmeas por grupo) por um período de tempo mais longo (5 dias por semana, durante 103 semanas) via gavagem oral a 1000 mg·kg⁻¹ ou 2000 mg·kg⁻¹ ao dia pela NTP (1987). O grupo controle recebeu óleo de milho. O peso corporal foi avaliado e os animais foram necropsiados para realização da histopatologia dos principais tecidos e órgãos. Nenhum sinal clínico relacionado ao composto foi observado. Com 2000 mg·kg⁻¹ ao dia, a sobrevivência diminuiu significativamente nos machos ($p < 0,001$). Os pesos corporais médios e os ganhos de peso corporal diminuíram em machos com altas doses e fêmeas em ambas as doses após a semana 40. Os pesos corporais foram menores do que os controles em mais de 10% apenas na dose alta. Em fêmeas com altas doses, a incidência de nefrose foi de 63% em comparação com 26% nos controles. Em machos com altas doses, a incidência de nefrose foi de 90% em comparação com 80% nos controles (NTP, 1987). O LOAEL foi de 2000 mg·kg⁻¹ ao dia (com base na redução da sobrevivência em machos, aumento da incidência de nefropatia e diminuição do peso corporal) e o NOAEL foi de 1000 mg·kg⁻¹ ao dia (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; NTP, 1987).

A mistura de acetato de geranila e acetato de citronelila foram avaliados em um estudo de triagem de 17 semanas usando as diretrizes da FDA com ratos Osborne-Mendel (10 machos e 10 fêmeas por dose), que receberam a substância de teste (composição percentual não disponível) na dieta a 1000 ppm, 2500 ppm ou 10000 ppm (relatado como, aproximadamente, 500 mg·kg⁻¹ ao dia na dose mais alta). Não houve efeito sobre o peso corporal, consumo de alimentos, condições gerais ou parâmetros hematológicos. O exame macroscópico de todos os tecidos e o exame histopatológico do fígado, rins, baço, coração e testículos dos grupos de alta dose e controles não mostraram efeitos adversos. O NOAEL foi de aproximadamente 500 mg·kg⁻¹ ao dia (dose mais alta testada) (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; PUBCHEM, 2019).

A mistura de citronelol e geraniol foi avaliada em um estudo de triagem da *Food and Drug Administration* (FDA) com ratos Osborne-Mendel (5 machos e 5 fêmeas por dose). Os animais receberam a mistura (percentagens de cada componente não fornecidas) através da dieta a 1000 ppm ou 10000 ppm (aproximadamente 50 mg·kg⁻¹ ou 500 mg·kg⁻¹ ao dia) por 189 – 196 dias ou 112 dias, respectivamente. Semanalmente, medições de peso corporal, consumo de alimentos e condição geral dos animais dos grupos tratados foram comparáveis

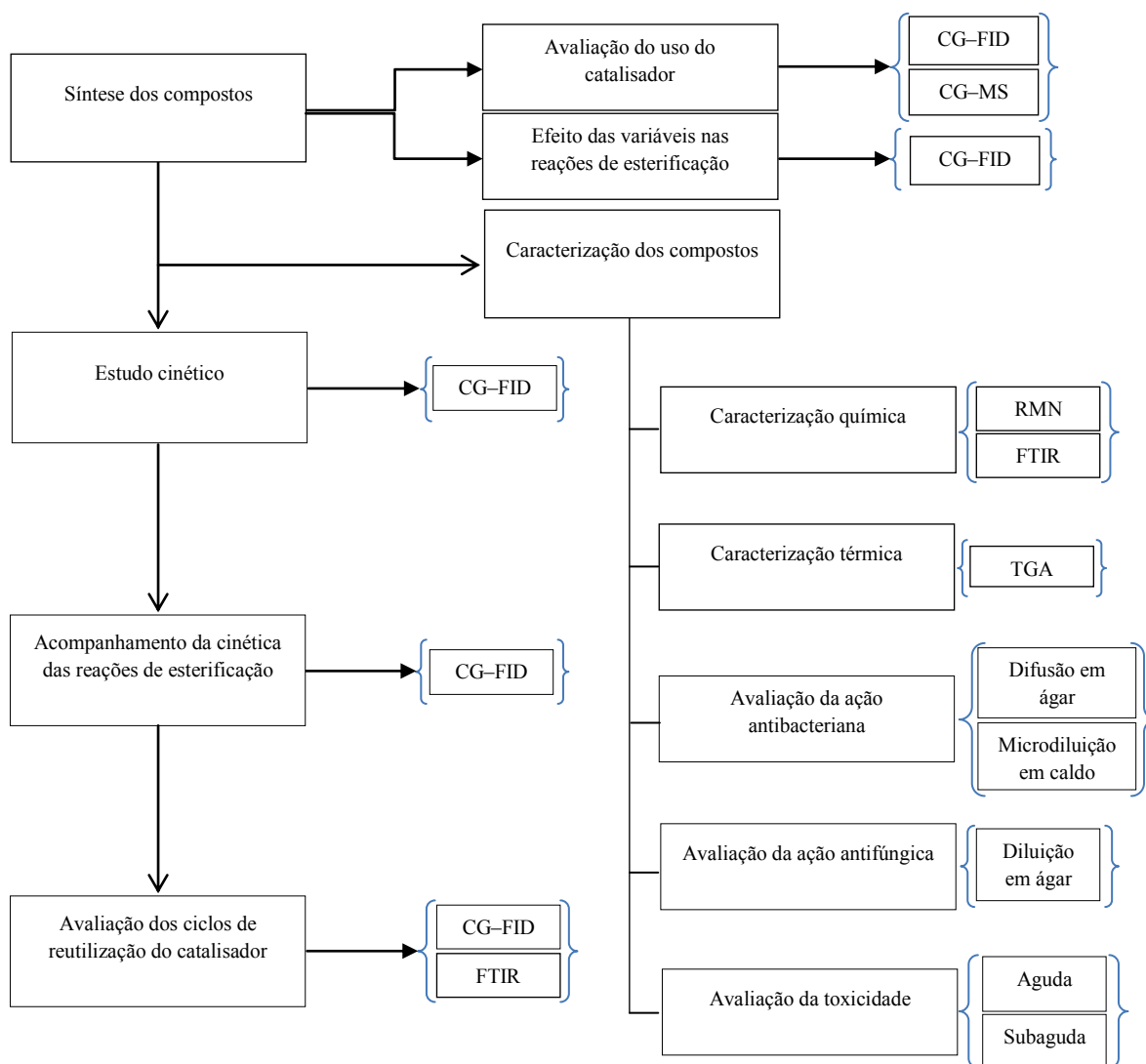
ao grupo controle. Ao findar do estudo, nenhum efeito foi observado nos parâmetros hematológicos, pesos dos órgãos ou durante o exame macroscópico. A histopatologia de órgãos e tecidos limitados (fígado, rim, baço, coração e testículos) não apresentou lesões com o tratamento. O NOAEL foi de aproximadamente $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ao dia (dose mais alta testada) (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009, PUBCHEM, 2019).

Pelos estudos citados, observa-se a tendência de redução da toxicidade do éster comparado ao álcool, mesmo com grau de pureza abaixo de 80%. Também é possível verificar que são estudos antigos, sendo que as metodologias para avaliação, bem como normas a serem seguidas nos testes, sofreram alterações após o período de realização dos trabalhos citados. Além disso, para alguns estudos, o grau de pureza dos compostos e as doses testadas não são especificadas. Neste contexto, a necessidade de realização de mais pesquisas envolvendo a toxicidade destes compostos é uma oportunidade eminente e envolve a proposta do presente trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada na realização desta tese contempla o objetivo de sintetizar os acetatos de geranila e nerila via catálise heterogênea a partir de geraniol e nerol, bem como avaliar a ação antimicrobiana e a toxicidade oral destes compostos, fornecendo uma caracterização adequada para potenciais aplicações futuras como aditivos antimicrobianos. Neste contexto, as principais etapas experimentais estão organizadas e apresentadas na Figura 6, na forma de um fluxograma.

Figura 6 – Fluxograma com as principais etapas das metodologias empregadas no trabalho.



Fonte: a autora (2021).

O detalhamento das etapas descritas no fluxograma da Figura 6 está apresentado nos itens a seguir.

4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Para atender o objetivo de sintetizar os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, derivados dos compostos naturais geraniol e nerol, via catálise heterogênea, foi proposta a utilização da resina polimérica Lewatit® GF 101 como catalisador para a reação de esterificação. Este polímero é indicado por LanXess (2014) para a catálise de reações orgânicas, sendo recomendado para reações de esterificação de redução de ácidos graxos livres em triglicerídeos com metanol ou etanol em seus ésteres derivados antes da reação de transesterificação do biodiesel.

Os ensaios de síntese dos compostos foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias II integrado ao Laboratório de Materiais Multifuncionais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os reagentes utilizados foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), anidrido acético (Vetec, P.A), n-hexano (Dinâmica, P.A.), etanol (Vetec, P.A) e a resina polimérica Lewatit® GF 101 (LanXess).

4.1.1 Avaliação do uso do catalisador

Os ensaios para avaliação da necessidade de aplicação do catalisador na reação de esterificação de geraniol ou nerol com anidrido acético para sintetizar acetato de geranila ou nerila foram realizados conforme as etapas descritas nos itens a seguir.

4.1.1.1 Preparação do catalisador para as reações de esterificação

A resina Lewatit® GF 101 foi armazenada em local seco e fresco, sem exposição direta ao sol, conforme recomendação do fabricante (LANXESS, 2014). Antes de sua utilização nas reações de esterificação, a resina foi previamente lavada em um béquer com agitação constante (250 rpm) em duas etapas de 15 min (TISCHER et al., 2019). A primeira etapa foi realizada para remoção dos resíduos com n-hexano (15 mL) e a segunda para ativação catalítica com etanol (15 mL) (TISCHER et al., 2019). Após cada etapa de lavagem, a resina foi filtrada usando papel de filtro (diâmetro dos poros: 18 μm a 24 μm) e, em seguida,

seca em estufa a 60 °C por 1 h, tempo em que a massa ficou constante (TISCHER et al., 2019).

4.1.1.2 Reações de esterificação

As condições operacionais dos ensaios de síntese do acetato de geranila e do acetato de nerila foram definidas a partir da avaliação dos estudos reportados na literatura por Zanetti et al. (2016), dedicado à síntese do éster acetato de geranila obtido a partir de geraniol; por Lozano, Bernal e Navarro (2012), dedicado à síntese dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila a partir da esterificação de geraniol e nerol com ácido acético, ambos os trabalhos empregando catálise enzimática; por Chen et al. (2016), dedicado à síntese de acetato de geranila a partir de geraniol e anidrido acético empregando catálise heterogênea com ácidos sólidos e resinas de troca iônica; e por Tischer et al. (2019), dedicado à síntese de acetato de eugenila a partir de eugenol e anidrido acético empregando a resina Lewatit® GF 101 como catalisador.

Para os ensaios de avaliação do uso do catalisador, onde foram realizadas as reações de esterificação com e sem a utilização da resina Lewatit® GF 101, a razão molar definida entre geraniol e anidrido acético foi de 1:2, sendo o geraniol ou o nerol o reagente limitante da reação e o anidrido acético o reagente em excesso. A temperatura de reação definida foi de 30 °C, o tempo de reação definido foi de 2 h e o conteúdo inicial de geraniol ou nerol definido foi de 3 mmol. Nas reações catalisadas, o teor de catalisador definido foi de 3% (m/m) em relação à massa de reagente limitante (geraniol ou nerol). As reações de esterificação foram conduzidas em triplicata.

Frascos de vidro Erlenmeyer (125 mL) foram utilizados como reator em batelada, acoplados a um banho termostático agitado (LS Logen Scientific, modelo LS 4500) com controlador digital de temperatura e rotação orbital controlada (250 rpm). A temperatura da mistura reacional foi verificada usando um termômetro. Uma vez que a reação foi completada, o catalisador foi separado da mistura de reação por filtração usando papel filtro (diâmetro dos poros: 18 µm a 24 µm). Amostras de reação (10 µL) foram diluídas em metanol (990 µL) e analisadas imediatamente por cromatografia gasosa para verificação do grau de pureza e da composição dos produtos, conforme procedimento descrito na Seção 4.1.1.3. As reações de controle sem catalisador foram conduzidas em paralelo usando condições idênticas para fins comparativos.

4.1.1.3 Cromatografia Gasosa (CG-FID e CG-MS)

A cromatografia gasosa (CG-FID) foi aplicada com o objetivo de verificar o grau de pureza dos reagentes e produtos, bem como para acompanhamento quantitativo da conversão das reações e seletividade para os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologias Ambientais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os reagentes utilizados foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), anidrido acético (Vetec, P.A), acetato de geranila e acetato de nerila (conforme síntese descrita na Seção 4.1.1.2) e metanol (J.T Baker, HPLC, pureza de 99,8%).

A análise por cromatografia gasosa foi realizada em equipamento GC-MS Agilent (7890B) acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolar (5977A) e detector de ionização de chama (FID) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), coluna capilar HP-SMS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m \times 250 μm \times 0,25 μm), hélio como gás carreador (1,2 mL \cdot min⁻¹), temperaturas programadas de 180 °C até 240 °C com taxa de 20 °C \cdot min⁻¹. Para a preparação das amostras, 10 μL da amostra foi diluída com 990 μL de metanol. As amostras foram analisadas imediatamente após diluição por cromatografia gasosa.

A identificação química dos compostos foi confirmada por espectrometria de massa (CG-MS). A temperatura da linha de transferência MS foi ajustada para 250 °C e a temperatura das fontes de íons para 230 °C. Para detecção de GC-MS, um sistema de ionização de elétrons foi usado com energia de ionização definida em 70 eV e faixa de massa em m/z 40 – 400. Os analitos foram detectados e identificados por comparação de espectro de massa usando a NIST 5.01 Mass Spectral Library (Agilent P/N G1033A).

A conversão da reação foi calculada de acordo com outros trabalhos reportados na literatura por Nicoletti et al. (2015), Paroul et al. (2010), Tischer et al. (2019) e Zanetti et al. (2016) com base na redução da área de pico do reagente limitante (geraniol ou nerol) em relação à área do pico padrão. A seletividade foi calculada com base no aumento da área do pico do acetato de geranila ou nerila e subprodutos e na conversão do geraniol ou nerol.

4.1.1.4 Processo de separação

O conteúdo líquido reacional após a conclusão das reações descritas na Seção 4.1.1.2 foi separado por destilação fracionada para remover o excesso de anidrido acético e o ácido acético formado durante a esterificação.

A mistura oriunda da reação foi destilada em cada temperatura de ponto de ebulição correspondente (ácido acético: 118 °C, anidrido acético: 140 °C, nerol: 224 °C, geraniol: 230 °C, acetato de nerila: 242 °C e acetato de geranila: 245 °C) pelo tempo necessário para se obter as frações aproximadas esperadas de cada composto (ácido acético: 20%, anidrido acético: 60% e acetato de geranila ou nerila: 60%).

O produto obtido foi transferido para um frasco de vidro âmbar, armazenado sob refrigeração à temperatura de 4 °C e reservado para as análises posteriores.

4.1.2 Efeito das variáveis nas reações de esterificação

Com o objetivo de avaliar a influência das variáveis operacionais nas reações de esterificação, um planejamento experimental foi aplicado, buscando a otimização do processo de produção dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila em relação à eficiência de conversão do geraniol ou nerol e rendimento de acetato de geranila ou nerila.

A técnica de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para três variáveis independentes (2^3) com triplicata no ponto central e seis pontos axiais (17 ensaios) foi usada. As variáveis operacionais avaliadas foram: temperatura, teor de catalisador e razão molar álcool:anidrido acético, conforme intervalos de variação descritos na Tabela 1. As variáveis e condições operacionais escolhidas para o delineamento experimental foram baseadas em estudos reportados na literatura por Zanetti et al. (2016), Lozano, Bernal e Navarro (2012), Chen et al. (2016) e Tischer et al. (2019) e confirmadas em testes preliminares.

Tabela 1 – Valores utilizados no DCCR para 3 fatores na esterificação de geraniol e nerol com anidrido acético.

Reagente	Variáveis	Valores codificados				
		<i>-1,68</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>+1,68</i>
	Temperatura (°C)	31,6	35	40	45	48,8
Geraniol	Teor de catalisador (% m/m)	3,6	5	7	9	10,4
	Razão molar (mol/mol)	1:2,3	1:3	1:4	1:5	1:5,7
	Temperatura (°C)	26,6	30	35	40	43,4
Nerol	Teor de catalisador (% m/m)	1,6	3	5	7	8,4
	Razão molar (mol/mol)	1:1,3	1:2	1:3	1:4	1:4,7

Fonte: a autora (2021).

Na síntese de acetato de geranila, o conteúdo inicial de geraniol foi de 3 mmol e o tempo de reação de 45 min, enquanto na síntese de acetato de nerila o conteúdo inicial de nerol foi de 3 mmol e o tempo de reação de 15 min. Cabe ressaltar que nos testes preliminares observou-se que a velocidade de agitação na faixa de 200 rpm a 300 rpm proporcionou uma mistura adequada do meio reacional e influência desprezível nas reações. Então, a velocidade de agitação não foi incluída no delineamento experimental e foi utilizado um valor constante de 250 rpm.

A preparação da resina para todas as reações de esterificação foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.1. As reações de esterificação foram conduzidas em frascos de vidro Erlenmeyer acoplados a um banho termostático agitado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2. Uma vez que as reações foram concluídas, o catalisador foi separado da mistura de reação e as amostras foram diluídas em metanol de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2 e, então, imediatamente analisadas por cromatografia gasosa de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.3.

A combinação com as condições experimentais das variáveis do delineamento experimental para cada ensaio realizado é apresentada na Seção 5.1.2, juntamente com os resultados obtidos nos ensaios de cada condição na Tabela 5 para a síntese do acetato de geranila e na Tabela 6 para a síntese do acetato de nerila.

Os dados experimentais foram tratados estatisticamente através do software Statistica® (Statsoft Inc, EUA) por meio de análise de variância (ANOVA) adotando-se um nível de confiança de 99% ($p < 0,01$), análise de regressão, plotagem de superfície de resposta e superfície de contorno. Os modelos obtidos foram validados pelo teste-F.

4.2 ESTUDO CINÉTICO

Após a avaliação dos resultados do planejamento experimental e conhecidas as condições operacionais que maximizam a produção dos ésteres e o consumo dos álcoois, o acompanhamento da cinética de reação nas condições ótimas foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento das reações de esterificação em função do tempo. Os resultados foram avaliados em termos da conversão de geraniol e nerol, seletividade para o acetato de geranila ou nerila, perfil de concentração dos compostos ao longo do tempo, taxa de reação para o consumo de geraniol ou nerol e para a formação de acetato de geranila ou nerila e subprodutos.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias II integrado ao Laboratório de Materiais Multifuncionais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os reagentes utilizados foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), anidrido acético (Vetec, P.A), n-hexano (Dinâmica, P.A), etanol (Vetec, P.A) e resina polimérica Lewatit® GF 101 (LanXess).

O estudo cinético foi realizado com as condições experimentais ótimas fornecidas pelo delineamento experimental apresentadas na Seção 5.1.2 e avaliado em intervalos de 10 min para a síntese do acetato de geranila e de 5 min para a síntese do acetato de nerila até o consumo completo dos álcoois.

A preparação da resina para todas as reações de esterificação do estudo cinético foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.1. Todas as reações de esterificação do estudo cinético foram conduzidas em triplicata em frascos de vidro Erlenmeyer acoplados a um banho termostático agitado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2. Uma vez que as reações foram concluídas, o catalisador foi separado da mistura reacional e as amostras foram diluídas em metanol de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2 e, então, imediatamente analisadas por cromatografia gasosa de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.3.

As constantes cinéticas e as constantes de ordem das reações nas condições operacionais ótimas foram estimadas por regressão não linear usando o software OriginPro® (OriginLab, EUA).

4.3 AVALIAÇÃO DOS CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de reutilização do catalisador, foram realizados novos ensaios para as reações de esterificação de síntese dos acetatos empregando o catalisador por ciclos de utilização consecutivos. Os resultados foram avaliados em termos da conversão de geraniol ou nerol e da seletividade para o acetato de geranila ou nerila.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias II integrado ao Laboratório de Materiais Multifuncionais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os reagentes utilizados foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), anidrido acético (Vetec, P.A), n-

hexano (Dinâmica, P.A), etanol (Vetec, P.A) e resina polimérica Lewatit® GF 101 (LanXess).

A reutilização do catalisador por 9 ciclos foi avaliada usando as condições experimentais ótimas fornecidas pelo delineamento experimental e pelo estudo cinético, apresentadas na Seção 5.1.2 e Seção 5.2.1, respectivamente (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar álcool:anidrido acético de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo inicial de álcool de 3 mmol, tempo de reação de 70 min para a síntese do acetato de geranila e 40 min para a síntese do acetato de nerila).

A preparação da resina para todas as reações de esterificação do primeiro ciclo foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.1. Antes de iniciar um novo ciclo de uso, após a utilização no ciclo anterior, o catalisador foi removido da mistura reacional por filtração com papel filtro (diâmetro dos poros: 18 µm a 24 µm). Em seguida, o catalisador foi previamente preparado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.1, compreendendo a lavagem com agitação constante (250 rpm) em duas etapas de 15 min (a primeira etapa utilizando 15 mL de n-hexano e a segunda usando 15 mL de etanol), seguidas por filtração em papel de filtro (após cada etapa de lavagem) e, finalmente, secagem em estufa a 60 °C por 1 h.

Todas as reações de esterificação para avaliação dos ciclos de reutilização do catalisador foram conduzidas em triplicata em frascos de vidro Erlenmeyer acoplados a um banho termostático agitado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2. Uma vez que as reações foram concluídas, o catalisador foi separado da mistura de reação e as amostras foram diluídas em metanol de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.2 e, então, imediatamente analisadas por cromatografia gasosa de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.3.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Diversas análises foram realizadas a fim de caracterizar os compostos envolvidos neste trabalho, principalmente com o intuito de comprovar a síntese dos ésteres, demonstrar as suas atividades antimicrobianas e seus níveis de toxicidade oral. As análises abrangem a caracterização química, térmica, avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade oral dos compostos e estão descritas nos itens a seguir.

4.4.1 Caracterização química

A caracterização química dos compostos foi realizada por ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e cromatografia gasosa, conforme descrito nas seções a seguir.

4.4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi realizada com o objetivo de auxiliar na caracterização química dos ésteres visto que permite determinar a fórmula química, estrutural e espacial dos compostos por meio da análise dos espectros de absorção de RMN ^{13}C e RMN ^1H , quando submetidos à radiação eletromagnética na presença de um campo magnético forte em frequência específica.

As análises foram realizadas na Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Foram realizadas análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H (RMN ^1H), espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{13}C (RMN ^{13}C) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear DEPT 135 (RMN ^{13}C DEPT 135) em um espectrômetro Varian NMR AS 400 operando a 400 MHz e utilizando clorofórmio deuterado como solvente. Para as análises de RMN, as amostras foram previamente purificadas por destilação fracionada de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.4.

A partir dos resultados das análises de RMN ^1H foi possível determinar o número de hidrogênios e as ligações realizadas por eles. A partir dos resultados das análises de RMN ^{13}C , foi possível determinar o número de carbonos e as ligações realizadas por eles. Finalmente, a partir dos resultados das análises de RMN ^{13}C DEPT 135, foi possível determinar se os agrupamentos das ligações entre carbono e hidrogênio são de CH, CH₂ ou CH₃, complementando os resultados das análises de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e confirmando a estrutura química dos compostos.

4.4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de identificar os grupos funcionais dos compostos, auxiliando na sua caracterização química e corroborando com os resultados obtidos pelas análises de RMN, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada.

Para os ensaios de FTIR, foi utilizado um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies, modelo Cary 600 Series FTIR) por refletância total atenuada com cristal de diamante. Os espectros foram obtidos num intervalo de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

Foram realizadas análises de FTIR dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, bem como dos reagentes geraniol e nerol para propósitos comparativos. Para as análises de FTIR, as amostras dos ésteres foram previamente purificadas por destilação fracionada, conforme procedimento descrito na Seção 4.1.1.4.

Cabe ressaltar que a análise de FTIR para a resina Lewatit® GF 101 antes de sua aplicação também foi realizada a fim de confirmar a presença do grupo funcional responsável pela catálise. Além disso, para verificar possíveis mudanças estruturais após a sua utilização como catalisador, a análise de FTIR da resina após o nono ciclo de utilização na reação de esterificação para a síntese do acetato de geranila foi realizada.

4.4.1.3 Cromatografia Gasosa (CG–FID e CG–MS)

Com o objetivo de determinar o grau de pureza dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila, auxiliando na sua caracterização química e na interpretação dos resultados das caracterizações posteriores (térmica, antibacteriana, antifúngica e toxicidade), a cromatografia gasosa (CG–FID e CG–MS) foi realizada.

As amostras dos ésteres foram previamente purificadas por destilação fracionada, conforme procedimento descrito na Seção 4.1.1.4 e, então, analisadas por cromatografia gasosa de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.1.3.

4.4.2 Caracterização térmica

A caracterização térmica dos compostos foi realizada por análise termogravimétrica, conforme descrito na seção a seguir.

4.4.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica dos compostos, foi realizada a análise termogravimétrica (TGA), que mostra a variação da massa em função do tempo e/ou da

temperatura, auxiliando na caracterização térmica dos compostos, bem como na avaliação das condições operacionais do processo de síntese.

As curvas termogravimétricas foram obtidas através de analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 com um programa de temperatura de 25 °C a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ e vazão de 50 mL·min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

Foram realizadas análises termogravimétricas dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila, bem como dos reagentes geraniol e nerol para propósitos comparativos. Para a TGA, as amostras dos ésteres foram previamente purificadas por destilação fracionada, conforme procedimento descrito na Seção 4.1.1.4.

4.4.3 Avaliação da ação antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos pela catálise heterogênea proposta neste trabalho, foram utilizadas duas técnicas, o ensaio de difusão em ágar e o ensaio de microdiluição em caldo. A atividade antimicrobiana dos álcoois precursores também foi realizada para fins comparativos.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Materiais Antimicrobianos integrado ao Laboratório de Materiais Multifuncionais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. A atividade antibacteriana dos compostos foi avaliada de acordo com o procedimento descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M07-A11: Métodos para testes de sensibilidade aos antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico (CLSI, 2018^a) e documento M02-A13: Padrões de Desempenho para Testes de Suscetibilidade de Disco Antimicrobiano (CLSI, 2018^b), com adaptações.

Os reagentes utilizados para as análises antibacterianas foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza ≥ 97%), nerol (Sigma – Aldrich, pureza ≥ 97%), acetato de geranila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), acetato de nerila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), *Brain Heart Infusion* – BHI (Merck, P.A.), *Mueller Hinton* (Merck, P.A.), cloreto de sódio (Merck, P.A.), dimetilsulfóxido – DMSO (Vetec, P.A.) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico – TTC (Merck).

Como micro-organismos, foram utilizadas cepas padronizadas pela *American Type Culture Collection* – ATCC (Bioscan) de seis bactérias. Como Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 10876) e como Gram-

negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

4.4.3.1 Preparo do inóculo e suspensão bacteriana

As cepas de bactérias liofilizadas, inicialmente na forma de pellets, foram hidratadas em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) por 24 h a 35 ± 1 °C. Em seguida, foi realizada a homogeneização em agitador vortex (Quimis, q220) por 15 s e o preparo do inóculo para cada micro-organismo foi realizado em tubos de ensaio estéreis com uma alíquota da suspensão bacteriana cultivada em 3 mL de caldo BHI. O inóculo foi incubado em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) a 35 ± 1 °C por 24 h (CLSI, 2018^a).

Em seguida, o ágar Mueller Hinton a 45 °C foi adicionado em placas de Petri (90 mm × 15 mm) e aguardou-se a solidificação em temperatura ambiente. Com o auxílio de uma alça, uma alíquota foi retirada da suspensão bacteriana (inóculo) e espalhada sobre a superfície do ágar, em placas diferentes para cada micro-organismo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) a 35 ± 1 °C por 24 h. Foram retiradas das placas três a cinco colônias bacterianas, as quais foram imersas em 4 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,9%). A turbidez do meio foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis (Bel photonics, 1105), medindo a absorvância no comprimento de onda de 619 nm até a obtenção da concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (absorvância entre 0,08 e 0,10) (CLSI, 2018^a).

4.4.3.2 Ensaio de difusão em ágar

O ensaio de difusão em ágar foi utilizado para verificar se os compostos possuem atividade antibacteriana frente aos micro-organismos testados. Este teste avalia de forma qualitativa a ação antibacteriana através da formação de halos de inibição do crescimento bacteriano em torno do poço onde os compostos são depositados.

Para os ensaios de difusão em ágar, inicialmente foram obtidas as suspensões bacterianas na concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹, de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.4.3.1.

Inicialmente, o ágar Mueller Hinton a 45 °C foi adicionado a placas de Petri (90 mm × 15 mm) e aguardou-se a solidificação em temperatura ambiente, resultando em uma camada de aproximadamente 4 mm de profundidade. Em seguida, uma alíquota da suspensão bacteriana a 10^8 UFC·mL⁻¹ foi semeada pela técnica de plaqueamento em superfície no ágar

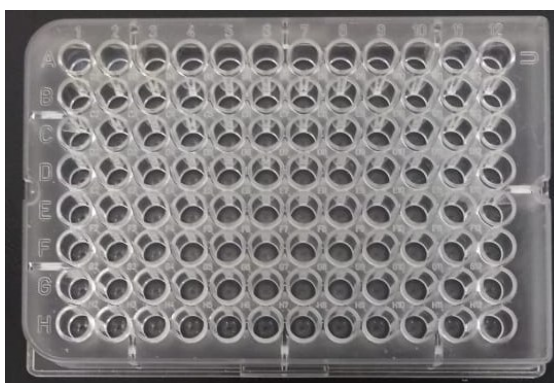
com o auxílio de um swab em três direções na forma de estrias. Após 5 min, três orifícios circulares foram feitos equidistantes no ágar (caracterizando a triplicata da análise), com um diâmetro de aproximadamente 9 mm (CLSI, 2018^a; CLSI, 2018^b).

Utilizando uma placa para cada composto e para cada micro-organismo, o composto (100 µL) foi adicionado aos orifícios. Este volume foi utilizado por ser compatível com as dimensões do orifício. Para verificar o crescimento dos micro-organismos, foram preparadas placas controle estriada com os micro-organismos, sem orifício e sem adição do composto antibacteriano. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) por 24 h. Concluído esse tempo, avaliou-se a formação de halos de inibição ao redor dos orifícios. Os diâmetros dos halos foram medidos com auxílio de paquímetro (Jomarca). A espessura dos halos de inibição foi obtida fazendo a diferença entre o diâmetro dos halos e o diâmetro do orifício (CLSI, 2018^a; CLSI, 2018^b). A partir da formação dos halos, os micro-organismos são classificados nas categorias sensíveis, intermediários ou resistentes aos compostos antimicrobianos (CLSI, 2018^b).

4.4.3.3 Ensaio de microdiluição em caldo e diluição em ágar

Após verificar se os compostos possuem ação antibacteriana pelo teste qualitativo de difusão em ágar, é necessário determinar qual é a concentração mínima de composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo. O teste foi realizado em microplacas com fundo em forma de U constituídas por 96 micropoços (INLAB) distribuídos em 8 linhas nomeadas de “A” a “H” e 12 colunas numeradas de 1 a 12, conforme Figura 7.

Figura 7 – Microplacas utilizadas no teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).



Fonte: a autora (2021).

Inicialmente, oito soluções de cada composto foram preparadas por diluição com solução de DMSO (10%) em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se as concentrações do composto na solução mostrada na Tabela 2. A solução de DMSO (10%) é utilizada no preparo das diluições pois os compostos são insolúveis em água.

Tabela 2 – Concentrações de composto na solução e nos micropoços usados no teste de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima de geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila frente a cada bactéria.

Micro-organismo	<i>B. cereus</i> e <i>P. mirabilis</i>		<i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	
	Concentração do composto na solução [mg·mL ⁻¹]	Concentração do composto no micropoço [mg·mL ⁻¹]	Concentração do composto na solução [mg·mL ⁻¹]	Concentração do composto na microplaca [mg·mL ⁻¹]
A	120,00 (170,00)*	60,00 (85,00)*	50,00 (12,50) [#]	25,00 (6,25) [#]
B	60,00	30,00	25,00	12,50
C	30,00	15,00	12,50	6,25
D	15,00	7,50	6,25	3,12
E	7,50	3,75	3,12	1,56
F	3,75	1,87	1,56	0,78
G	1,87	0,94	0,78	0,39
H	0,94	0,47	0,39	0,20

*Concentração utilizada na linha A apenas para o composto acetato de nerila frente ao micro-organismo *P. mirabilis*, com diluição pela metade na linha B e proporcionalmente até a linha H.

[#]Concentração utilizada na linha A apenas para o composto geraniol frente ao micro-organismo *S. aureus*, com diluição pela metade na linha B e proporcionalmente até a linha H.

Fonte: a autora (2021).

O caldo BHI (100 µL) e a solução de álcool (geraniol ou nerol) empregados na diluição A (100 µL) foram adicionados aos micropoços nas colunas 1, 2 e 3 (caracterizada como a análise em triplicata) da linha A, obtendo-se a concentração do composto nos micropoços mostrados na Tabela 2. O mesmo procedimento foi realizado nas colunas 5, 6 e 7 para a solução de éster (acetato de geranila ou acetato de nerila) na diluição A, bem como para as outras diluições com as soluções de álcool e éster nas linhas B a H, conforme mostrado na Tabela 2.

Em seguida, a suspensão bacteriana ($5 \mu\text{L}$) a $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (preparada de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.4.3.1) foi adicionada a estes micropoços. Na coluna 9 (controle positivo), foram inseridos BHI ($100 \mu\text{L}$) e suspensão bacteriana ($5 \mu\text{L}$) a $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, a fim de certificar que o caldo utilizado permite o crescimento dos micro-organismos. Na coluna 10 (controle negativo), foram adicionados BHI ($100 \mu\text{L}$), solução DMSO a 10% ($100 \mu\text{L}$) e suspensão bacteriana ($5 \mu\text{L}$) a $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, a fim de se certificar que a solução DMSO (10%), usada como solvente para a análise, não inibe o crescimento bacteriano. Cabe ressaltar que já foi constatado por Zanetti et al. (2015) que, nesta concentração, o DMSO não é tóxico e não interfere na inibição do crescimento microbiano. Na coluna 12, apenas BHI ($100 \mu\text{L}$) foi adicionado para atestar a esterilidade do meio de cultura (branco). As colunas 4, 8 e 11 não foram utilizadas.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5), a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 h. Após esse período, a solução de TTC a 0,5% ($20 \mu\text{L}$) foi adicionada a cada micropoço para promover a mudança na cor do meio, permitindo a visualização do crescimento bacteriano. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h. Ao final, os micropoços que apresentaram mudança visual de cor para vermelho indicaram que houve crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de composto nos micropoços capaz de inibir o crescimento visível da bactéria, detectada nos micropoços que não apresentaram alteração da cor para vermelho a olho nú (CLSI, 2018^a).

Para confirmação se no valor de CIM a ação antibacteriana do composto é parcial (inibitória) ou completa (bactericida), foi realizado o teste de diluição em ágar. A diluição dos compostos em ágar na CIM foi preparada com 40 mL de meio de cultura estéril ágar Mueller Hinton a uma temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume desejado do composto correspondente à CIM.

Após agitação, 40 mL do conteúdo de cada diluição foram transferidos para diferentes placas de Petri ($90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$) e aguardou-se a solidificação em temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota da suspensão bacteriana a $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (preparada de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.4.3.1) foi semeada pela técnica de plaqueamento em superfície no ágar com o auxílio de um swab em três direções na forma de estrias. Para verificar o crescimento dos micro-organismos, foram preparadas placas controle estriadas com os micro-organismos e sem adição do composto antibacteriano. As placas foram incubadas a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica (Quimis, Q316m5) por 24 h. Após esse tempo, a atividade antibacteriana foi avaliada pela presença (inibição parcial) ou ausência de formação de colônias (inibição completa, ação bactericida) (CLSI, 2018^b).

4.4.4 Avaliação da ação antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos pela catálise heterogênea proposta neste trabalho, a técnica de diluição em ágar foi utilizada. A atividade antifúngica dos álcoois precursores também foi realizada para fins comparativos.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia, Hematologia e Citologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. A atividade antifúngica dos compostos foi avaliada de acordo com o procedimento descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M27-A4: Método de referência para teste de sensibilidade antifúngica de diluição em caldo de leveduras (CLSI, 2017^a) e documento M38 – A3: Método de referência para teste de sensibilidade a antifúngicos por diluição em caldo de fungos filamentosos (CLSI, 2017^b), com adaptações.

Os reagentes utilizados para as análises antibacterianas foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), acetato de geranila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), acetato de nerila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), *Brain Heart Infusion* – BHI (Merck, P.A.), cloreto de sódio (Merck, P.A.) e ágar *Sabouraud* com cloranfenicol (Kasvi).

Como micro-organismos, cepas padronizadas pela *American Type Culture Collection* – ATCC (Bioscan) foram utilizadas, a saber: *Aspergillus flavus* (ATCC 9643), *Aspergillus niger* (ATCC 6275) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 24433).

4.4.4.1 Preparação do inóculo

As cepas liofilizadas dos fungos, inicialmente na forma de pellets, foram hidratadas em caldo BHI e incubadas em estufa (J Prolab, B3) por 48 h a 35 ± 1 °C. Após 48 h, o BHI apresentou aspecto turvo, indicando crescimento fúngico. Em seguida, foi realizada a homogeneização em agitador de vórtice (Quimis, q220) por 15 s e 10 μL foram transferidos para tubos estéreis contendo ágar *Sabouraud* com cloranfenicol (3 mL), os quais foram novamente incubados em estufa (J Prolab, modelo B3) por 7 dias a 35 ± 1 °C para *Aspergillus* e 24 h a 35 ± 1 °C para *Candida albicans*. Para os ensaios, a concentração do inóculo para cada micro-organismo foi ajustada em solução salina estéril (NaCl, 0,9%) para aproximadamente 10^5 células·mL⁻¹, medida pelo método da câmara de Neubauer (HBG, 9030-01) em microscópio óptico (Olympus, CX21FS1) (CLSI, 2017^a; CLSI, 2017^b).

4.4.4.2 Ensaio de diluição em ágar

Para os ensaios de diluição em ágar, inicialmente foram obtidas as suspensões de cada micro-organismo na concentração de 10^5 células·mL⁻¹, de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.4.4.1.

A diluição dos compostos em ágar foi preparada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura estéril ágar *Sabouraud* com cloranfenicol a uma temperatura de 65 °C e o volume desejado do composto para cada diluição. Para cada composto, em tubos diferentes, foram preparadas diluições correspondentes às concentrações mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações de composto usadas no teste de diluição em ágar para determinação da concentração inibitória mínima de geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila contra cada fungo.

Micro-organismo	Composto	Concentração do composto na placa [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]					
		a	b	c	d	e	f
<i>C. albicans</i>	Geraniol	Controle	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06
	Nerol	Controle	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06
	Acetato de geranila	Controle	125,0	100,0	75,0	62,5	50,0
	Acetato de nerila	Controle	125,0	100,0	75,0	62,5	50,0
<i>A. flavus</i>	Geraniol	Controle	8,00	4,00	2,00	1,00	0,50
	Nerol	Controle	8,00	4,00	2,00	1,00	0,50
	Acetato de geranila	Controle	125,0	100,0	75,0	50,0	25,0
	Acetato de nerila	Controle	400,0	375,0	350,0	325,0	300,0
<i>A. niger</i>	Geraniol	Controle	8,00	4,00	2,00	1,00	0,50
	Nerol	Controle	8,00	4,00	2,00	1,00	0,50
	Acetato de geranila	Controle	250,0	200,0	150,0	100,0	50,0
	Acetato de nerila	Controle	350,0	300,0	250,0	200,0	150,0

Fonte: a autora (2021).

Após agitação, 5 mL do conteúdo de cada tubo foi transferido para diferentes placas de Petri (50 mm × 10 mm) e aguardou-se a solidificação em temperatura ambiente. Uma alíquota (10 μL) da suspensão de cada micro-organismo foi inoculada no ágar solidificado em diferentes placas e espalhada com uma alça de Drigalski em toda a superfície. Para verificar o crescimento de cada micro-organismo, placas controle foram preparadas sem a adição do

composto antifúngico. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C em estufa (J Prolab, B3), 24 h e 48 h para *Candida albicans* e 7 dias a 28 ± 1 °C para *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. Após esse tempo, a atividade antifúngica foi avaliada pela presença ou ausência de formação de colônias. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível de fungos (CLSI, 2017^a; CLSI, 2017^b).

4.4.5 Avaliação da toxicidade

As análises de toxicidade são de fundamental importância para viabilizar a utilização dos acetatos obtidos, principalmente se forem indicados para aplicações com contato com alimentos, fármacos ou outros produtos que sejam ingeridos por seres humanos ou animais. Dessa forma, a toxicidade oral dos compostos acetato de geranila e acetato de nerila foi avaliada em modelos animais. Para fins comparativos, a avaliação da toxicidade oral dos álcoois precursores, geraniol e nerol, também foi realizada.

Para avaliar a toxicidade oral dos compostos geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila, duas etapas foram empregadas. A primeira abrange a toxicidade oral aguda em camundongos, com base na diretriz n.º 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). A segunda envolve a toxicidade oral subaguda em doses repetidas por um período de 28 dias em camundongos, com base na diretriz n.º 407 da OECD.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os reagentes utilizados para as análises de toxicidade foram: geraniol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), nerol (Sigma – Aldrich, pureza $\geq 97\%$), acetato de geranila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), acetato de nerila (após processo de separação descrito na Seção 4.1.1.4), cloreto de sódio (Merck, P.A.), óleo de milho (Lisa), tiopental sódico (Thiopentax®, 0,5 g) e cloridrato de lidocaína (Xylestesin®, 2%).

Para a execução das análises, foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas com idade de 4 semanas (com massa corporal entre 25 g e 35 g), oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ. Os animais foram divididos em grupos de cinco e alocados em gaiolas plásticas (28 cm \times 12,5 cm \times 19 cm) em ciclo diurno-noturno de 12 h com livre acesso à água e alimentos (Biobase®). A sala foi mantida em temperatura constante (22 ± 2 °C) e umidade (40% a 60%). Antes da administração dos compostos por via oral, os animais passaram por um período de 3 h de jejum previamente à administração.

Antes da realização dos procedimentos, o projeto foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ (Protocolo #008-18 e Protocolo #001-19). Após aprovação dos experimentos pelo Comitê de Ética de Cuidado Animal (CEUA – UNOCHAPECÓ), os ensaios foram conduzidos de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2008; CONCEA, 2018) e Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias, de 20 de outubro de 2010 (2010/63 /EU) para experiências com animais (EUROPEAN UNION, 2010).

4.4.5.1 Toxicidade aguda

Este teste foi aplicado para avaliar a toxicidade dos acetatos obtidos e de seus precursores após exposição dos camundongos a uma dose única e foi realizado segundo a instrução normativa n.º 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) de 2001. A dose única escolhida ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi baseada nos resultados de toxicidade oral aguda do estudo realizado pelo NTP (1987).

No teste de toxicidade aguda (OECD, 2001), inicialmente, as substâncias de teste foram administradas na dose única de $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, via oral, em 3 camundongos fêmeas para cada etapa experimental ($n = 3$ animais por composto, totalizando 12 animais). Os compostos foram dissolvidos em óleo de milho devido à sua baixa solubilidade em água. Os volumes de administração respeitaram a proporção de $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal. Os grupos de veículos foram tratados com óleo de milho a $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. Após a administração aguda, os animais foram observados durante as primeiras 4 h e 12 h mais tarde, e todos os dias durante 14 dias. Para avaliar o metabolismo dos animais, o ganho de peso e a ingestão alimentar foram registrados a cada três dias durante o período experimental. Comportamentos macroscópicos anormais de camundongos, como piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, tônus muscular, atividade motora, hipotermia, tremores, paralisia das patas posteriores, salivação, secreção brônquica, letargia, diarreia, convulsões e mortes foram registrados (OECD, 2001).

No 15.º dia após a administração oral dos compostos, os animais foram submetidos isoladamente à eutanásia por anestesia profunda com tiopental sódico ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via parenteral) precedido de cloridrato de lidocaína ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via parenteral) (CONCEA, 2018).

4.4.5.2 Toxicidade subaguda

Este teste avalia a toxicidade após exposição a doses repetidas (tratamento subcrônico) e foi realizado segundo a instrução normativa n.º 407 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), de 2008, para os compostos geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila.

No teste de toxicidade de doses repetidas (OECD, 2008), camundongos fêmeas (n = 20 animais por composto, totalizando 80 animais) e machos (n = 20 animais por composto, totalizando 80 animais) foram tratados por gavagem (via oral) uma vez ao dia durante 28 dias com nerol, geraniol, acetato de geranila ou acetato de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). A dose de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi escolhida de acordo com a quantidade permitida para uso de acetato de geranila e nerila em alimentos aprovada pela *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), levando-se em consideração a quantidade de acetato de geranila para uso em produtos de panificação de 17 ppm (aproximadamente $0,85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por apresentar o maior valor dentre os grupos alimentícios, conforme *GRAS Reference 2509*, aprovado para a substância. Para efeito de cálculo, considerou-se que todo o composto ativo é ingerido. Já as doses de $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foram definidas de acordo com a OCDE (2008) (intervalos de 2 a 4 vezes para definir os níveis de dose).

Os animais foram divididos em quatro grupos contendo cinco animais por sexo: controle - tratado por via oral com veículo (óleo de milho, $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), composto a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (via oral), $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (via oral) e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (via oral). A observação de comportamentos macroscópicos anormais e mortalidade também fizeram parte deste teste. O ganho de peso corporal e a ingestão de alimentos foram registrados a cada três dias durante o tratamento de 28 dias (OECD, 2008). No 29.º dia após o início da experiência, os animais foram submetidos isoladamente à eutanásia por anestesia profunda com tiopental sódico ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via parenteral) precedido de cloridrato de lidocaína ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via parenteral) (CONCEA, 2018).

O sangue (da veia porta hepática) e a urina (da bexiga) foram coletados de camundongos submetidos ao estudo de toxicidade de doses repetidas no intuito de verificar se ocorreram alterações nas funções hematológicas e bioquímicas dos animais submetidos ao tratamento com os compostos. Os órgãos cérebro, coração, timo, baço, suprarrenais, rins e fígado foram coletados após a eutanásia nas duas fases do estudo (toxicidade aguda e subaguda), pesados para análise estatística e reservados para posterior estudo histopatológico, no intuito de verificar se houve lesões nos tecidos dos órgãos dos animais submetidos ao

tratamento com os compostos. O peso relativo dos órgãos foi calculado em relação ao peso corporal dos camundongos.

4.4.5.3 Análises hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Hematologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, UNOCHAPECÓ. A análise dos parâmetros hematológicos foi realizada por Analisador Hematológico ABX Micros 60® e as amostras de sangue foram coletadas em tubos de EDTA (0,5 mL). Os parâmetros avaliados foram hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição dos eritrócitos (RDW), plaquetas, contagem de eritrócitos, reticulócitos, neutrófilos (N), contagem de linfócitos (L), monócitos (M) e eosinófilos (E). Em alguns grupos, o número final de amostras analisadas variou de 3 a 5 por grupo devido à coagulação sanguínea.

4.4.5.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade Feevale, em Novo Hamburgo – RS. Na análise dos parâmetros bioquímicos, foram avaliados os níveis plasmáticos de glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações de colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE). As análises foram realizadas com kits Bioclin®, utilizando um analisador bioquímico automatizado Mindray BS-200E® (Mindray®). Considerando o baixo volume de sangue em camundongos, não foi possível coletar quantidade suficiente de plasma de alguns animais e, portanto, o número final de amostras variou entre 3 e 5.

4.4.5.5 Urinálise

A urinálise foi realizada no Laboratório de Hematologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, UNOCHAPECÓ. Para a urinálise foram avaliados urobilinogênio, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, proteína total, ácido ascórbico, sangue, nitrito,

leucócitos, pH e densidade. Os testes foram realizados pelas fitas de reagentes de determinação rápida Uriquest Plus® (Labtest®).

4.4.5.6 *Análises histopatológicas*

As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório Veterinário Volta Grande, localizado em Chapecó – SC. Após o estudo das doses repetidas, os órgãos (cérebro, coração, timo, baço, suprarrenais, rins e fígado) foram fixados em formalina tamponada neutra a 10%. As amostras foram desidratadas com álcool, clarificadas com xilol, incluídas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina e eosina e então processadas e examinadas por microscopia óptica.

4.4.5.7 *Análises estatísticas*

A análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas de duas vias foi usada para avaliar o peso corporal relativo dos camundongos e a ingestão de alimentos. Os resultados do peso relativo dos órgãos (estudo de doses repetidas), parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados por ANOVA de uma via. O teste *post hoc* de Bonferroni foi usado em todas as análises. O peso relativo dos órgãos no estudo de toxicidade aguda foi analisado pelo teste *t* não pareado. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc, EUA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises e os resultados obtidos para esta tese estão apresentados a seguir. O objetivo da apresentação e discussão destes resultados é comprovar que os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila podem ser sintetizados via catálise heterogênea pela rota proposta com alta conversão, bem como mostrar que os mesmos possuem ação antimicrobiana e baixa toxicidade, validando as premissas da tese.

5.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Os resultados para a síntese dos compostos relacionados com a avaliação do uso do catalisador e com o efeito das variáveis nas reações de esterificação são apresentados e discutidos nesta seção.

5.1.1 Avaliação do uso do catalisador

Os resultados das análises de cromatografia gasosa (CG–FID) com e sem a utilização do catalisador Lewatit® GF 101 para a síntese do acetato de geranila estão apresentados na Figura 8 e para a síntese do acetato de nerila na Figura 9.

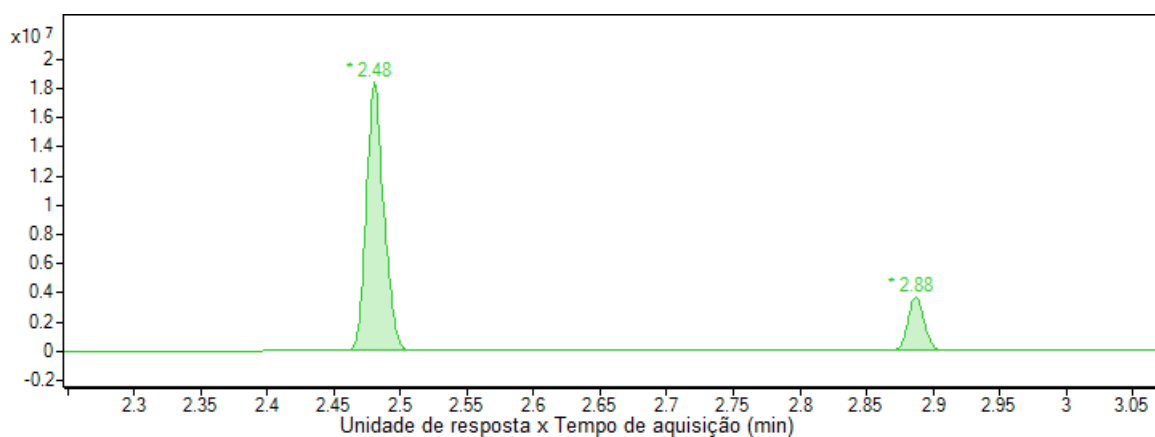
Pelos cromatogramas, é possível verificar que o composto majoritário produzido pela reação de esterificação entre geraniol (2,48 min) e anidrido acético é o éster acetato de geranila, com um sinal forte no tempo de retenção de 2,88 min (Figura 8), enquanto o composto majoritário gerado após o processo de esterificação do nerol (2,41 min) é o éster acetato de nerila, observado no tempo de retenção de 2,82 min (Figura 9), ambos confirmados pelo comparativo de espectros de massas da biblioteca NIST.

Os resultados do cromatograma de GC para geraniol e nerol estão de acordo com os encontrados por Sun et al. (2019), que observaram que o tempo de retenção do geraniol (*trans*) é ligeiramente superior ao do nerol (*cis*) na separação da mistura desses isômeros como consequência da pequena diferença entre os pontos de ebulição. Além disso, os autores também observaram que para outros isômeros *cis* e *trans*, o tempo de retenção dos isômeros *cis* na análise de cromatografia gasosa foi menor do que o dos isômeros *trans*, o que reforça os resultados obtidos neste trabalho para acetato de geranila (*trans*) e acetato de nerila (*cis*).

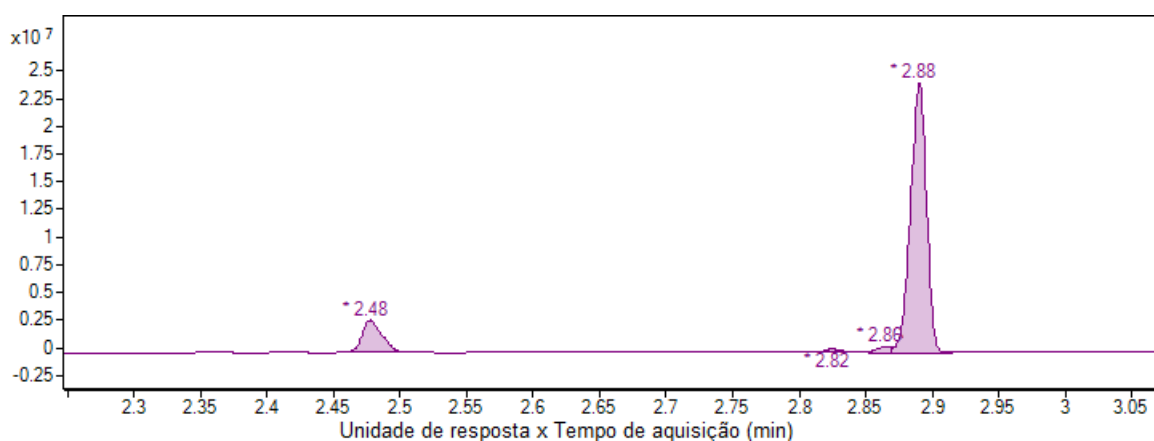
Cabe ressaltar que durante as reações de síntese foi observada a mudança na coloração da solução esperada, de incolor ao amarelo âmbar. Esta coloração é característica da formação

do éster acetato de geranila (AL-BAWAB et al., 2010; BADGUJAR; BHANAGE, 2014; PUBCHEM, 2019), sendo que ocorreu o aumento gradativo da sua intensidade com o passar do tempo de reação, atingindo o máximo no tempo final da reação. Observações similares foram realizadas na síntese do acetato de nerila, exceto que a coloração visual do produto da reação apresentou a tonalidade um pouco mais clara.

Figura 8 – Cromatograma de CG-FID para a síntese do acetato de geranila nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (geraniol:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de geraniol de 3 mmol e tempo de reação de 2 h sem a utilização de catalisador (a) e com a utilização de 3% (m/m) do catalisador Lewatit® GF 101 (b).



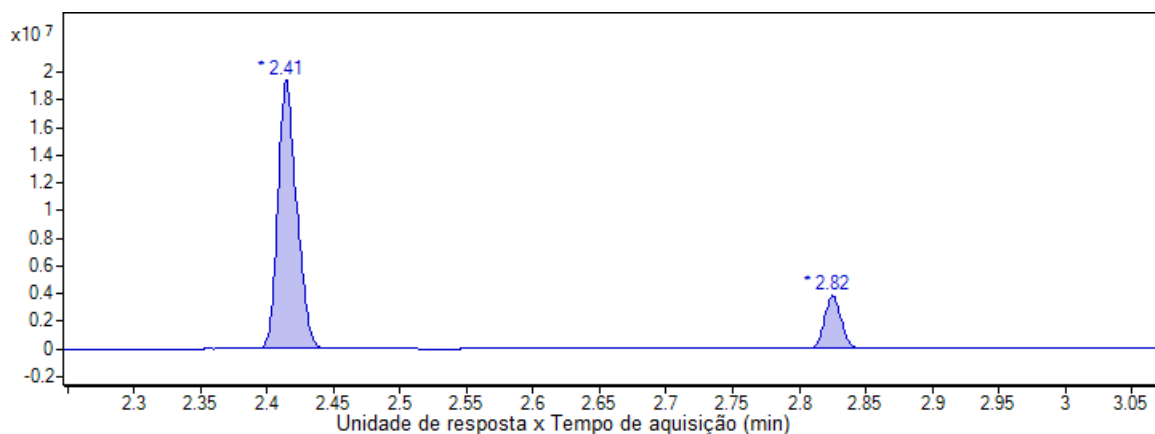
(a)



(b)

Fonte: a autora (2021).

Figura 9 – Cromatograma de CG-FID para a síntese do acetato de nerila nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (nerol:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de nerol de 3 mmol e tempo de reação de 2 h sem a utilização de catalisador (a) e com a utilização de 3% (m/m) do catalisador Lewatit® GF 101 (b).



(a)

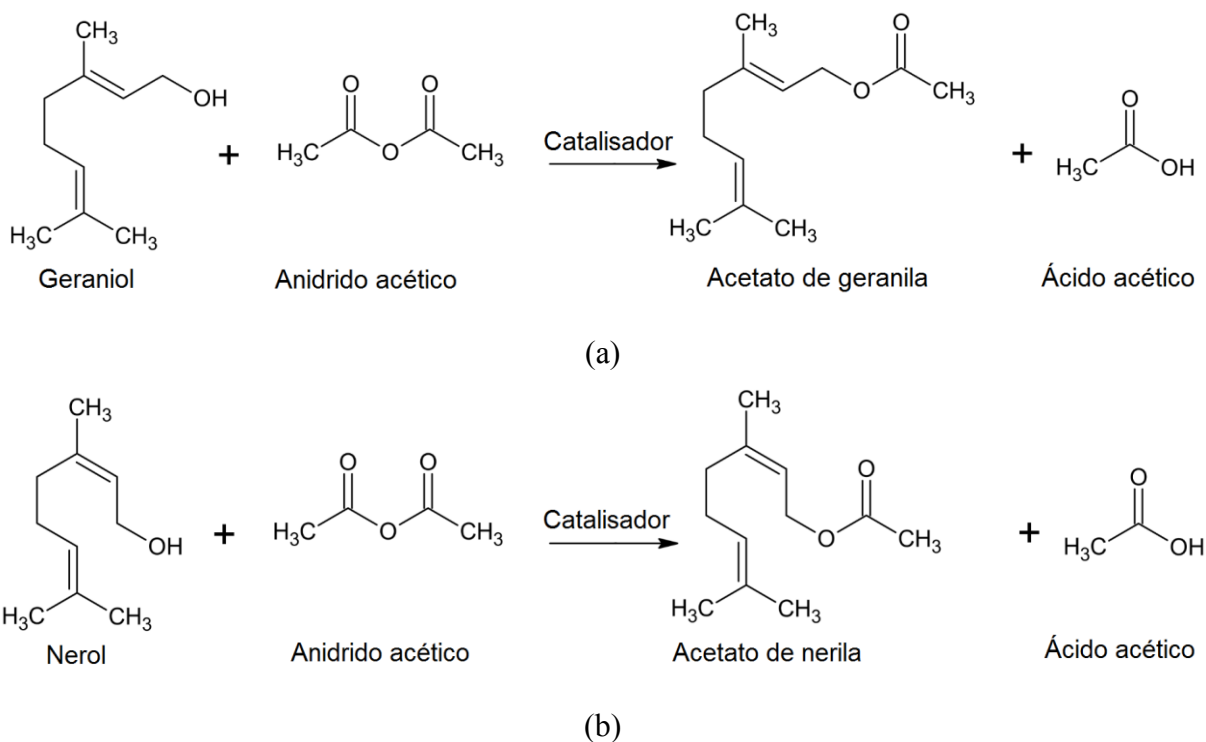


(b)

Fonte: a autora (2021).

Desta forma, é possível afirmar que a reação de esterificação entre o geraniol e o anidrido acético, catalisada pela resina de troca iônica Lewatit® GF 101, forma acetato de geranila e ácido acético, conforme equação estequiométrica apresentada na Figura 10(a), enquanto a reação de esterificação entre o nerol e o anidrido acético, catalisada pela resina de troca iônica Lewatit® GF 101, forma acetato de nerila e ácido acético, conforme equação estequiométrica apresentada na Figura 10(b). Cabe ressaltar que o solvente de análise (metanol) e o ácido acético foram detectados no tempo de retenção de 0,9 min e 1,1 min, respectivamente. Ambos confirmados pelo comparativo de espectros de massas da biblioteca NIST.

Figura 10 – Esquema para a reação de esterificação na síntese de acetato de geranila (a) e acetato de nerila (b).



Fonte: a autora (2021).

Além disso, é possível verificar pela área dos picos que a conversão do geraniol e a formação de acetato de geranila são maiores quando utilizada a resina como catalisador (Figura 8b) do que sem a utilização de catalisador (Figura 8a). O mesmo pode ser observado para a conversão do nerol e a formação do acetato de nerila com catalisador (Figura 9b) e sem catalisador (Figura 9a). Os resultados indicam também a presença de outros compostos em quantidades minoritárias (acetato de α -terpinila e diidrocarveol), que podem ser produtos de reações paralelas envolvendo geraniol e nerol, indicando que as reações com o catalisador não são 100% seletivas para os ésteres acetato de geranila e acetato de nerila no tempo testado. A conversão das reações correspondentes e a seletividade para a formação dos ésteres, em termos da média com o desvio padrão, estão apresentadas na Tabela 4.

Observa-se na Tabela 4 que o catalisador proposto (resina Lewatit® GF 101) aumentou a conversão da reação de esterificação entre geraniol e anidrido acético em aproximadamente 73% quando comparado à conversão sem catalisador para condições experimentais idênticas. A conversão da reação de esterificação entre nerol e anidrido acético usando o catalisador proposto (resina Lewatit® GF 101) foi aproximadamente 83% maior do que sem catalisador. A reação de esterificação sem catalisador foi 100% seletiva para acetato

de geranila e para acetato de nerila no tempo de reação testado, enquanto que com o catalisador proposto demonstrou uma redução de apenas 3% na seletividade para o acetato de geranila e uma redução de 15,6% na seletividade para acetato de nerila.

Tabela 4 – Conversão e seletividade para a reação de síntese de acetato de geranila e acetato de nerila com e sem o uso de catalisador nas condições de temperatura de 30 °C, razão molar de 1:2 (álcool:anidrido acético), velocidade de agitação de 250 rpm, conteúdo de álcool de 3 mmol e tempo de reação de 2 h.

Reagente	Ensaio	Conversão do álcool (%)	Seletividade para o éster (%)
Geraniol	Sem catalisador	15,44 ± 0,36	100,00 ± 0,00
	Com catalisador (3%, m/m)	88,28 ± 1,06	97,12 ± 0,12
Nerol	Sem catalisador	13,51 ± 0,55	100,00 ± 0,00
	Com catalisador (3%, m/m)	96,79 ± 0,87	84,40 ± 0,66

Fonte: a autora (2021).

Tischer et al. (2019) obtiveram um incremento de aproximadamente 90% na reação de conversão de esterificação entre eugenol e anidrido acético para a síntese de acetato de eugenila utilizando a resina Lewatit® GF 101 como catalisador, em condições experimentais ótimas. Assim, os resultados indicam que a resina Lewatit® GF 101 pode ser um potencial catalisador para reações de esterificação, justificando, assim, seu estudo na síntese de acetato de geranila e acetato de nerila.

5.1.2 Efeito das variáveis nas reações de esterificação

O efeito das variáveis (temperatura, teor de catalisador e razão molar) na conversão de geraniol e nerol e no rendimento de acetato de geranila e nerila foram avaliados a partir de planejamento experimental DCCR. Os resultados para a síntese do acetato de geranila estão apresentados na Tabela 5 (matriz do delineamento experimental), na Figura 11 (superfícies de resposta para a conversão de geraniol) e na Figura 12 (superfícies de resposta para o rendimento de acetato de geranila). Os resultados para a síntese do acetato de nerila estão apresentados na Tabela 6 (matriz do delineamento experimental), na Figura 13 (superfícies de

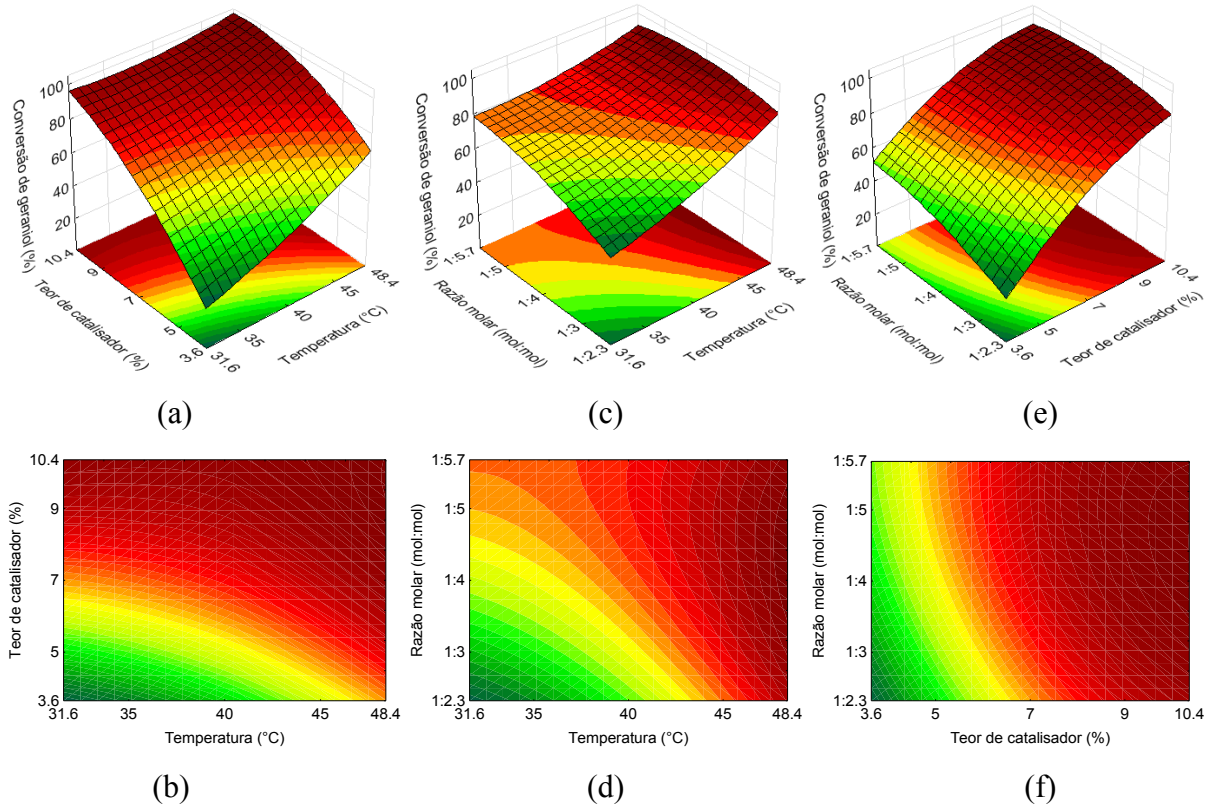
resposta para a conversão de nerol) e na Figura 14 (superfícies de resposta para o rendimento de acetato de nerila).

Tabela 5 – Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de conversão de geraniol e rendimento de acetato de geranila para o tempo de reação de 15 min, agitação controlada de 250 rpm e conteúdo inicial de geraniol de 3 mmol.

Ensaio	Temperatura (°C)	Teor de catalisador (% m/m)	Razão molar geraniol:anidrido acético (mol/mol)	Conversão de geraniol (%)	Rendimento de acetato de geranila (%)
1	-1 (35)	-1 (5)	-1 (1:3)	79,97	77,40
2	+1 (45)	-1 (5)	-1 (1:3)	89,68	87,00
3	-1 (35)	+1 (9)	-1 (1:3)	98,28	90,60
4	+1 (45)	+1 (9)	-1 (1:3)	95,75	90,30
5	-1 (35)	-1 (5)	+1 (1:5)	89,47	87,10
6	+1 (45)	-1 (5)	+1 (1:5)	95,75	90,40
7	-1 (35)	+1 (9)	+1 (1:5)	98,68	92,40
8	+1 (45)	+1 (9)	+1 (1:5)	89,57	86,90
9	-1,68 (31,6)	0 (7)	0 (1:4)	96,05	90,30
10	+1,68 (48,4)	0 (7)	0 (1:4)	97,87	92,00
11	0 (40)	-1,68 (3,6)	0 (1:4)	77,94	76,00
12	0 (40)	+1,68 (10,4)	0 (1:4)	98,99	91,60
13	0 (40)	0 (7)	-1,68 (1:2,3)	96,66	89,90
14	0 (40)	0 (7)	+1,68 (1:5,7)	97,87	92,80
15	0 (40)	0 (7)	0 (1:4)	98,62	94,30
16	0 (40)	0 (7)	0 (1:4)	97,67	92,10
17	0 (40)	0 (7)	0 (1:4)	96,56	91,50

Fonte: a autora (2021).

Figura 11 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para a conversão de geraniol em relação à interação de teor de catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (geraniol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (geraniol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.

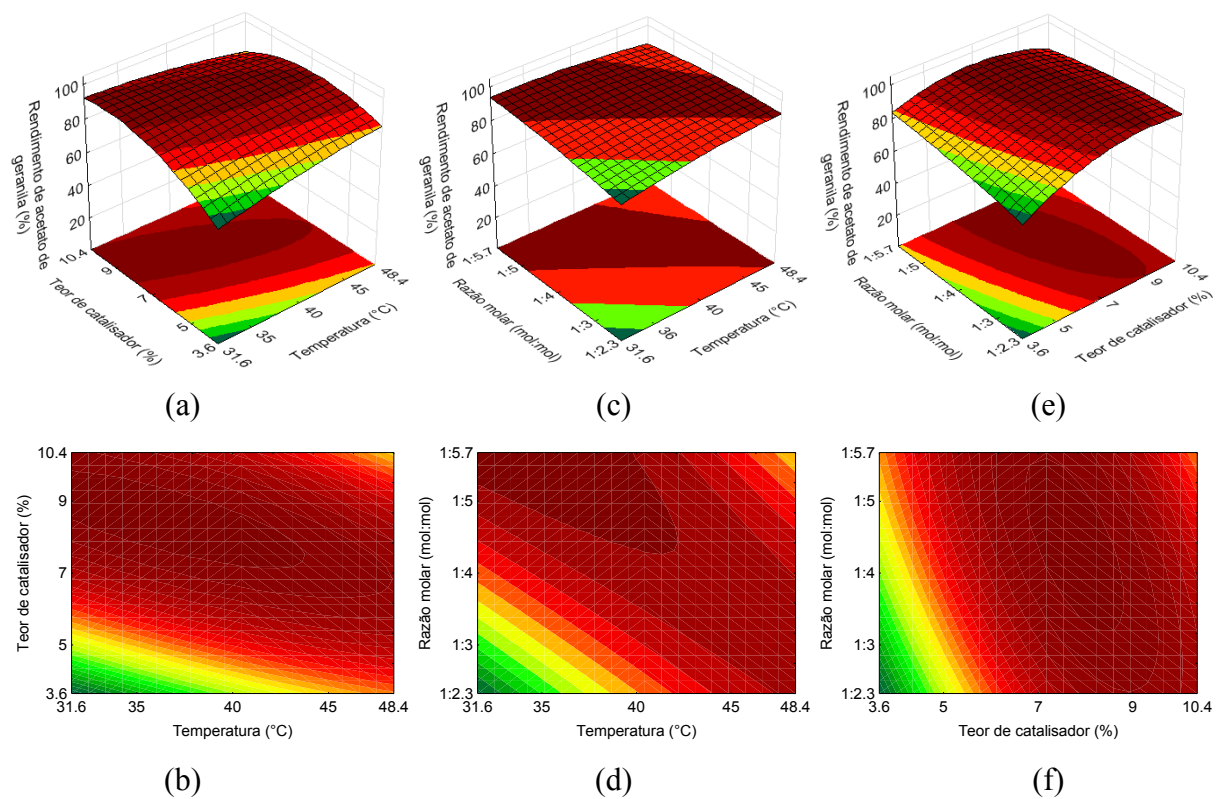


Fonte: a autora (2021).

O aumento do teor de catalisador afetou positivamente a conversão do geraniol para todas as faixas de temperatura (Figura 11a e b) e razão molar (Figura 11e e f) avaliadas. A conversão foi de cerca de 90%, independentemente da temperatura e da razão molar para o teor de catalisador de 9%. Para um teor de catalisador menor que 7%, o aumento da temperatura favoreceu a conversão do geraniol de forma mais pronunciada do que o aumento da razão molar, ambos com efeito positivo. Para temperaturas acima de 45 °C (Figura 11c e d), o aumento da razão molar não influenciou na conversão. Porém, para temperaturas inferiores a 45 °C, o efeito do aumento da razão molar foi favorável. O modelo apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99098, com nível de confiança de 99% dentro da faixa estudada, com influência linear significativa da temperatura, linear e quadrática do teor do catalisador, linear da razão molar e linear da interação entre temperatura e teor do catalisador no consumo de geraniol. As condições ideais para a conversão do geraniol ocorrem em temperatura de 45 °C, teor de catalisador em 9% e razão molar em 1:4. Comparando a

influência da temperatura na conversão da reação obtida pelo modelo na faixa estudada com o comportamento característico padrão esperado pela lei de Arrhenius, nota-se que os resultados obtidos pelo planejamento experimental correspondem apenas a um trecho da curva exponencial com valores próximos ao comportamento linear.

Figura 12 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para o rendimento de acetato de geranila em relação à interação de teor de catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (geraniol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (geraniol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.



Fonte: a autora (2021).

O aumento do teor de catalisador afetou positivamente o rendimento de acetato de geranila para a mesma temperatura (Figura 12a e b) e razão molar (Figura 12e e f) até aproximadamente 7%. Temperaturas e razões molares mais baixas requerem maior teor de catalisador, enquanto temperaturas e razões molares mais altas requerem teor de catalisador próximo ao ponto central. Altas temperaturas (Figura 12c e d) requerem baixas razões molares e baixas temperaturas requerem altas razões molares, porém, com efeito menos significativo. O modelo apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,93592, com nível de confiança de 99%, com influência linear e quadrática significativa do teor de catalisador. O

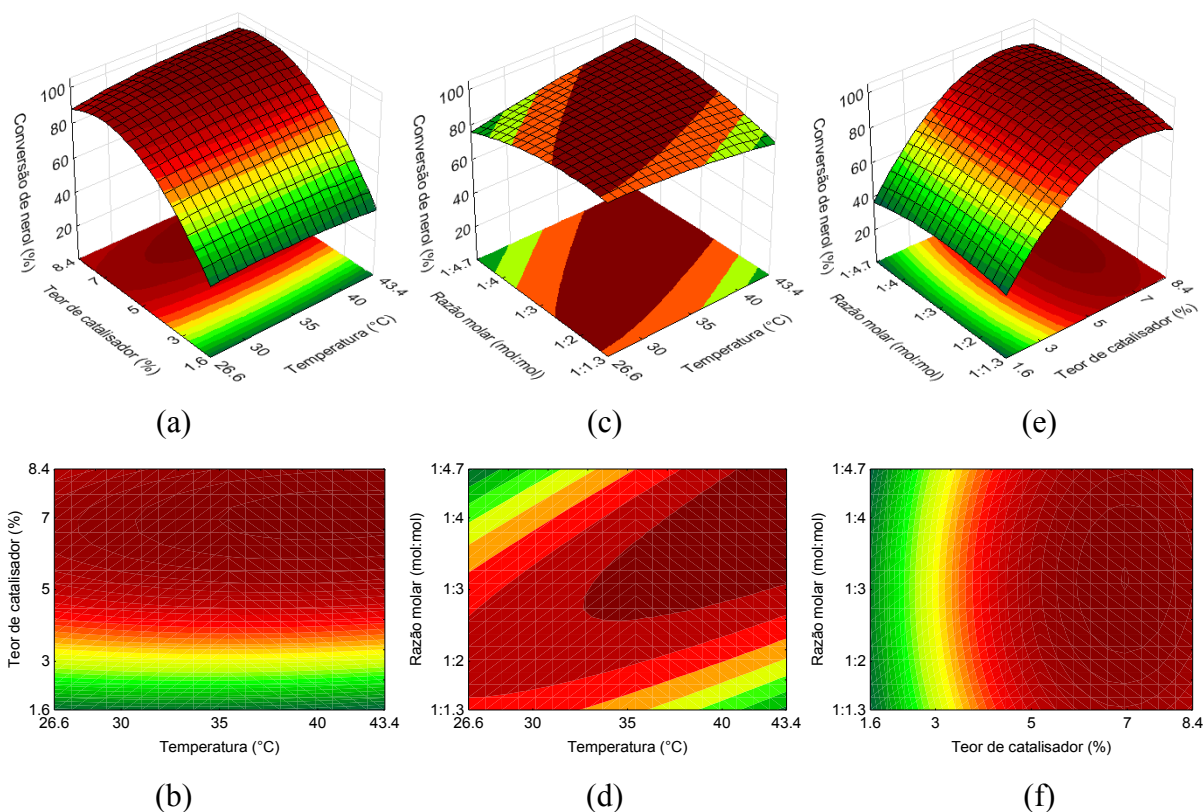
rendimento de acetato de geranila pode ser otimizado em temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7% e razão molar de 1:4. Comparando os resultados entre a conversão de geraniol (Figura 11) e o rendimento de acetato de geranila (Figura 12) para razão molar de 1:4, o aumento no teor do catalisador até 9% implica em aumento de custos para o processo, enquanto o teor de catalisador maior que 9% ou uma temperatura acima de 40 °C reduz a formação de acetato de geranila e favorece a formação de subprodutos, o que aumenta os custos para separação.

Tabela 6 – Matriz de delineamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de conversão de nerol e rendimento de acetato de nerila para o tempo de reação de 15 min, agitação controlada de 250 rpm e conteúdo inicial de nerol de 3 mmol.

Ensaio	Temperatura (°C)	Teor de catalisador (% m/m)	Razão molar nerol:anidrido acético (mol/mol)	Conversão de nerol (%)	Rendimento de acetato de nerila (%)
1	-1 (30)	-1 (3)	-1 (1:2)	70,91	57,83
2	+1 (40)	-1 (3)	-1 (1:2)	60,80	50,96
3	-1 (30)	+1 (7)	-1 (1:2)	93,68	71,33
4	+1 (40)	+1 (7)	-1 (1:2)	94,89	72,54
5	-1 (30)	-1 (3)	+1 (1:4)	61,95	57,30
6	+1 (40)	-1 (3)	+1 (1:4)	68,71	58,97
7	-1 (30)	+1 (7)	+1 (1:4)	93,63	79,91
8	+1 (40)	+1 (7)	+1 (1:4)	96,25	79,16
9	-1,68 (26,6)	0 (5)	0 (1:3)	84,83	72,49
10	+1,68 (43,4)	0 (5)	0 (1:3)	91,22	76,36
11	0 (35)	-1,68 (1,6)	0 (1:3)	39,47	36,74
12	0 (35)	+1,68 (8,4)	0 (1:3)	96,07	74,15
13	0 (35)	0 (5)	-1,68 (1:1,3)	83,75	59,58
14	0 (35)	0 (5)	+1,68 (1:4,7)	85,92	72,92
15	0 (35)	0 (5)	0 (1:3)	89,77	72,13
16	0 (35)	0 (5)	0 (1:3)	93,32	75,22
17	0 (35)	0 (5)	0 (1:3)	88,45	70,34

Fonte: a autora (2021).

Figura 13 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para a conversão de nerol em relação à interação de teor catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (nerol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (nerol:anidrido acético) com teor de catalisador (e) e (f), respectivamente.

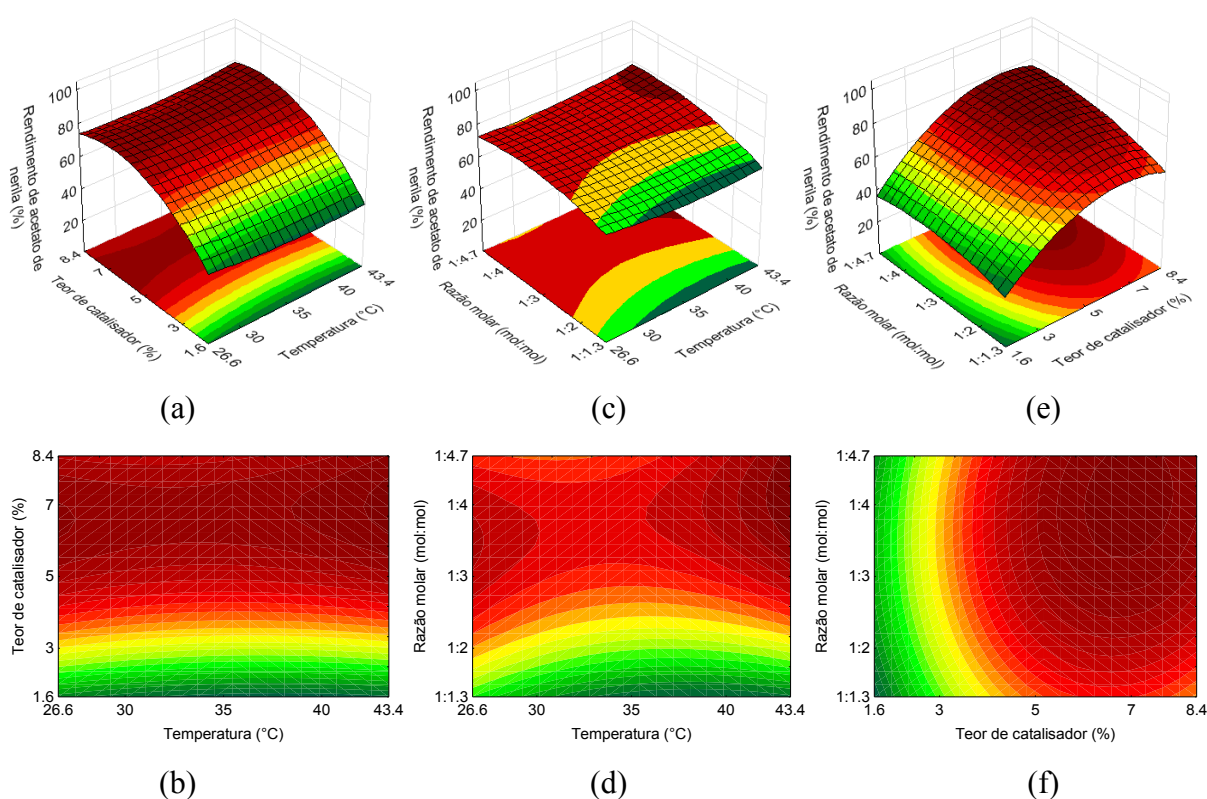


Fonte: a autora (2021).

O aumento do teor de catalisador afetou positivamente a conversão do nerol em todas as faixas de temperatura (Figura 13a e b) e razão molar (Figura 13e e f) avaliadas. Para o teor de catalisador de 7%, um aumento na temperatura e na razão molar favoreceu a conversão do nerol. Em relação à interação entre a temperatura e a razão molar (Figura 13c e d), a conversão do nerol é favorecida em temperaturas acima de 35 °C e razões molares acima de 1:3. A conversão foi próxima da máxima para temperaturas acima de 35 °C e razão molar entre 1:3 e 1:4 para o teor de catalisador de 7%. O modelo apresentou influência linear e quadrática significativa do teor de catalisador no consumo de nerol dentro da faixa estudada e coeficiente de determinação (R^2) de 0,98214 com nível de confiança de 99%. As condições ideais para a conversão do nerol ocorrem em temperaturas acima de 35 °C, teor de catalisador de 7% e razão molar entre 1:3 e 1:4. Assim como para conversão do geraniol, a influência da temperatura na conversão da reação obtida pelo modelo na faixa estudada é consistente com o comportamento característico padrão esperado pela cinética de reações químicas. Além disso,

os resultados obtidos pelo modelo para o efeito do teor de catalisador, tanto na conversão do geraniol quanto na do nerol, confirmam a atividade catalítica, na qual há uma redução da barreira de energia e um aumento da velocidade de reação onde a conversão é favorecida pelo aumento da disponibilidade do catalisador.

Figura 14 – Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas para o rendimento de acetato de nerila em relação à interação de conteúdo do catalisador com temperatura (a) e (b), razão molar (nerol:anidrido acético) com temperatura (c) e (d) e razão molar (nerol:anidrido acético) com conteúdo de catalisador (e) e (f), respectivamente.



Fonte: a autora (2021).

O aumento do teor de catalisador afetou positivamente o rendimento de acetato de nerila para a mesma temperatura (Figura 14a e b) e razão molar (Figura 14e e f) até aproximadamente 7%. Para uma razão molar de 1:4, o aumento da temperatura (acima de 35 °C) favoreceu o rendimento do acetato de nerila (Figura 14c e d). Para o teor de catalisador de 7%, o aumento da temperatura (acima de 40 °C) e da razão molar favoreceu o rendimento do acetato de nerila. Portanto, o rendimento de acetato de nerila pode ser otimizado em temperaturas acima de 40 °C, teor de catalisador de 7% e uma razão molar de 1:4. O modelo apresentou uma influência linear e quadrática significativa do teor de catalisador e uma

influência linear da razão molar dentro da faixa estudada, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,97645 e nível de confiança de 99%. Comparando os resultados para a conversão de nerol (Figura 13) e rendimento de acetato de nerila (Figura 14), nota-se que, para o teor de catalisador de 7%, em temperaturas entre 35 e 40 °C e razão molar entre 1:3 e 1:4, nem todo nerol consumido foi convertido em acetato de nerila, indicando que, assim como o geraniol, o nerol pode estar participando de reações paralelas que levam à formação de subprodutos.

Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos relatados na literatura para síntese de ésteres por esterificação de álcool utilizando catálise heterogênea. Bhavsar e Yadav (2019), Yadav e Rahuman (2003), Tischer et al. (2019), Chen et al. (2016), Murcia et al. (2018), Yadav e Kamble (2018), Kirdi, Akacha e Gargouri (2016), Xiong et al. (2014) e Couto et al. (2011) observaram que o aumento do conteúdo do catalisador teve um efeito positivo na conversão da reação. Além disso, para Bhavsar e Yadav (2019), Yadav e Rahuman (2003) e Murcia et al. (2018), o teor de catalisador foi a variável com maior influência no aumento da conversão da reação. O efeito positivo do aumento da temperatura na conversão do álcool foi observado por Yadav e Rahuman (2003), Tischer et al. (2019), Chen et al. (2016), Murcia et al. (2018), Yadav e Kamble (2018), Xiong et al. (2014), Patel et al. (2016) e Bourkaib et al. (2018), enquanto o efeito positivo do aumento da razão molar foi demonstrado por Bhavsar e Yadav (2019), Yadav e Rahuman (2003), Murcia et al. (2018), Yadav e Kamble (2018), Kirdi, Akacha e Gargouri (2016) e Badgujar e Bhanage (2014).

5.2 ESTUDO CINÉTICO E MECANISMO PROPOSTO

Os resultados para o estudo cinético das reações de esterificação, avaliação da taxa de reação e mecanismo proposto são apresentados e discutidos nesta seção.

5.2.1 Cinética das reações de esterificação

O estudo cinético foi realizado considerando a formação de subprodutos, que foi confirmada através dos resultados experimentais apresentados na Seção 5.1. Genericamente, a reação principal (Equação 1) e a reação paralela (Equação 2) podem ser expressas como:

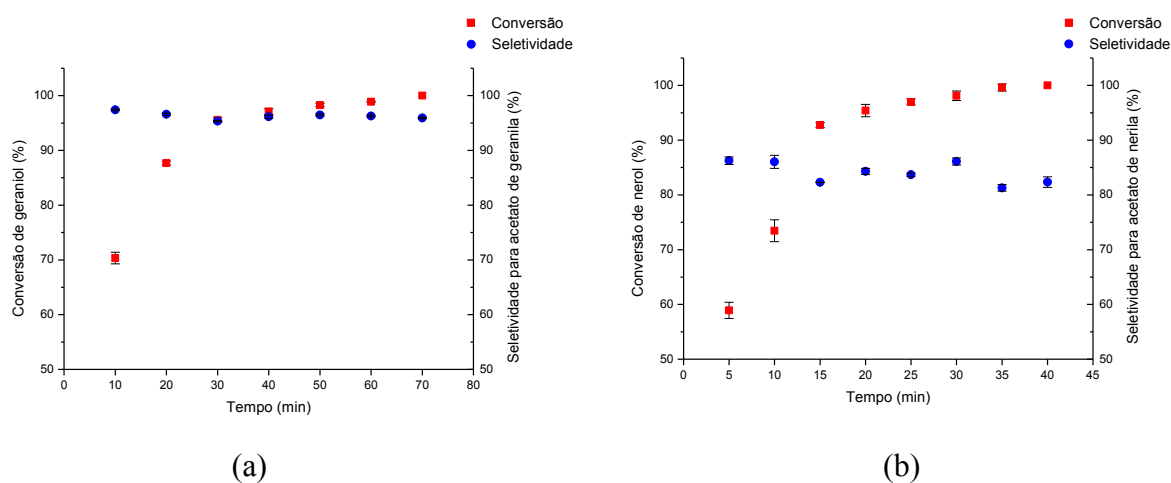




onde o álcool (A) representa geraniol ou nerol, enquanto o éster (C) representa acetato de geranila ou acetato de nerila. Na reação paralela, geraniol e nerol podem ser convertidos em outros álcoois (subprodutos), que também podem reagir com o anidrido acético para formar ésteres derivados.

A conversão de geraniol e nerol, bem como a seletividade para o acetato de geranila e nerila, em função do tempo em condições experimentais ótimas para a esterificação com anidrido acético por catálise heterogênea utilizando a resina Lewatit® GF 101 foi avaliada. Os resultados estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Conversão e seletividade em função do tempo nas condições de reação ótimas obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.



Fonte: a autora (2021).

Os resultados mostram (Figura 15a) que é possível alcançar altas conversões de geraniol com alta seletividade para acetato de geranila. A conversão de geraniol aumentou gradualmente de 70,34% (10 min) para 100% (70 min), enquanto a seletividade do acetato de geranila caiu de 97,41% (10 min) para 95,94% (70 min), aumentando a formação de subprodutos. No tempo de reação de 40 min, a conversão do geraniol foi próxima da máxima (98,28%) e a seletividade para o acetato de geranila foi alta (96,48%), indicando que a reação pode ser interrompida neste momento para maximizar o consumo de geraniol e o rendimento

do acetato de geranila. Além disso, a redução na seletividade aos 70 min de reação foi de apenas 1,5%. Portanto, conduzir a reação ao longo deste tempo também é uma alternativa interessante para minimizar os processos de separação subsequentes para remover o resíduo de geraniol.

Na Figura 15b, é possível observar que a conversão do nerol aumentou gradualmente de 58,91% (5 min) para 100% (40 min), enquanto a seletividade para o acetato de nerila reduziu de 86,26% (5 min) para 82,34% (40 min). No tempo de reação de 30 min, o consumo de nerol e o rendimento de acetato de nerila podem ser maximizados, pois a conversão do nerol foi próxima da máxima (98,11%) e a seletividade para o acetato de nerila foi alta (86,10%). Porém, para minimizar os processos de separação para remoção do resíduo de nerol, uma alternativa interessante é realizar a reação até 40 min, tempo em que a redução da seletividade foi de apenas 3,92% e a conversão do nerol foi máxima.

Cabe ressaltar que os possíveis subprodutos das reações paralelas dos álcoois são o α -terpineol e o diidrocarveol, que podem reagir com anidrido acético para formar seus ésteres derivados. Foi detectada nas análises cromatográficas a presença do éster acetato de α -terpinila e do álcool diidrocarveol em quantidades minoritárias.

Chen et al. (2016) obtiveram valores de conversão e seletividade de 83,2% e 77,4% utilizando a resina Lewatit® K 2620 e de 72,3% e 83,3% utilizando a resina D 72 como catalisadores na síntese de acetato de geranila para a temperatura de 50 °C, tempo de reação de 2 h, concentração de catalisador de 2% (mol), proporção molar de 1:1 (geraniol:anidrido acético) e conteúdo inicial de 0,02 mol de geraniol. Tischer et al. (2019) alcançaram 100% de conversão em 60 min de reação sob condições de temperatura (30 °C), conteúdo de catalisador (1% m/m), razão molar (1:1, eugenol:anidrido acético) e velocidade de agitação (300 rpm) na síntese de acetato de eugenila utilizando a mesma resina deste trabalho como catalisador.

Também é importante comparar os resultados obtidos para a síntese dos compostos com aqueles obtidos por catálise enzimática. Couto et al. (2011) obtiveram conversão de aproximadamente 80% em 4 dias (900 mg da enzima Novozym 435, 35 °C, 100 bar e vazão de 0,25 mL·min⁻¹). Badgujar e Bhanage (2014) alcançaram uma conversão de 99% em 3 h de reação (55 °C, 50 mg da enzima lipase de *Pseudomonas cepacia*, proporção molar de 1:4 de geraniol para acetato de vinila). Xiong et al. (2014) obtiveram, aproximadamente, 100% de conversão em 4 h de reação (30 °C, 240 rpm, 12 mg·mL⁻¹ da enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens*, 300 mM de concentração de geraniol e 3 mL de acetato de vinila). Patel et al.

(2016) alcançaram a conversão de 94% em 6 h de reação (0,1:0,4 M de geraniol para acetato de vinila, 40 °C, 50 mg·mL⁻¹ da enzima lipase de *Candida rugosa* e 150 rpm de agitação). Kirdi, Akacha e Gargouri (2016) obtiveram 82% de rendimento em 6 h de reação em condições quase anidras (55 °C, 6% em peso da enzima lipase de *Rhizomucor miehei*, razão molar de 1:5 de geraniol para acetato de etila). Bourkaib et al. (2018) alcançaram uma conversão de 73,8 ± 0,9% com aproximadamente 20 min de reação (65 °C, 150 bar e uma mistura equimolar de reagentes) com leito fixo da enzima Lipozyme® 435. Yadav e Kamble (2018) obtiveram conversão próxima a 96% em 1 h de reação em condições ideais (55 °C, 300 rpm, 0,06% m/m da enzima Novozyme® 435 e proporção molar de 1:4 de geraniol para acetato de vinila). Murcia et al. (2018) alcançaram, em 2 h de reação, 98,4% de conversão de acetato de geranila nas melhores condições experimentais (30 °C, 300 rpm, 50 mg da enzima Novozyme® 435, razão molar de 1:1,5 de geraniol para acetato de vinila e 50 mM de concentração de geraniol). Bhavsar e Yadav (2019) obtiveram 83% de conversão de geraniol com 100% de seletividade para o acetato de geranila em 2 h de reação (razão molar de 1:7 de geraniol para acetato de etila, 12,7 g·L⁻¹ da enzima Novozyme® 435 e 60 °C). Lozano, Bernal e Navarro (2012) obtiveram 56% de rendimento de acetato de nerila para a esterificação do nerol por catálise heterogênea com temperatura a 50 °C, tempo de reação de 2 h, conteúdo de catalisador em 20 mg (enzima Novozyme® 435), 2 mmol de ácido acético, 3 mmol de nerol e 50 % (em base mássica) de líquido iônico. Jiang e Cheng (2020) mostraram conversão de nerol de 91,6% com 100% de seletividade para acetato de nerila sob condições de razão molar de 1:12,6 (nerol:acetato de etila), conteúdo de catalisador de 2,6% em peso (Novozyme® 435) e temperatura de 52,7 °C por 2 h de tempo de reação.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os outros trabalhos relatados, é possível observar que a rota proposta para a síntese do acetato de geranila e do acetato de nerila é uma alternativa interessante com potencial para aplicações industriais, apresentando alta conversão e seletividade, baixo tempo de reação e possibilidade de economia de energia e reagentes.

5.2.2 Taxa de reação

Considerando a reação de esterificação entre geraniol ou nerol e anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 realizada em um reator de tanque agitado descontínuo (batelada), assumindo as hipóteses de reação irreversível, mistura completa e condições

isotérmicas, a taxa de formação de acetato de geranila ou nerila (Equação 3) e subprodutos (Equação 4) e a taxa de consumo de geraniol ou nerol (Equação 5) podem ser escritas como:

$$dC_C/dt = r_C = k_1 C_A^\alpha C_B^\beta \quad (3)$$

$$dC_E/dt = r_E = k_2 C_A^\gamma \quad (4)$$

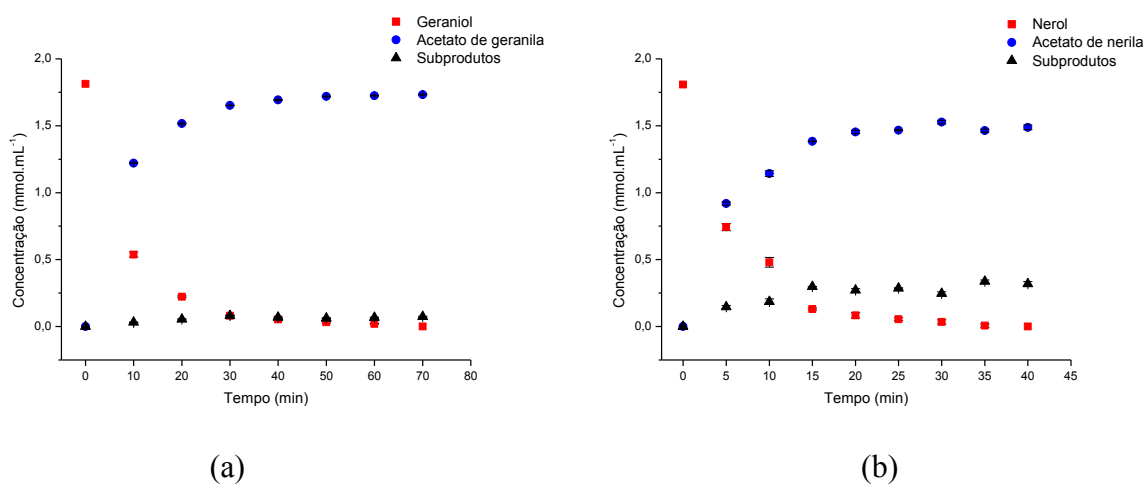
$$-dC_A/dt = r_A = k_1 C_A^\alpha C_B^\beta + k_2 C_A^\gamma \quad (5)$$

As condições iniciais podem ser escritas como:

$$t = 0; C_A = C_{A0}; C_B = C_{B0}; C_C = C_{C0} = 0; C_E = C_{E0} = 0. \quad (6)$$

O monitoramento das reações realizado nas condições ótimas obtidas pelo planejamento experimental possibilitou a determinação da concentração dos componentes ao longo do tempo, cujos resultados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Concentração em função do tempo em condições ótimas de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.

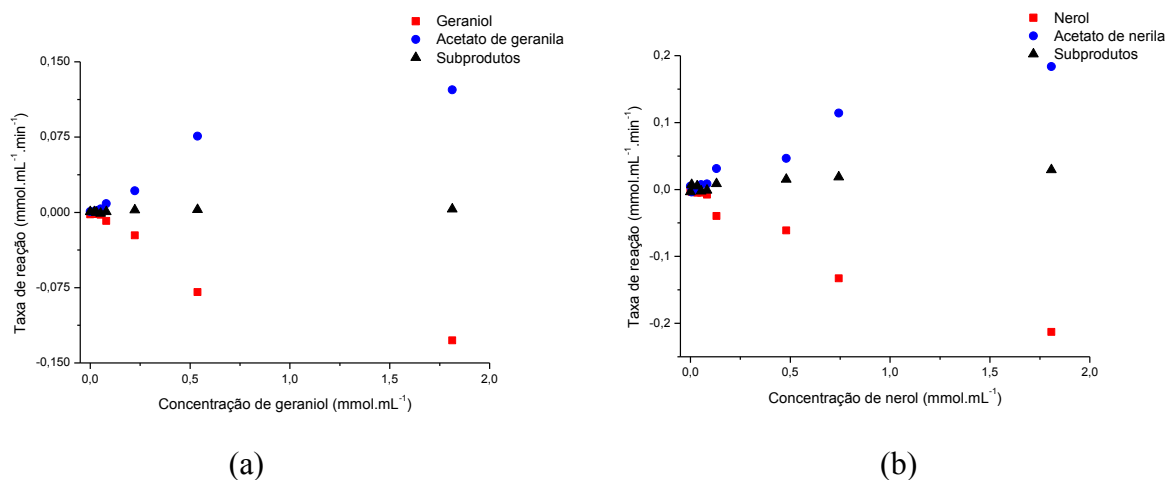


Fonte: a autora (2021).

Os resultados (Figura 16) mostram um comportamento típico para perfis de concentração de reações paralelas com redução gradual da concentração de geraniol e nerol, enquanto a concentração de acetato de geranila, acetato de nerila e subprodutos aumentam gradativamente até atingir o estado estacionário.

As constantes cinéticas (k_1 e k_2) e as constantes de ordem para as reações principais (α e β) e para as reações paralelas (γ) foram estimadas por regressão não linear usando o software OriginPro® (OriginLab, EUA) e as informações dos dados experimentais para os perfis de concentração (Figura 16) e o modelo proposto para a taxa de reação (Equações 3 - 6). Os resultados para a taxa de reação em função da concentração de geraniol e nerol estão apresentados na Figura 17 e os resultados dos parâmetros cinéticos e estatísticos na Tabela 7.

Figura 17 – Taxa de reação em função da concentração de álcool em condições ótimas de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.



Fonte: a autora (2021).

A taxa de reação para a formação do acetato de geranila (Figura 17a) e do acetato de nerila (Figura 17b) apresentou o comportamento esperado. Para altas concentrações de geraniol e nerol, que representam a fase inicial da reação, a taxa foi elevada, diminuindo e se aproximando do estado estacionário conforme a reação progrediu e a concentração de geraniol e nerol foi reduzida.

Tabela 7 – Parâmetros cinéticos e estatísticos nas condições ideais de reação obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol).

Síntese	Parâmetros cinéticos		Parâmetros estatísticos	
Acetato de geranila	k_1 (mmol ^{0,308} ·mL ^{-0,308} ·min ⁻¹)	84,530×10 ⁻³	R^2	0,95184
	α	0,692	R^2 adj.	0,93257
	β	0,000	$RMSD$	1,38049×10 ⁻⁴
	k_2 (mmol ^{0,515} ·mL ^{-0,515} ·min ⁻¹)	2,720×10 ⁻³	SSE	6,90245×10 ⁻⁴
	γ	0,485		
Acetato de nerila	k_1 (mmol ^{0,189} ·mL ^{-0,189} ·min ⁻¹)	125,06×10 ⁻³	R^2	0,95857
	α	0,811	R^2 adj.	0,94476
	β	0,000	$RMSD$	2,28046×10 ⁻⁴
	k_2 (mmol ^{0,382} ·mL ^{-0,382} ·min ⁻¹)	20,92×10 ⁻³	SSE	0,00137
	γ	0,618		

Fonte: a autora (2021).

Os resultados para os parâmetros cinéticos (Tabela 7) mostram que a concentração de anidrido acético não influenciou na taxa de reação ($\beta = 0$), possivelmente devido ao seu excesso quando comparado ao geraniol ($C_{A0} = 1,8128$ mmol·mL⁻¹ e $C_{B0} = 7,2514$ mmol·mL⁻¹) e ao nerol ($C_{A0} = 1,8077$ mmol·mL⁻¹ e $C_{B0} = 7,2307$ mmol·mL⁻¹), um comportamento esperado para a taxa de uma reação irreversível com excesso de reagente. A constante cinética da reação principal na síntese de acetato de geranila foi aproximadamente 31 vezes maior do que a constante cinética da reação secundária, enquanto na síntese do acetato de nerila foi 6 vezes maior, demonstrando como a formação de acetato de geranila e acetato de nerila é favorecida em relação aos subprodutos em condições ideais. Essas diferenças podem estar relacionadas à estabilidade, reatividade e seletividade dos isômeros geraniol (*trans*, *E*-) e nerol (*cis*, *Z*-) devido às alterações na conformação da molécula e acessibilidade aos grupos funcionais (XU et al., 2014).

Chen et al. (2016) obtiveram resultados para as constantes cinéticas na síntese de acetato de geranila com valores em ordem de grandeza semelhantes aos encontrados neste trabalho, com a constante cinética da reação principal ($k_1 = 197,9 \times 10^{-3}$ kL·mol⁻¹·min⁻¹) aproximadamente 32 vezes maior que a da reação secundária ($k_2 = 6,1 \times 10^{-3}$ min⁻¹) para um modelo pseudo-homogêneo com a cinética de pseudo-primeira ordem. Os autores obtiveram

os valores citados em condições experimentais de temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 2% (em base molar), razão molar de geraniol para anidrido acético de 1:1 e tempo de reação de 2 h com um catalisador heterogêneo à base de 1,10 fenantrolina funcionalizada com ácido metilsulfônico.

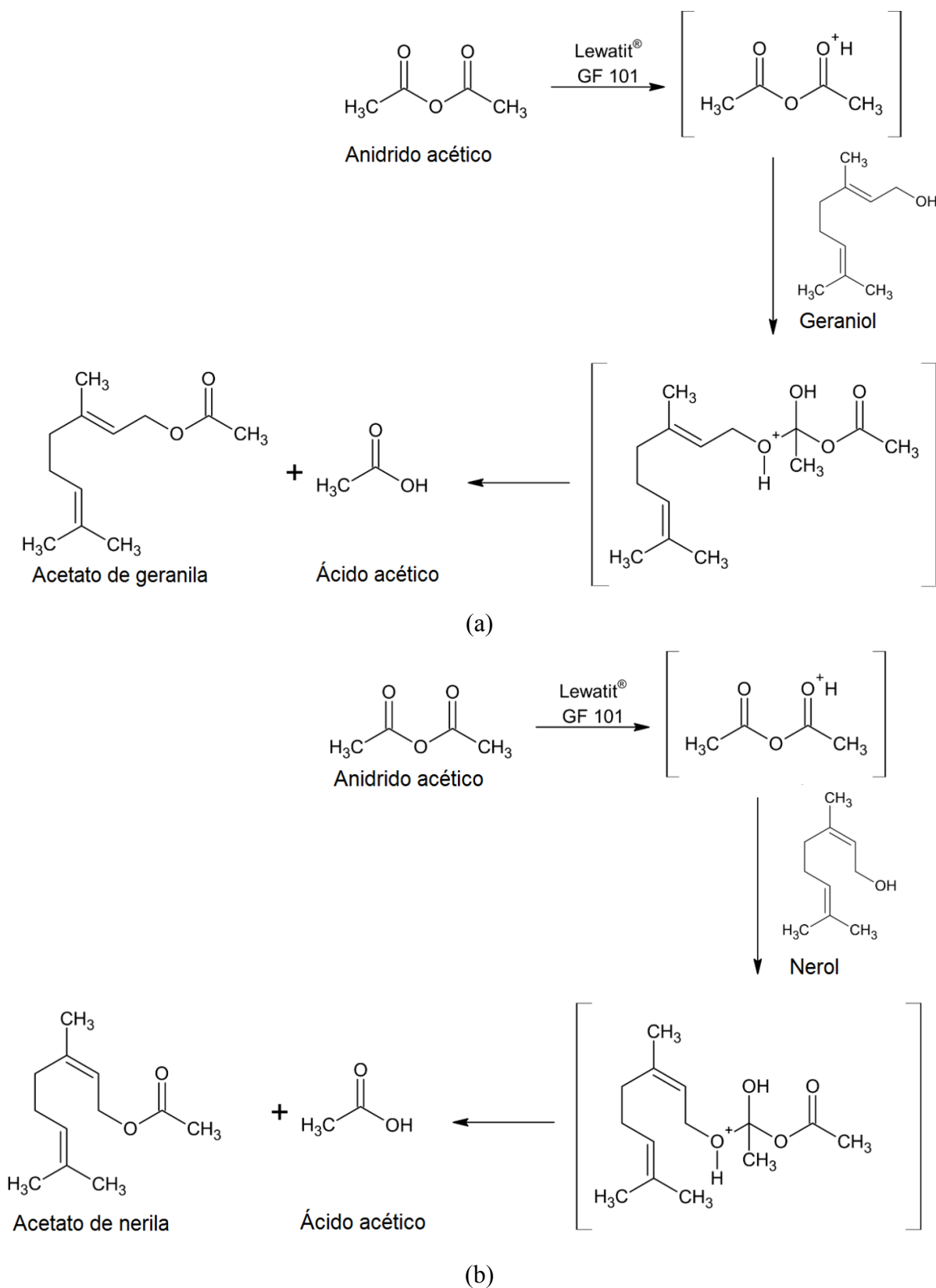
Os valores dos parâmetros estatísticos para a soma dos erros quadráticos (*SSE*) e da raiz do desvio quadrático das médias (*RMSD*) entre os valores reais e os propostos pelo modelo foram muito baixos. Os valores de R^2 e o R^2 *adj.* foram altos e próximos entre si, indicando que o modelo cinético proposto representou adequadamente os resultados experimentais (BADGUJAR; BHANAGE, 2014) para a síntese de acetato de geranila e nerila a partir de geraniol ou nerol e anidrido acético catalisado pela resina Lewatit® GF 101 em condições ótimas de reação.

5.2.3 Mecanismo proposto

A reação entre o geraniol ou nerol e o anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 ocorre predominantemente na fase líquida devido ao baixo teor de catalisador em relação à massa total da mistura reacional, na qual o anidrido acético atua como reagente e solvente. A resina Lewatit® GF 101 possui a presença de grupos ácido sulfônico em sua estrutura, os quais são responsáveis pela catálise de reações de esterificação entre álcoois com ácidos carboxílicos ou anidridos. Assim, pode-se sugerir o mecanismo de reação para a síntese do acetato de geranila e nerila a partir do geraniol ou nerol e do anidrido acético através da catálise heterogênea utilizando a resina Lewatit® GF 101 (Figura 18).

Vários estudos na literatura relatam que as reações de esterificação do álcool catalisadas por resinas de troca iônica ácidas seguem um modelo cinético pseudo-homogêneo ou pseudo-heterogêneo (CHEN et al., 2016; JAGADEESHBABU et al., 2011; KOLAH et al., 2008; GANGADWALA et al., 2003; XU; CHUANG, 1996). O modelo pseudo-homogêneo é aplicável para reações em fase líquida catalisadas por resinas de troca iônica fortemente ácidas nos casos em que um dos reagentes ou o solvente é altamente polar (CHAKRABARTI; SHARMA, 1993). Tais características representam a reação estudada e, portanto, o modelo pseudo-homogêneo foi escolhido para representar o estudo cinético e o mecanismo proposto neste trabalho.

Figura 18 – Esquema sugerido para o mecanismo da síntese de (a) acetato de geranila a partir da esterificação do geraniol e (b) acetato de nerila a partir da reação de esterificação do nerol com anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101.

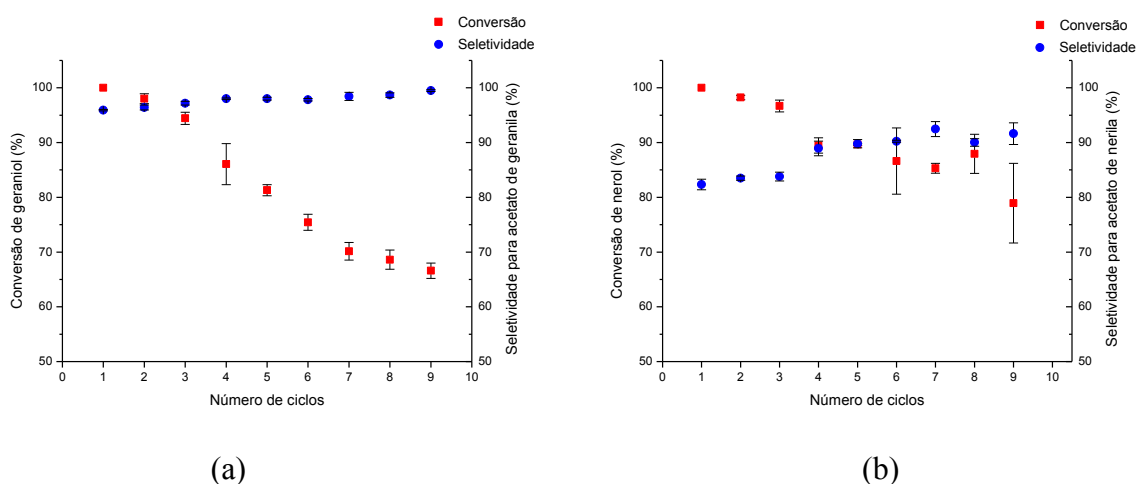


O ácido sulfônico é considerado um ácido de Brønsted e, quando usado como catalisador, segue o mecanismo de catálise ácida (OTERA; NISHIKIDO, 2009). No mecanismo das reações de esterificação catalisadas por ácidos homogêneos, uma carbonila protonada - de um ácido carboxílico ou de um anidrido - é atacada por uma molécula de álcool nucleofílico (MIAO; SHANKS, 2011; OTERA; NISHIKIDO, 2009; RÖNNBACK et al., 1997). Quando catalisadores sólidos funcionalizados com ácidos de Brønsted são usados, um comportamento semelhante ao mecanismo de esterificação da catálise homogênea pode ser esperado (MIAO; SHANKS, 2011; KOSTER et al., 2001). Nesse caso, a presença de componentes polares causa a solvatação do grupo $-SO_3H$ ligado ao polímero e o próton solvatado realiza a catálise, assim como o mecanismo com eletrólitos dissolvidos (CHAKRABARTI; SHARMA, 1993).

5.3 AVALIAÇÃO DOS CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR

Os ciclos de reutilização do catalisador foram avaliados em termos da conversão de geraniol ou nerol e da seletividade para o acetato de geranila ou nerila em condições experimentais ótimas obtidas a partir do delineamento experimental. Os resultados são apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Conversão e seletividade da reação nos ciclos de reutilização da resina Lewatit® GF 101 como catalisador em condições ótimas obtidas a partir do delineamento experimental (temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7%, razão molar de 1:4, velocidade de agitação de 250 rpm e conteúdo inicial de álcool de 3 mmol) para a síntese de (a) acetato de geranila em 70 min de reação e (b) acetato de nerila em 40 min de reação.



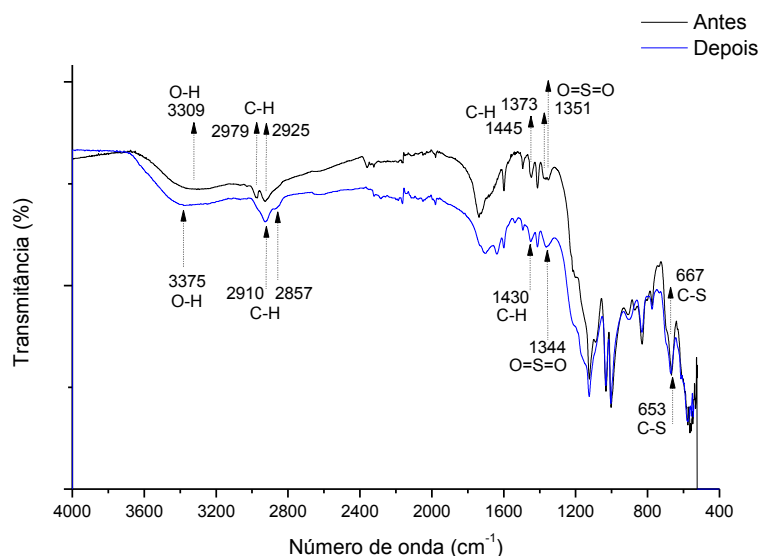
Fonte: a autora (2021).

Os resultados apresentados (Figura 19a) mostram uma redução na conversão do geraniol e um aumento na seletividade do acetato de geranila para 9 ciclos de uso. Após 3 ciclos, a conversão do geraniol reduziu de 100% para 94,43% e a seletividade aumentou de 95,94% para 97,19%, um resultado atraente para aplicação industrial. A redução da conversão foi mais significativa do ciclo 4 para o 9 (de 86,07% para 66,59%), enquanto a seletividade continuou a aumentar (de 98,02 para 99,49%). Já para a síntese de acetato de nerila (Figura 19b), observa-se que, após 9 ciclos de uso, houve uma redução na conversão do nerol e um aumento na seletividade do acetato de nerila. Do primeiro para o terceiro ciclo, a conversão diminuiu de 100% para 96,68% e a seletividade aumentou de 82,34% para 83,78%. Do terceiro para o quarto ciclo, a variação foi mais significativa, com redução de 96,68% para 89,46% na conversão e aumento de 83,78% para 88,93% na seletividade. Do quarto para o nono ciclo, a conversão apresentou tendência de redução (de 89,46% para 78,93%), enquanto a seletividade apresentou tendência de aumento (de 88,93% para 91,63%), porém com maiores variações.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos mostram que, para altas conversões de geraniol e nerol, a reação de formação de subprodutos é favorecida, indicando que parte do geraniol e do nerol consumido não está formando acetato de geranila e acetato de nerila e, portanto, a seletividade diminui. Porém, quando a conversão de geraniol e nerol diminui, a reação principal é favorecida e, conseqüentemente, maior seletividade para o acetato de geranila e acetato de nerila é observada. A redução no consumo de geraniol e nerol pode estar associada à diminuição da atividade catalítica da resina com o aumento dos ciclos de reutilização.

Para verificar a ocorrência de possíveis alterações estruturais que podem ter influenciado na redução da atividade catalítica, uma análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do catalisador antes e depois dos ciclos de reutilização na síntese do acetato de geranila foi realizada. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Espectro de FTIR obtido para a resina Lewatit® GF 101 usada como catalisador na reação de esterificação para síntese do acetato de geranila a partir de geraniol e anidrido acético.



Fonte: a autora (2021).

O espectro FTIR do catalisador antes do uso (Figura 20) mostra picos característicos de ligações O = S = O em 1351 cm^{-1} , alongamento de vibrações de ligações C – S em 667 cm^{-1} e de ligações OH em 3309 cm^{-1} , indicando a funcionalização da resina com ácido sulfônico, conforme indicação do fabricante (LANXESS, 2014). As características poliméricas básicas da resina podem ser observadas por picos de vibrações de alongamento das ligações C – H em 2979 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} e vibrações de flexão das ligações C – H nos grupos CH₃ em 1445 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} . O espectro FTIR do catalisador após o uso (Figura 20) mostra picos característicos de ligações O = S = O em 1344 cm^{-1} , alongamento de vibrações de ligações C – S em 653 cm^{-1} e de ligações OH em 3375 cm^{-1} . As características poliméricas básicas da resina podem ser observadas por picos de vibrações de alongamento das ligações C – H a 2910 cm^{-1} e 2857 cm^{-1} e vibrações de flexão das ligações C – H nos grupos CH₃ a 1430 cm^{-1} . Além disso, mudanças nos sinais podem ser observadas na faixa de 1740 cm^{-1} a 1490 cm^{-1} .

Os resultados estão de acordo com Silverstein et al. (2005) para faixas de detecção de picos em espectros FTIR para vibrações de alongamento atribuídas a ligações C – S (700 cm^{-1} a 600 cm^{-1}), para ligações O = S = O assimétricas (1350 cm^{-1} a 1342 cm^{-1}) e simétricas (1165 cm^{-1} a 1150 cm^{-1}) de ácido sulfônico, para ligações OH com sinal forte e amplo (3400 cm^{-1} a 3200 cm^{-1}), para alongamento de vibrações atribuídas a ligações C – H de hidrocarbonetos (3000 cm^{-1} a 2840 cm^{-1}) e para vibrações de flexão C – H em grupos CH₃ assimétricas

(aproximadamente 1450 cm^{-1}) e simétricas (aproximadamente 1375 cm^{-1}).

Comparando o espectro de FTIR do catalisador antes e após o uso, observa-se que houve mudanças nas bandas de absorção, indicando possíveis mudanças estruturais na resina que podem estar associadas à redução de desempenho. No entanto, as ligações correspondentes ao grupo sulfônico responsável pela catálise ainda estão presentes, indicando que após 9 ciclos de reutilização o catalisador ainda apresenta atividade catalítica.

Tischer et al. (2019) constataram que, após 10 ciclos de reutilização, a resina Lewatit® GF 101 manteve a produção de acetato de eugenila acima de 95% em 60 min de reação sob condições experimentais (não otimizadas) de temperatura ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$), conteúdo de catalisador (1%, m/m), razão molar (1:1) e velocidade de agitação (300 rpm). Em relação à síntese de acetato de geranila, trabalhos abordando a catálise enzimática são reportados na literatura. Badgujar e Bhanage (2014) observaram uma redução na conversão de aproximadamente 17% (de 87% para 70%) após 5 ciclos de uso da enzima. Xiong et al. (2014) mostraram que a atividade da lipase foi mantida com 9 ciclos de uso. Patel et al. (2016) constataram que após 2 ciclos de uso, a lipase manteve aproximadamente 70% de sua atividade inicial. Kiridi, Akacha e Gargouri (2016) observaram 4 ciclos de uso sem diminuir o rendimento da reação. Bourkaib et al. (2018) constataram que a enzima manteve a conversão da reação com pequenas variações após 6 ciclos de uso. Yadav e Kamble (2018) observaram que com 5 ciclos de uso a redução na conversão sob condições ótimas foi de 7%. Bhavsar e Yadav (2019) mostraram que após 3 ciclos de uso a conversão da reação reduziu de 83% para 64,8%. Observa-se que as enzimas apresentam tendência de manutenção ou de baixa perda da atividade catalítica por um número de ciclos de uso maior do que a resina. Esta diferença de ciclos entre enzima e resina pode estar associada com os íons H^+ da resina, o que não ocorre com as enzimas visto que seria necessária a inativação ou envenenamento da tríade catalítica.

A partir da comparação dos resultados obtidos com os trabalhos reportados na literatura citados acima, observa-se que a resina Lewatit® GF utilizada como catalisador para as reações de síntese do acetato de geranila e acetato de nerila a partir da esterificação de geraniol/nerol com anidrido acético demonstra bom desempenho e capacidade de reutilização, resultados que são interessantes para aplicações industriais.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os resultados para a caracterização química, térmica, avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade oral dos compostos são apresentados e discutidos nesta seção.

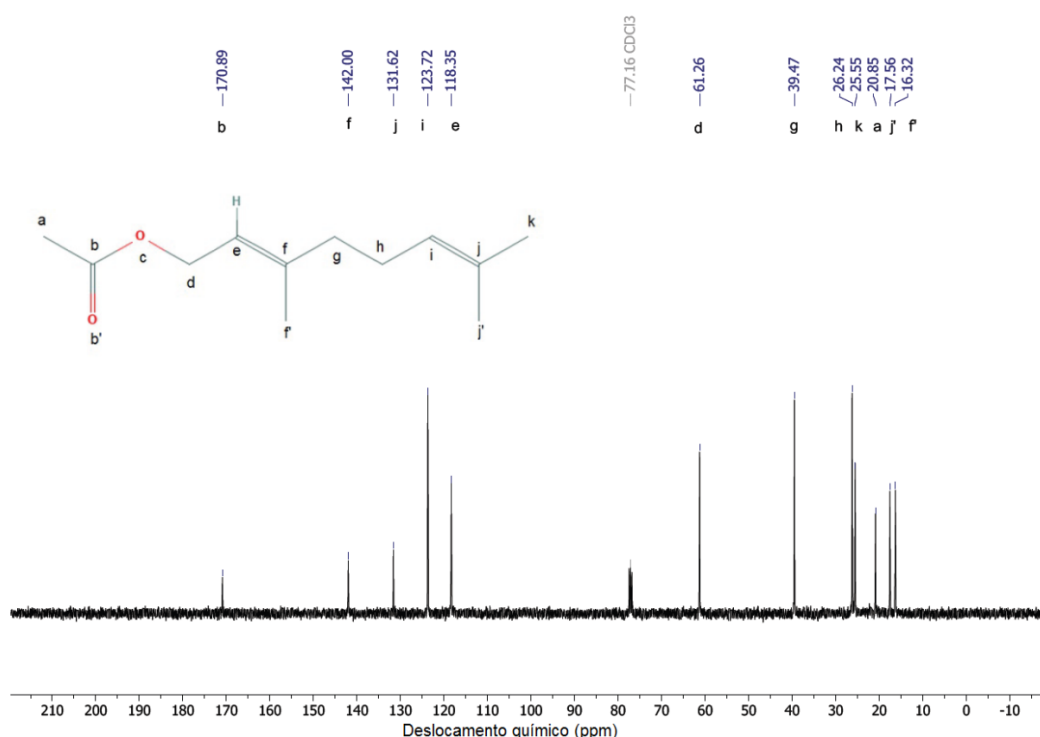
5.4.1 Caracterização química

Esta seção engloba os resultados para a ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e cromatografia gasosa dos compostos.

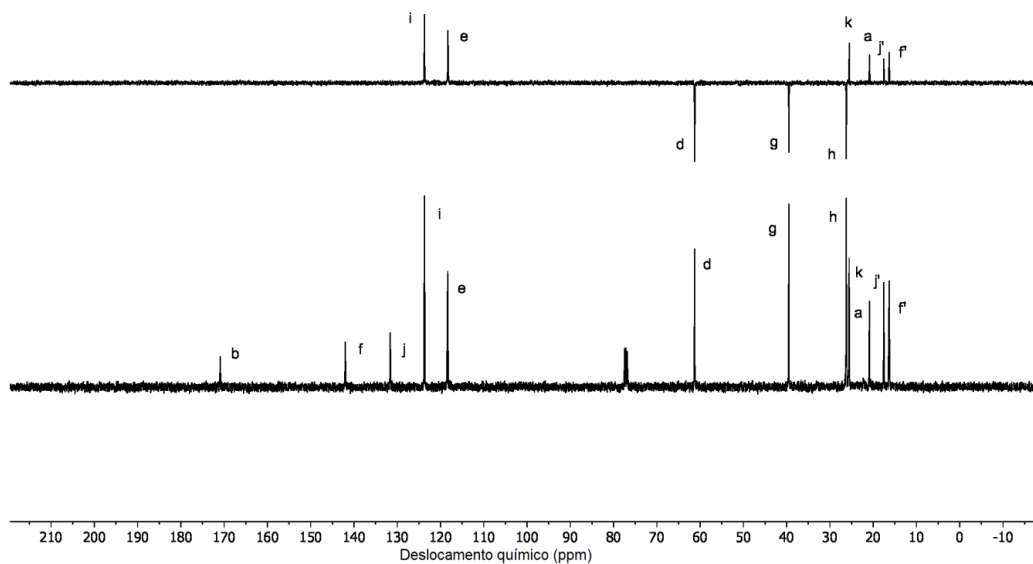
5.4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C e RMN ^1H foi realizada para confirmar a estrutura química dos compostos acetato de geranila (Figura 21) e acetato de nerila (Figura 22) obtidos através da síntese pela rota proposta.

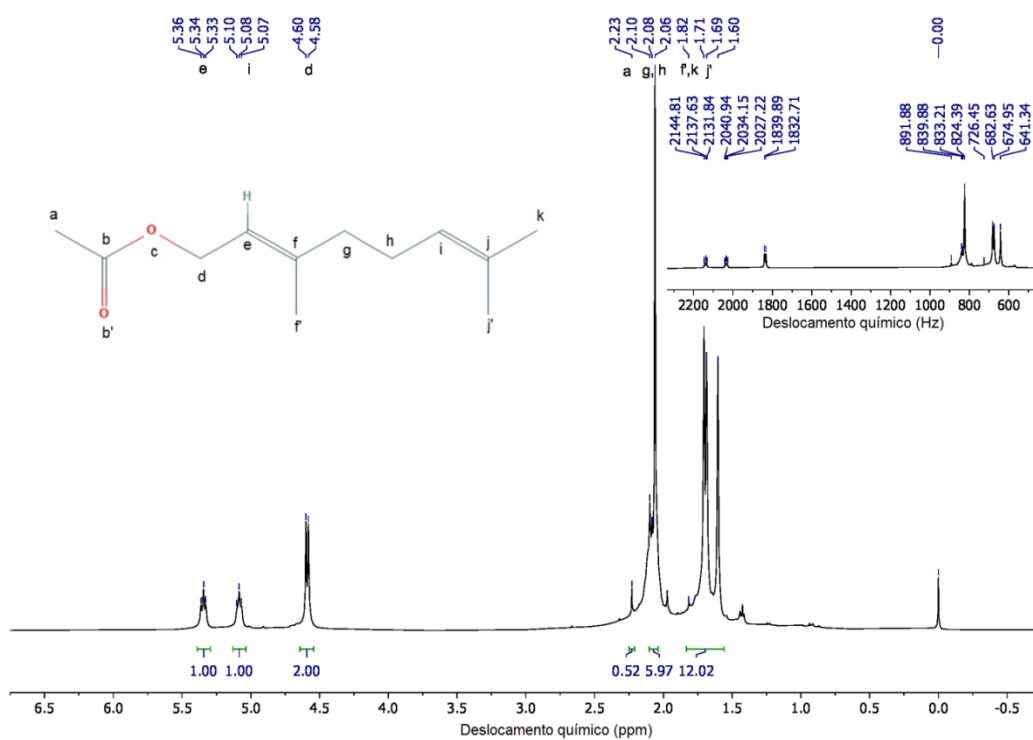
Figura 21 – Espectro obtido com o acetato de geranila sintetizado a partir da reação de geraniol e anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 de (a) RMN ^{13}C , (b) DEPT 135 de RMN ^{13}C e (c) RMN ^1H .



(a)



(b)



(c)

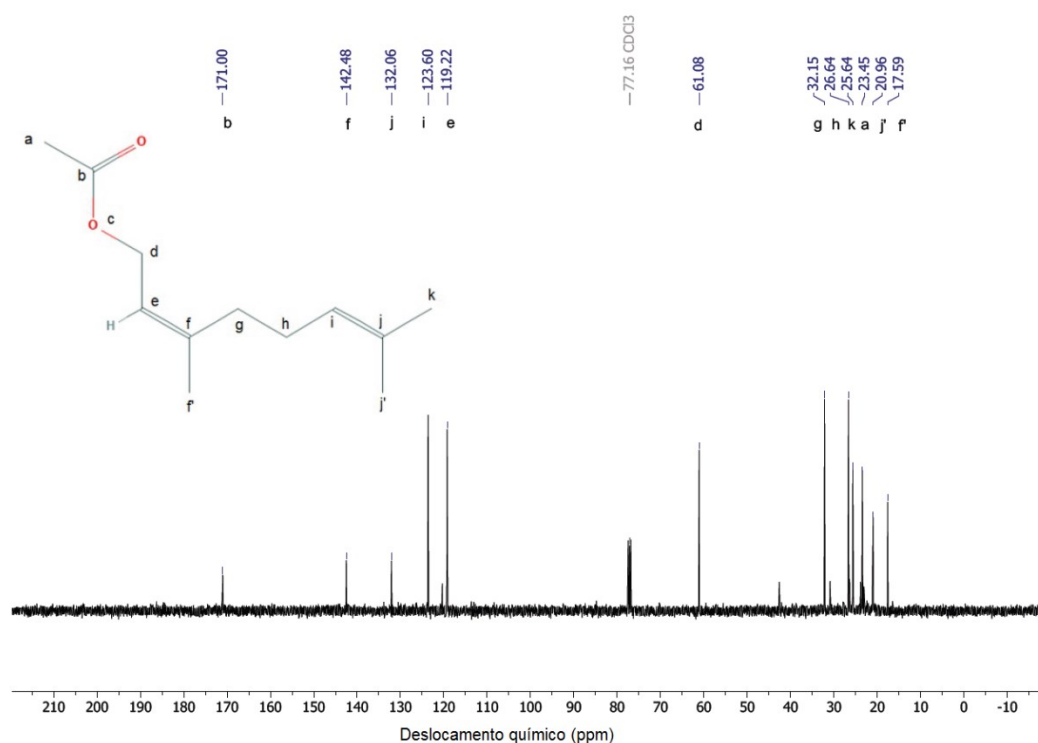
Fonte: a autora (2021).

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 21a e b) mostram picos característicos associados à presença de carbonos no acetato de geranila. O pico em $\delta = 170,89$ representa o grupo R – CO

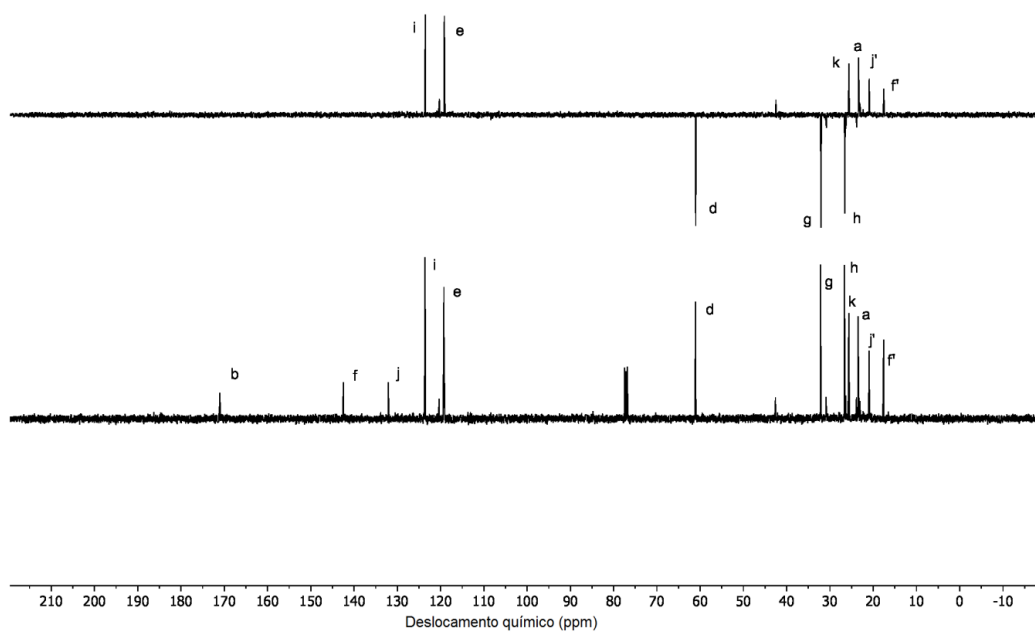
– OR. Os picos em $\delta = 142,00$ e $\delta = 131,62$ representam carbonos com ligação insaturada (dupla). Os picos em $\delta = 123,72$ e $\delta = 118,35$ mostram sinal positivo e representam carbonos de ligação dupla e, portanto, correspondem a grupos CH. O pico em $\delta = 61,26$ corresponde ao grupo $\text{CH}_2 - \text{O}$. Os picos em $\delta = 39,47$ e $\delta = 26,24$ mostram sinal negativo e correspondem a grupos CH_2 . Os picos em $\delta = 25,55$, $\delta = 20,85$, $\delta = 17,56$ e $\delta = 16,32$ mostram sinais positivos e correspondem aos grupos CH_3 .

O espectro de RMN ^1H do acetato de geranila (Figura 21c) mostra picos característicos em $\delta = 5,36 - 5,33$ (2144,81 Hz – 2131,84 Hz) e $\delta = 5,10 - 5,07$ (2040,94 Hz – 2027,22 Hz) para grupos CH, em $\delta = 4,60 - 4,58$ (1839,89 Hz – 1832,71 Hz) para o grupo $\text{CH}_2 - \text{O}$, em $\delta = 2,23$ (891,88 Hz) para o grupo CH_3 ligado à carbonila, em $\delta = 2,10 - 2,06$ (839,88 Hz – 824,39 Hz) para grupos CH_2 , em $\delta = 1,82$ (726,45 Hz) e $\delta = 1,71 - 1,60$ (682,63 Hz – 641,34 Hz) para grupos CH_3 ligados a carbonos de ligação dupla.

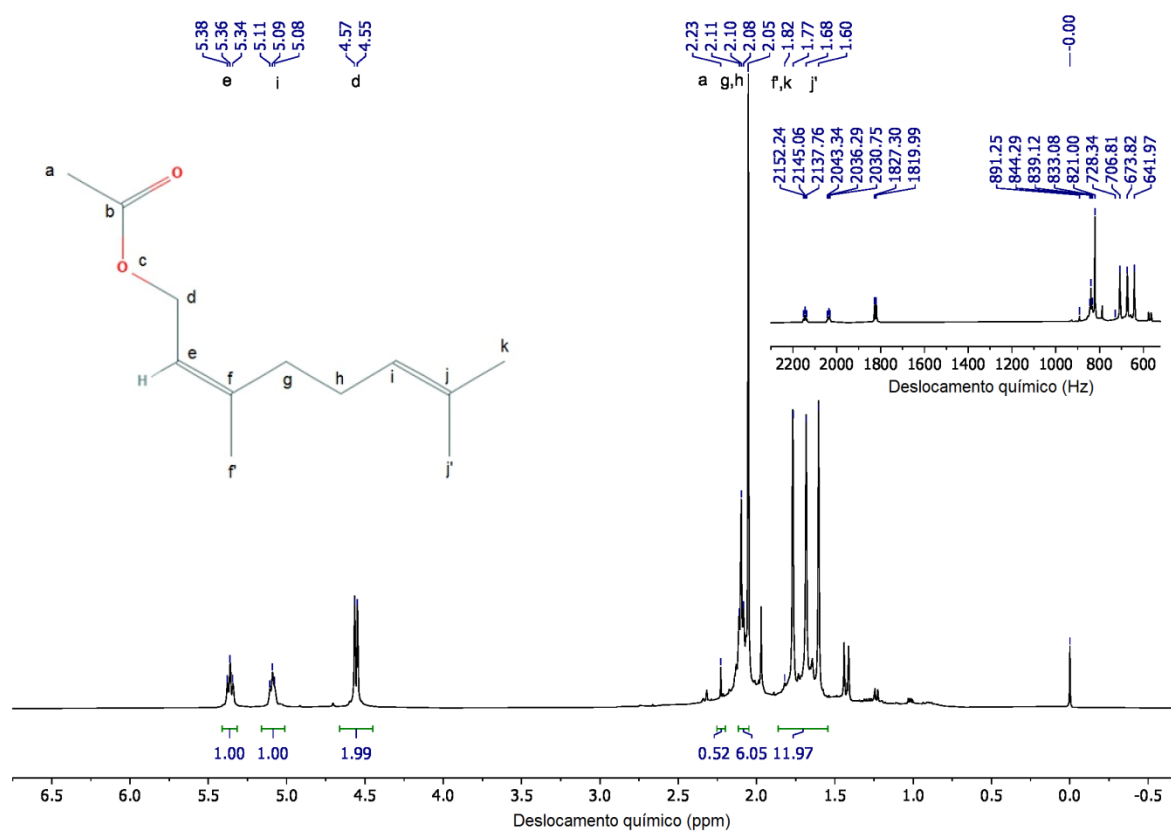
Figura 22 – Espectro obtido com o acetato de nerila sintetizado a partir da reação de nerol e anidrido acético catalisada pela resina Lewatit® GF 101 de (a) RMN ^{13}C , (b) DEPT 135 de RMN ^{13}C e (c) RMN ^1H .



(a)



(b)



(c)

Fonte: a autora (2021).

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 22a e b) mostram picos característicos associados à presença de carbonos no acetato de nerila. Os picos em $\delta = 17,59$, $\delta = 20,96$, $\delta = 23,45$ e $\delta = 25,64$ mostram sinais positivos e correspondem aos grupos CH_3 . Os picos em $\delta = 26,64$ e $\delta = 32,15$ mostram sinal negativo e correspondem a grupos CH_2 . O pico em $\delta = 61,08$ corresponde ao grupo $\text{CH}_2 - \text{O}$. Os picos em $\delta = 119,22$ e $\delta = 123,60$ mostram sinal positivo e representam carbonos de ligação dupla, portanto, eles correspondem a grupos CH . Os picos em $\delta = 132,06$ e $\delta = 142,48$ representam carbonos com ligação insaturada (dupla). O pico em $\delta = 171,00$ representa o grupo $\text{R} - \text{CO} - \text{OR}$.

O espectro de RMN ^1H do acetato de nerila (Figura 22c) mostra picos característicos em $\delta = 1,82$ (728,34 Hz) e $\delta = 1,77 - 1,60$ (706,81 Hz – 641,97 Hz) para grupos CH_3 ligados a carbonos de ligação dupla, em $\delta = 2,11 - 2,05$ (844,29 Hz – 821,00 Hz) para grupos CH_2 , em $\delta = 2,23$ (891,25 Hz) para o grupo CH_3 ligado à carbonila, em $\delta = 4,57 - 4,55$ (1827,30 Hz – 1819,99 Hz) para o grupo $\text{CH}_2 - \text{O}$, em $\delta = 5,38 - 5,34$ (2152,24 Hz – 2137,76 Hz) e $\delta = 5,11 - 5,08$ (2043,34 Hz – 2030,75 Hz) para grupos CH .

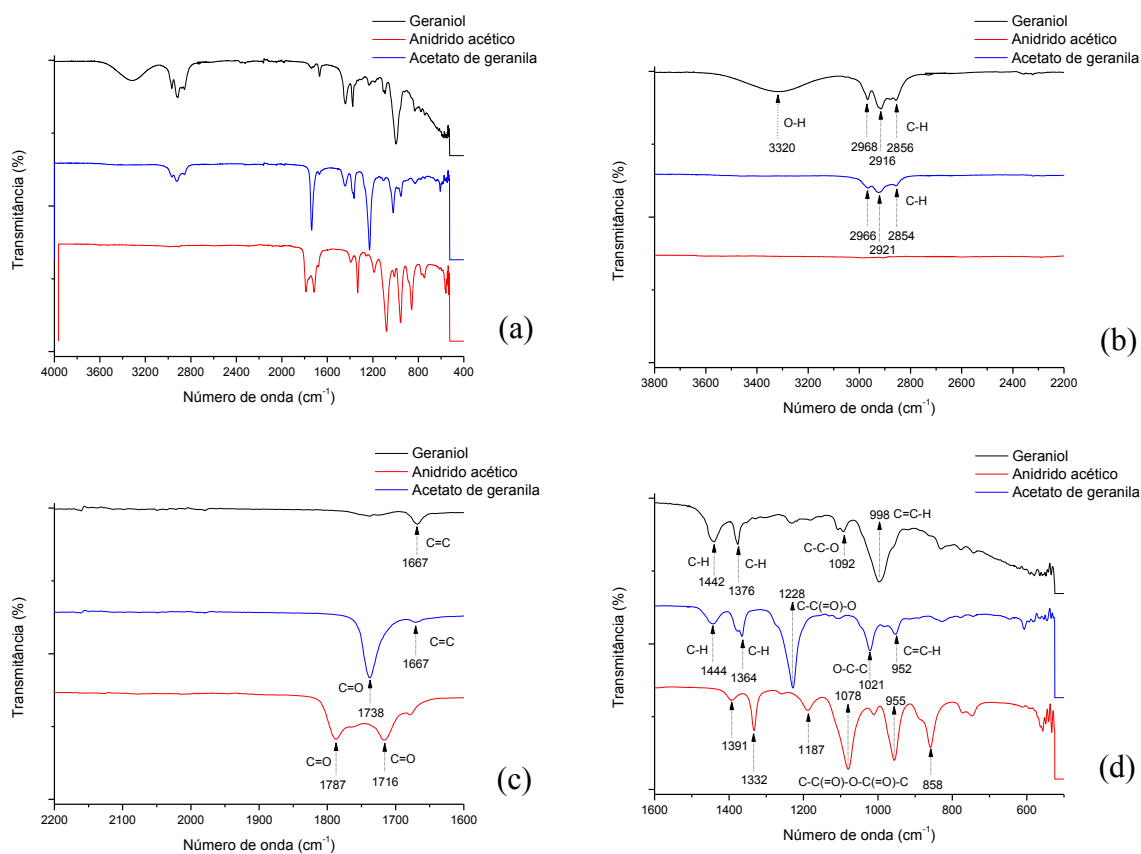
Os resultados obtidos para o acetato de geranila (Figura 21) e para o acetato de nerila (Figura 22) estão de acordo com os apresentados por Silverstein et al. (2005) para bandas de detecção de pico em espectros de RMN ^{13}C , para grupo $\text{R} - \text{CO} - \text{OR}$ ($\delta = 175 - 165$), para carbono com ligação dupla ($\delta = 150 - 100$), para grupos $\text{CH}_2 - \text{O}$ ($\delta = 75 - 55$), para grupos $\text{R} - \text{CH}_3$ ($\delta = 35 - 8$); em espectro RMN ^{13}C (DEPT 135) que mostra picos característicos de grupos CH e CH_3 com sinal positivo e grupos CH_2 com sinal negativo; e em espectros de RMN ^1H para $\text{C} = \text{CH}$ ($\delta = 6 - 5$), $\text{R} - \text{CH}_2 - \text{O}$ ($\delta = 4 - 3$), $\text{O} = \text{C} - \text{CH}_3$ (aproximadamente $\delta = 2,1$), $\text{C} = \text{C} - \text{CH}_3$ (aproximadamente $\delta = 1,7$), considerando que o deslocamento químico pode ser influenciado por vizinhos adjacentes, o que pode ter ocorrido com o incremento do grupo $\text{R} - \text{CH}_2 - \text{O}$ devido à presença de carbonila como vizinho adjacente ao oxigênio.

5.4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química dos compostos envolvidos nas reações de esterificação foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) através da identificação dos grupos funcionais de reagentes e produtos. Os espectros de FTIR (Figura 23a e Figura 24a) mostram os sinais característicos obtidos para geraniol, acetato de geranila, nerol, acetato de nerila e anidrido acético. Para melhor visualização e identificação, os

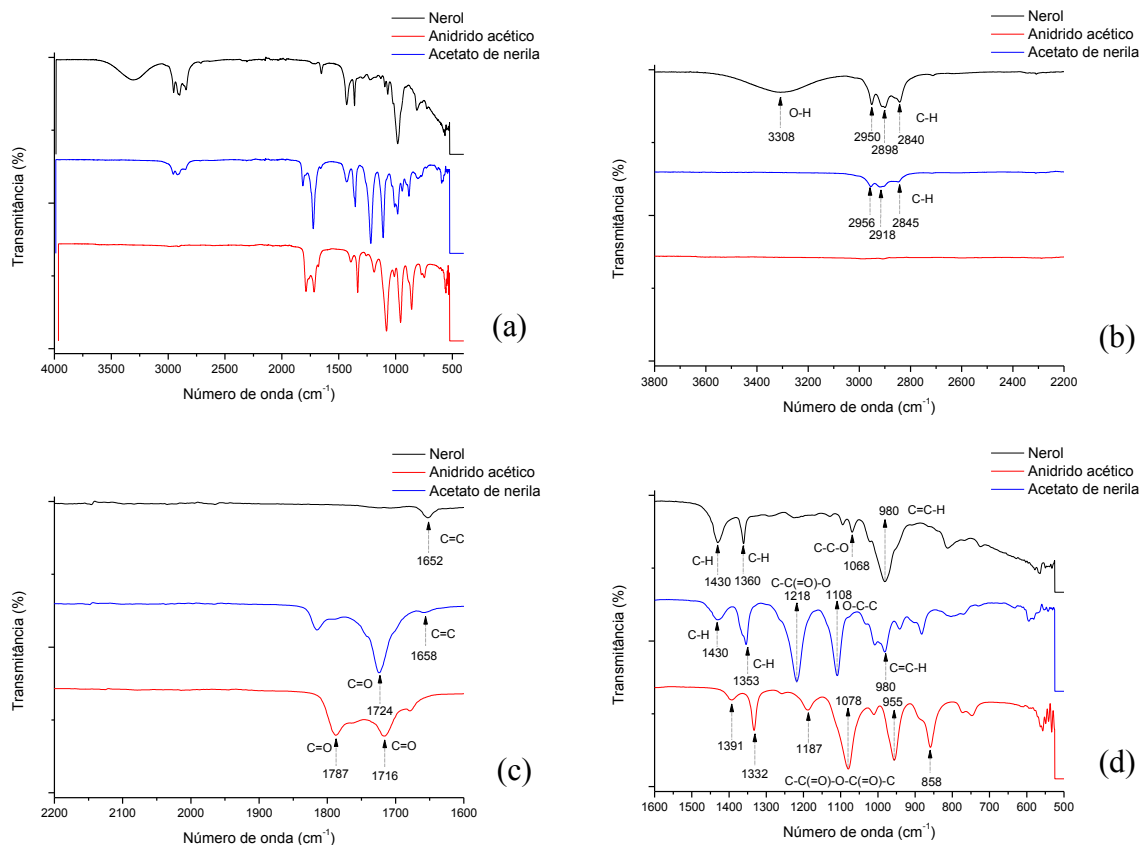
espectros foram divididos em intervalo de 3800 cm^{-1} a 2200 cm^{-1} (Figura 23b e Figura 24b), de 2200 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} (Figura 23c e Figura 24c) e de 1600 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (Figura 23d e Figura 24d).

Figura 23 – Espectro de FTIR obtido para as amostras de geraniol, acetato de geranila e anidrido acético nos números de onda de (a) 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , (b) 3800 cm^{-1} a 2200 cm^{-1} , (c) 2200 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} e (d) 1600 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .



Fonte: a autora (2021).

Figura 24 – Espectro de FTIR obtido para as amostras de nerol, acetato de nerila e anidrido acético nos números de onda de (a) 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , (b) 3800 cm^{-1} a 2200 cm^{-1} , (c) 2200 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} e (d) 1600 cm^{-1} a 500 cm^{-1} .



Fonte: a autora (2021).

A hidroxila da função alcoólica O – H pode ser visualizada nos sinais correspondentes ao número de onda de 3320 cm^{-1} para o geraniol (Figura 23b) e 3308 cm^{-1} para o nerol (Figura 24b). A presença dos dois grupos de carbonila (C = O) no anidrido acético é detectada nos sinais em 1787 cm^{-1} e 1716 cm^{-1} (Figura 23c), enquanto a carbonila (C = O) presente nos ésteres mostra um sinal em 1738 cm^{-1} para o acetato de geranila (Figura 23c) e 1724 cm^{-1} para o acetato de nerila (Figura 24c). O agrupamento C – C – O pode ser visto no sinal em 1092 cm^{-1} para o geraniol e 1021 cm^{-1} para o acetato de geranila (Figura 23d), em 1068 cm^{-1} para o nerol e 1108 cm^{-1} para o acetato de nerila (Figura 24d). O agrupamento C – C (= O) – O dos ésteres pode ser visualizado nos sinais em 1228 cm^{-1} para o acetato de geranila (Figura 23d) e 1218 cm^{-1} para o acetato de nerila (Figura 24d). O agrupamento C – C (= O) – O – (O =) C – C de anidrido acético pode ser visto nos sinais em 1391 cm^{-1} , 1332 cm^{-1} , 1187 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} , 995 cm^{-1} e 858 cm^{-1} (Figura 23d). Os dois carbonos de ligação dupla (C = C) podem ser vistos nos sinais em 1667 cm^{-1} (Figura 23c) e 998 cm^{-1} (Figura 23d) para o geraniol, em 1667

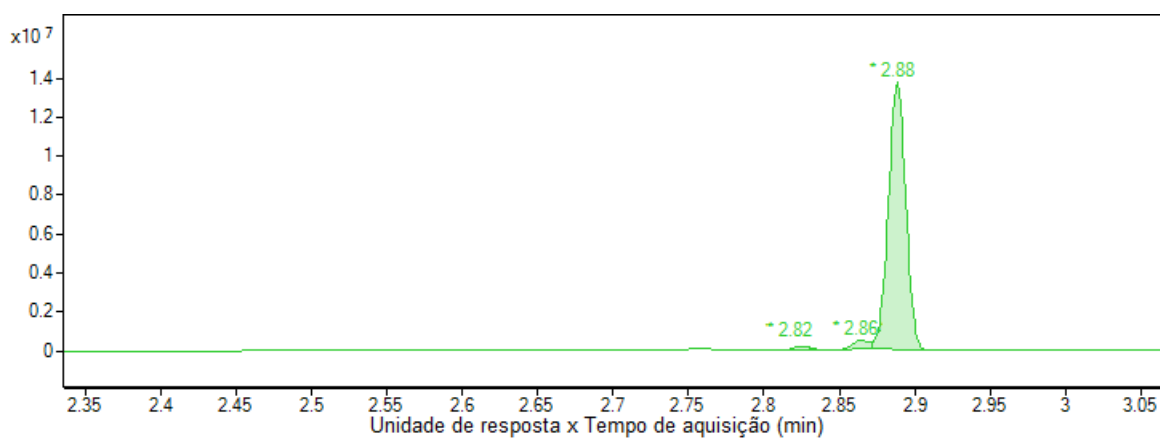
cm^{-1} (Figura 23c) e 952 cm^{-1} (Figura 23d) para o acetato de geranila, em 1652 cm^{-1} (Figura 24c) e 980 cm^{-1} (Figura 24d) para o nerol, em 1658 cm^{-1} (Figura 24c) e 980 cm^{-1} (Figura 24d) para o acetato de nerila. As ligações CH podem ser vistas nos sinais em 2968 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} , 2856 cm^{-1} (Figura 23b), 1442 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} (Figura 23d) para o geraniol, em 2966 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} (Figura 23b), 1444 cm^{-1} e 1364 cm^{-1} (Figura 23d) para o acetato de geranila, em 2950 cm^{-1} , 2898 cm^{-1} , 2840 cm^{-1} (Figura 24b), 1430 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} (Figura 24d) para o nerol, em 2956 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} (Figura 24b) e 1430 cm^{-1} e 1353 cm^{-1} (Figura 24d) para o acetato de nerila.

Os resultados obtidos (Figura 23 e Figura 24) estão de acordo com os apresentados por Silverstein et al. (2005) para detecção de sinal no espectro FTIR para ligações O – H (3800 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} , com sinal forte e amplo para 3400 cm^{-1} a 3200 cm^{-1}), para ligações C = O (sinal forte para 1850 cm^{-1} a 1600 cm^{-1}), para ligações C – O (1300 cm^{-1} a 800 cm^{-1}), para banda de alongamento C – C – O (1260 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}) em espectros de álcoois, para banda de alongamento C – C – O (sinal forte para 1300 cm^{-1} a 1100 cm^{-1}) em espectros de ésteres, para vibrações de alongamento C = C (1900 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} , sinal médio/fraco para 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1}), para as vibrações de flexão C – H fora do plano de alcenos (sinal forte/fraco a 1000 cm^{-1} a 650 cm^{-1}), para ligações C – H (3000 cm^{-1} a 2850 cm^{-1}), para vibrações de alongamento C – H associadas a grupos metil e metileno (2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1}), para a vibração de flexão simétrica do grupo metil (perto de 1375 cm^{-1}) e vibração de flexão assimétrica (perto de 1450 cm^{-1}), para ligações C – C (1300 cm^{-1} a 800 cm^{-1}) e para as duas bandas de alongamentos C = O (perto de 1818 cm^{-1} a 1720 cm^{-1}) em espectros de anidrido carboxílico. Além disso, os resultados do espectro de FTIR também estão de acordo com outros trabalhos relatados na literatura que encontraram sinais dos picos detectados semelhantes aos encontrados neste trabalho para anidrido acético de Haji e Erkey (2005), para geraniol de Gao et al. (2021), Da Rocha Neto et al. (2017), Yang et al. (2015) e Menezes et al. (2012), para nerol por Fagundes et al. (2021), Coêlho et al. (2017) e Yang et al. (2015), para o acetato de geranila de Da Rocha Neto et al. (2017) e para ésteres nerílicos por Worzakowska e Ścigalski (2013).

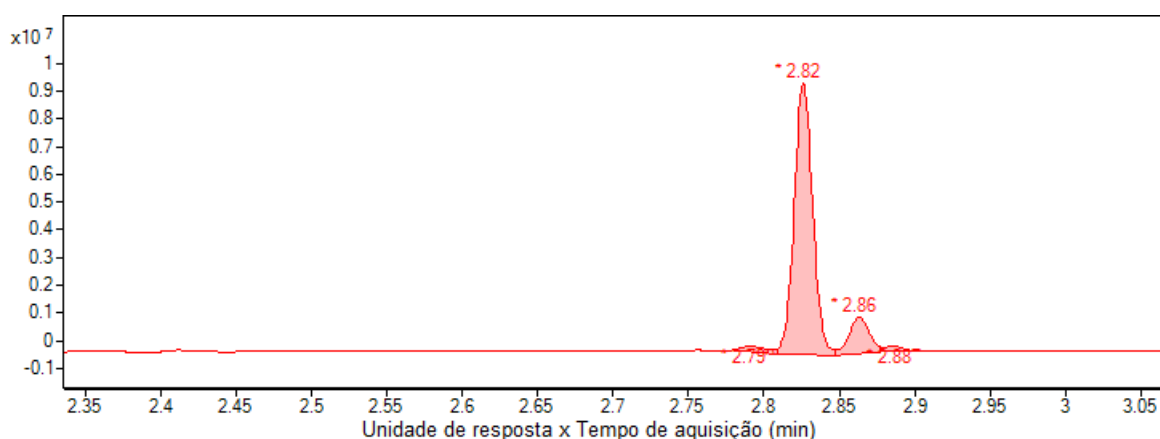
5.4.1.3 Cromatografia gasosa (CG–FID)

O grau de pureza dos compostos acetato de geranila e nerila foi verificado por cromatografia gasosa (CG–FID). Os resultados das análises estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Cromatograma de CG–FID para as amostras de (a) acetato de geranila e (b) acetato de nerila.



(a)



(b)

Fonte: a autora (2021).

Pelos cromatogramas é possível verificar que os compostos majoritários são os ésteres acetato de geranila (Figura 25a) e acetato de nerila (Figura 25b), confirmados pelo comparativo de espectros de massas da biblioteca NIST, com um sinal forte no tempo de retenção de 2,88 min e de 2,82 min, respectivamente. Os resultados indicam um grau de pureza de 95,80% para o acetato de geranila (Figura 25a) e 83,45% para acetato de nerila (Figura 25b). Além disso, também é possível verificar que o isômero acetato de nerila está presente na amostra do acetato de geranila (Figura 25a), enquanto que, o isômero acetato de geranila está presente na amostra do acetato de nerila (Figura 25b). Os demais compostos detectados em quantidades minoritárias correspondem ao acetato de α -terpinila e ao diidrocarveol.

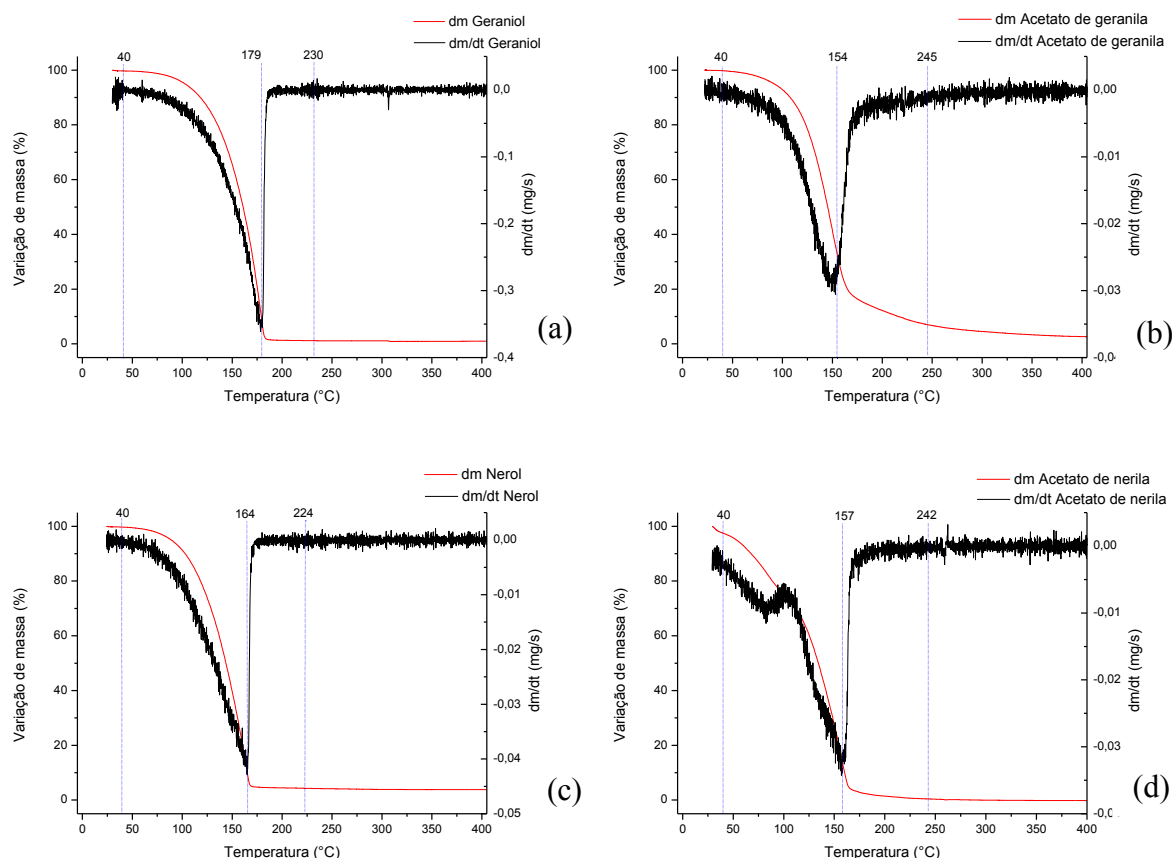
5.4.2 Caracterização térmica

Esta seção engloba os resultados para a caracterização térmica por análise termogravimétrica.

5.4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos compostos envolvidos na reação de esterificação, geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila, foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA). Os resultados são mostrados na Figura 26.

Figura 26 – Termogramas obtidos pela TGA para as amostras de (a) geraniol, (b) acetato de geranila, (c) nerol e (d) acetato de nerila.



Fonte: a autora (2021).

As curvas TG (Figura 26) mostram que a decomposição dos compostos é desprezível na temperatura de reação (40 °C). Pela inflexão das curvas TG, é possível observar que o

acetato de geranila (Figura 26b) apresenta decomposição mais lenta que o geraniol (Figura 26a), enquanto que o acetato de nerila (Figura 26d) apresenta decomposição mais rápida que o nerol (Figura 26c) em temperaturas abaixo de 150 °C e mais lenta em temperaturas acima de 150 °C. É possível verificar que a perda de massa do acetato de nerila até a temperatura de 40 °C é um pouco maior que a dos demais compostos, possivelmente por apresentar um grau de pureza um pouco menor (83,45%) que os demais (acetato de geranila = 95,80%, geraniol e nerol \geq 97%). A maior fração de cada composto evapora até o ponto de ebulição correspondente, 98,82% até 230 °C para o geraniol (Figura 26a), 95,73% até 224 °C para o nerol (Figura 26c), 93% até 245 °C para acetato de geranila (Figura 26b) e 99,58% até 242 °C para acetato de nerila (Figura 26d), a partir do qual ocorre a decomposição contínua dos compostos e impurezas. O ponto de perda máxima de massa, que representa a condição de temperatura da taxa de degradação térmica máxima de cada composto, pode ser observado nas curvas derivadas para geraniol a 179 °C (Figura 26a), para nerol a 164 °C (Figura 26c), para acetato de geranila a 154 °C (Figura 26b) e para acetato de nerila a 157 °C (Figura 26d). Os resultados para o comportamento das curvas TG são semelhantes a outros estudos relatados na literatura para o geraniol por Gao et al. (2021), Yang et al. (2015) e Menezes et al. (2012), para o nerol por Fagundes et al. (2021), Gao et al. (2021), Coêlho et al. (2017) e Yang et al. (2015).

5.4.3 Avaliação da ação antibacteriana

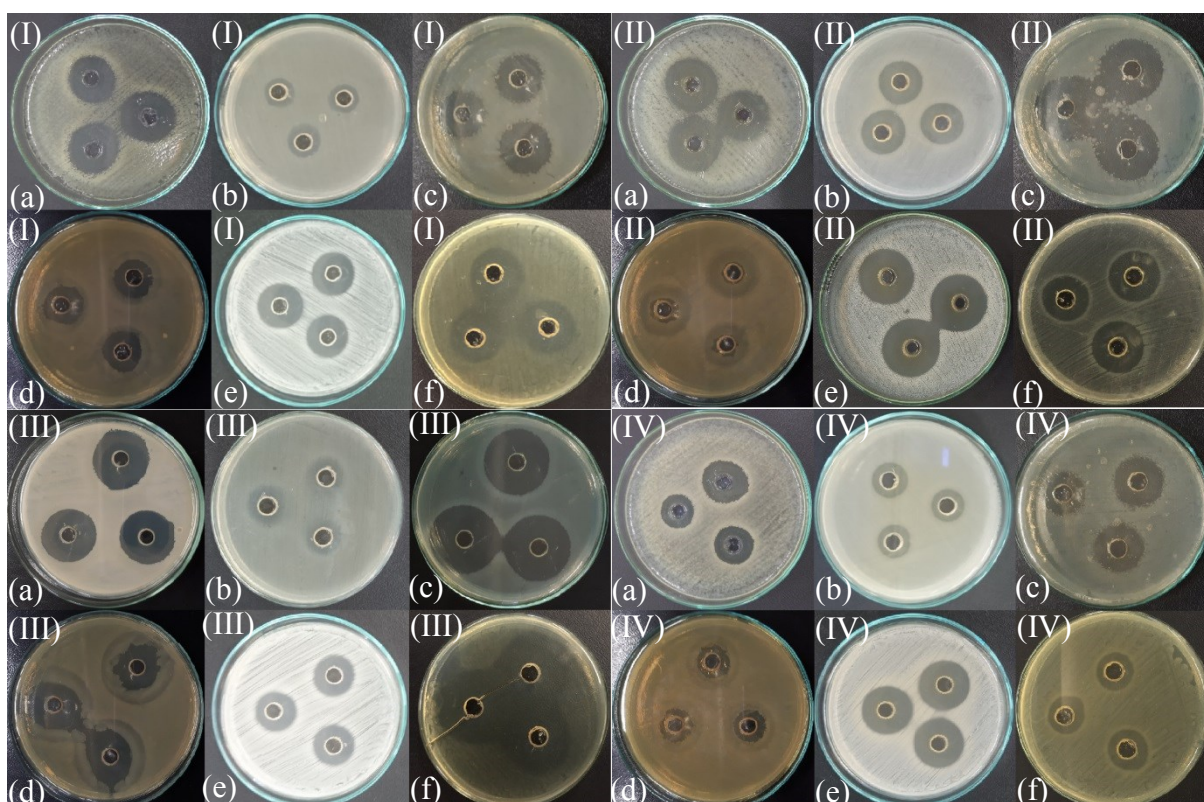
Para avaliar se os compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos a partir da rota proposta neste trabalho possuem ação antibacteriana, a caracterização microbiológica frente a micro-organismos representantes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi realizada. Para fins comparativos, a ação antibacteriana dos álcoois precursores, geraniol e nerol também foi avaliada. As caracterizações antibacterianas foram realizadas com ensaios de difusão em ágar e microdiluição em caldo. O teste confirmativo foi realizado pela técnica de diluição em ágar. Os resultados obtidos nesses testes estão apresentados nos itens a seguir.

5.4.3.1 Ensaio de difusão em ágar

A atividade antibacteriana dos compostos contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas*

aeruginosa foi determinada pela técnica de difusão em ágar, estriadas com a concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹. Os resultados obtidos para as imagens das placas estão apresentados na Figura 27 e para os halos de inibição correspondentes na Tabela 8.

Figura 27 – Difusão em ágar com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ para a atividade antibacteriana de geraniol (I), acetato de geranila (II), nerol (III) e acetato de nerila (IV) com: (a) *B. cereus*, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *P. mirabilis*, (e) *S. aureus* e (f) *S. typhimurium*.



Fonte: a autora (2021).

Os resultados demonstram que as seis bactérias testadas apresentam sensibilidade aos compostos geraniol, nerol, acetato de geranila e acetato de nerila com diferentes níveis de resistência, conforme evidenciado pela formação de halos de inibição (Figura 27, Tabela 8). O acetato de geranila apresentou maior atividade antimicrobiana do que o acetato de nerila pela técnica de difusão para os micro-organismos testados, enquanto o nerol se destacou em relação ao geraniol para a maioria das bactérias (Figura 27, Tabela 8). A presença do grupo acetato na estrutura de terpenóides pode levar a um aumento da sua atividade antimicrobiana (DĂNILĂ et al., 2018), o que aconteceu para o acetato de geranila.

Tabela 8 – Espessuras dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em ágar para determinação da atividade antibacteriana dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila frente às bactérias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Micro-organismo	Espessura dos halos de inibição [mm]			
	Geraniol	Acetato de geranila	Nerol	Acetato de nerila
<i>B. cereus</i>	18 ± 2	18 ± 1	23 ± 0	11 ± 3
<i>E. coli</i>	7 ± 1	13 ± 1	8 ± 1	8 ± 0
<i>P. aeruginosa</i>	14 ± 1	20 ± 1	23 ± 1	13 ± 1
<i>P. mirabilis</i>	9 ± 1	12 ± 1	15 ± 1	7 ± 1
<i>S. aureus</i>	13 ± 1	22 ± 1	11 ± 0	16 ± 0
<i>S. typhimurium</i>	15 ± 1	14 ± 1	26 ± 1	9 ± 0

Fonte: a autora (2021).

Segundo Alves et al. (2000), o método de difusão em ágar estabelece que diâmetros dos halos de inibição menores que 9 mm devem ser considerados microbiologicamente inativos, os diâmetros entre 9 mm e 12 mm como parcialmente ativos, os diâmetros entre 13 mm e 18 mm como ativos e os diâmetros maiores que 18 mm muito ativos. Desta forma, o acetato de geranila pode ser considerado microbiologicamente muito ativo frente à *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ativo frente à *E. coli*, *B. cereus* e *S. typhimurium* e parcialmente ativo frente à *P. mirabilis*. Por outro lado, o acetato de nerila pode ser considerado microbiologicamente ativo frente à *S. aureus* e *P. aeruginosa*, parcialmente ativo para *B. cereus* e *S. typhimurium* e inativo frente à *E. coli* e *P. mirabilis*. Tais diferenças podem estar associadas com o grau de pureza dos compostos visto que o acetato de nerila apresentou grau de pureza menor do que o acetato de geranila. Em relação aos reagentes, é possível verificar que o geraniol pode ser considerado microbiologicamente ativo frente à *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. typhimurium*, parcialmente ativo frente à *P. mirabilis* e inativo frente à *E. coli*, enquanto o nerol pode ser considerado muito ativo frente à *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, ativo frente à *P. mirabilis*, parcialmente ativo frente à *S. aureus* e inativo frente à *E. coli*. Mesmo apresentando halos de inibição para sua classificação como microbiologicamente inativo, é possível verificar que o acetato de nerila é capaz de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *P. mirabilis*, assim como geraniol para *E. coli*, o que foi corroborado pelo teste de microdiluição em caldo, apresentado na Seção 5.2.3.2, onde também é apresentada a discussão frente ao mecanismo de inibição.

A ação antimicrobiana dos compostos frente às bactérias avaliadas também foi encontrada por outros autores para óleos contendo como compostos majoritários o acetato de geranila (CHANG et al., 2001; BEZIĆ et al. 2003; DUARTE et al., 2007; ANDRADE et al., 2013; DJIHANE et al., 2016), o acetato de nerila (DEHGHAN et al., 2007; DJIHANE et al., 2016; DĂNILĂ et al., 2018), o geraniol (CHANG et al., 2001; DUARTE et al., 2005; DUARTE et al., 2007; JIROVETZ et al., 2007; CHEN; VILJOEN, 2010; ANDRADE et al., 2013; ZANETTI et al., 2015) e o nerol (JIROVETZ et al., 2007; TIAN et al., 2013; WANG et al., 2015).

5.4.3.2 Ensaio de microdiluição em caldo e diluição em ágar

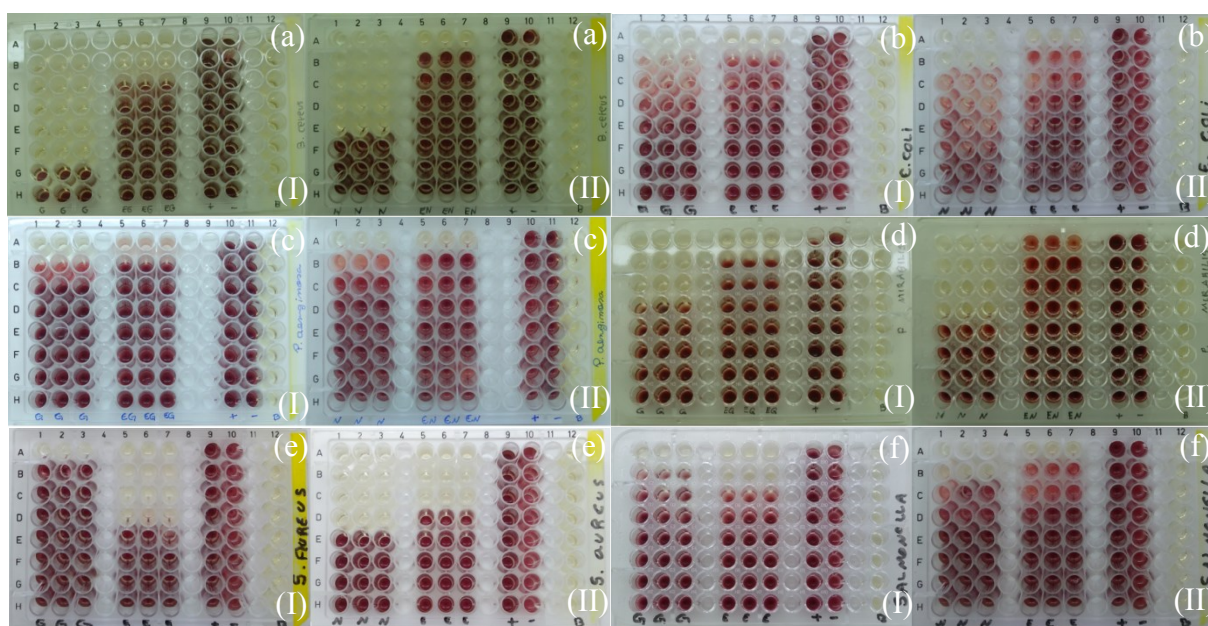
Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) necessária de cada composto para a inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, a técnica de microdiluição em caldo, com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹, foi utilizada. Os resultados obtidos para as imagens das placas estão apresentados na Figura 28 e para os valores de CIM correspondentes na Tabela 9.

Para melhor compreensão dos resultados da Figura 28, recomenda-se verificar a Figura 7 apresentada na Seção 4.4.3.3, onde é possível visualizar que cada microplaca utilizada na análise contém micropoços distribuídos em linhas nomeadas de “A” a “H” e em colunas enumeradas de 1 a 12. Desta forma, ao se referir ao resultado da análise para cada composto, o número da coluna ou a letra da linha onde o composto está localizado na microplaca é apresentado. Cabe ressaltar que as microplacas utilizadas com cada microorganismo para o geraniol e o acetato de geranila (Figura 28) são denominadas como “I”, enquanto que, as microplacas utilizadas para o nerol e o acetato de nerila são denominadas como “II”.

Nas microplacas da Figura 28, para a coluna 9 (controle positivo, exceto para *P. aeruginosa*, cujo controle positivo foi na coluna 10), observa-se a coloração vermelho intenso, indicando o crescimento das bactérias sem resistência ao meio de cultura visto que esta coluna apresenta os resultados dos testes com 100 µL de BHI e 5 µL da suspensão bacteriana. Para a coluna 10 (controle negativo, exceto para *P. aeruginosa*, cujo controle negativo foi na coluna 11), onde o meio contém 100 µL de BHI, 100 µL da solução de 10% de DMSO e 5 µL da suspensão bacteriana, os resultados indicam que na concentração empregada o solvente

DMSO não inibe o crescimento bacteriano, pois todos os poços apresentam a coloração vermelho intenso. Para a coluna 12, que representa o branco (controle) e contém apenas 100 μL de meio de cultura, os resultados mostram que a placa e o meio utilizado estão estéreis visto que os poços estão incolores, indicando que não houve crescimento de bactérias.

Figura 28 – Microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de geraniol (I, colunas 1, 2 e 3), acetato de geranila (I, colunas 5, 6 e 7), nerol (II, colunas 1, 2 e 3) e acetato de nerila (II, colunas 5, 6 e 7) com (a) *B. cereus*, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *P. mirabilis*, (e) *S. aureus* e (f) *S. typhimurium*.



Fonte: a autora (2021).

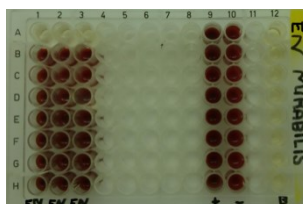
Em relação aos compostos avaliados, frente ao micro-organismo *B. cereus*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas F e G para o geraniol (Figura 28a – I, colunas 1, 2 e 3), entre as linhas B e C para o acetato de geranila (Figura 28a – I, colunas 5, 6 e 7), entre as linhas E e F para o nerol (Figura 28a – II, colunas 1, 2 e 3) e entre as linhas A e B para o acetato de nerila (Figura 28a – II, colunas 5, 6 e 7). A coloração vermelha indica a presença de células bacterianas vivas. Portanto, nas linhas destacadas onde a coloração não é vermelha (incolor), não ocorreu o crescimento bacteriano, o que representa que os compostos foram inibidores. Frente ao micro-organismo *E. coli*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas B e C para o nerol (Figura 28b – II, colunas 1, 2 e 3) e entre as linhas A e B para geraniol (Figura 28b – I, colunas 1, 2 e 3), acetato de geranila (Figura 28b – I, colunas 5, 6 e 7) e acetato de nerila (Figura 28b – II,

colunas 5, 6 e 7). Cabe ressaltar que a intensidade visual da coloração vermelha é menor nas linhas de maior concentração dos álcoois e ésteres e maior nas linhas de menor concentração. Este comportamento é um indicativo da redução da taxa de crescimento bacteriano com o aumento da concentração de composto até o valor da CIM.

Frente ao micro-organismo *P. aeruginosa*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas A e B para todos os compostos (Figura 28c). Frente ao micro-organismo *S. aureus*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas A e B para o geraniol (Figura 28e – I, colunas 1, 2 e 3), entre as linhas C e D para o acetato de nerila (Figura 28e – II, colunas 5, 6 e 7) e entre as linhas D e E para o nerol (Figura 28e – II, colunas 1, 2 e 3) e acetato de geranila (Figura 28e – I, colunas 5, 6 e 7). Frente ao micro-organismo *S. typhimurium*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas A e B para o geraniol (Figura 28f – I, colunas 1, 2 e 3) e acetato de nerila (Figura 28f – II, colunas 5, 6 e 7) e entre as linhas B e C para o nerol (Figura 28f – II, colunas 1, 2 e 3) e acetato de geranila (Figura 28f – I, colunas 5, 6 e 7). Cabe ressaltar que para *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, os resultados demonstraram comportamento semelhante aos obtidos com *E. coli* quanto à redução da intensidade da coloração com o aumento da concentração de composto.

Frente ao micro-organismo *P. mirabilis*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas C e D para o geraniol (Figura 28d – I, colunas 1, 2 e 3), entre as linhas A e B para o acetato de geranila (Figura 28d – I, colunas 5, 6 e 7) e entre as linhas D e E para o nerol (Figura 28d – II, colunas 1, 2 e 3). Não ocorre inibição para o acetato de nerila até a linha A (Figura 28d – II, colunas 5, 6 e 7), cuja concentração de composto no micropoço é de 60,00 mg·mL⁻¹. Por este motivo, novo ensaio com acetato de nerila frente a *P. mirabilis* foi realizado utilizando a concentração de composto um pouco maior, iniciando na linha A com 85 mg·mL⁻¹ e com as demais diluições reduzindo pela metade proporcionalmente até a linha H. Os resultados estão apresentados na Figura 29, onde é possível verificar que a concentração inibitória mínima para o acetato de nerila frente à *P. mirabilis* ocorre entre as linhas A e B (colunas 1, 2 e 3).

Figura 29 – Microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acetato de nerila (colunas 1, 2 e 3) frente à bactéria *P. mirabilis* com a concentração de composto de 85 mg·mL⁻¹ na linha A e demais diluições reduzindo proporcionalmente pela metade até a linha H.



Fonte: a autora (2021).

Tabela 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila obtida pela técnica da microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ frente às bactérias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Micro-organismo	Concentração inibitória mínima [mg·mL ⁻¹]			
	Geraniol	Acetato de geranila	Nerol	Acetato de nerila
<i>B. cereus</i>	1,87	30,00	3,75	60,00
<i>E. coli</i>	25,00	25,00	12,50	25,00
<i>P. aeruginosa</i>	25,00	25,00	25,00	25,00
<i>P. mirabilis</i>	15,00	60,00	7,50	85,00
<i>S. aureus</i>	6,25	3,12	3,12	6,25
<i>S. typhimurium</i>	25,00	12,50	12,50	25,00

Fonte: a autora (2021).

Os valores de CIM para acetato de nerila foram maiores do que para acetato de geranila, exceto para *E. coli* e *P. aeruginosa*, que apresentaram o mesmo valor de CIM (Tabela 9). Em comparação com o reagente precursor, o acetato de geranila teve uma concentração inibitória mínima mais baixa do que o geraniol para *S. aureus* (3,12 mg·mL⁻¹ e 6,25 mg·mL⁻¹) e *S. typhimurium* (12,50 mg·mL⁻¹ e 25,00 mg·mL⁻¹), igual para *E. coli* (25,00 mg·mL⁻¹) e *P. aeruginosa* (25,00 mg·mL⁻¹) e superior para *B. cereus* (30,00 mg·mL⁻¹ e 1,87 mg·mL⁻¹) e *P. mirabilis* (60,00 mg·mL⁻¹ e 15,00 mg·mL⁻¹), enquanto o acetato de nerila apresentou concentração inibitória mínima superior ao nerol, exceto com *P. aeruginosa* onde a CIM foi igual (Tabela 9).

Pode-se ainda observar na Tabela 9 que o valor da CIM com todos os compostos para a bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) foi menor do que para as bactérias Gram-negativas. Comportamento semelhante ocorreu para *B. cereus* com geraniol e nerol, indicando que as bactérias Gram-positivas mostraram menos resistência aos compostos do que as Gram-negativas. O resultado do valor da CIM obtido com o acetato de geranila e o acetato de nerila para *B. cereus*, apesar de ser uma bactéria Gram-positiva, pode estar associado com a produção de toxinas. A exposição de *B. cereus* ao álcool carvacrol resultou na inibição da produção de toxinas (ULTEE; SMID, 2001). Assim, a maior ação dos álcoois geraniol e nerol em relação aos ésteres derivados, neste caso, pode estar associada à inibição da produção de toxinas de *B. cereus*.

Pelo teste confirmativo de diluição em ágar, não foi observado crescimento de colônias utilizando os álcoois geraniol e nerol no valor da CIM para nenhum micro-organismo testado, indicando que a inibição foi completa (ação bactericida) para ambos os compostos com todas as bactérias testadas. Para os ésteres, o teste confirmativo apresentou crescimento de colônias do acetato de geranila apenas com *S. typhimurium* e do acetato de nerila apenas com *S. aureus*, indicando que no valor de CIM a ação é bacteriostática (inibição parcial) do acetato de geranila com *S. typhimurium* e do acetato de nerila com *S. aureus*, sendo que, para ocorrer a ação bactericida, são necessárias concentrações superiores ao valor da CIM. Porém, ambos os compostos apresentam ação bactericida (inibição completa) para os demais micro-organismos testados no valor da CIM.

Duarte et al. (2007) identificaram que o geraniol e o acetato de geranila demonstraram ação antibacteriana contra duas cepas de *E. coli* com valores de CIM para geraniol de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para acetato de geranila de $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dehghan et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais obtidos do caule/folhas e flores/frutos de *Ferula szovitsiana* (*Umbelliferae*) que apresentaram acetato de nerila como composto majoritário (33,0% e 41,5%, respectivamente) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima do óleo de *F. szovitsiana* para inibir *S. aureus* foi de $10 \text{mg}\cdot\text{disco}^{-1}$ e para *E. coli* e *P. aeruginosa* foi superior a $20 \text{mg}\cdot\text{disco}^{-1}$. Andrade et al. (2013) identificaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) com 57,49% de geraniol em sua composição contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O óleo apresentou valores de CIM de $0,48 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus*, $1,90 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e maiores que $26,22 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*. Ilić et al. (2017) descobriram que o geraniol demonstrou atividade antimicrobiana contra *E.*

coli com um valor de CIM de 1386,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de CBM de 2773,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* com valor de CIM e CBM de 2773,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. İřcan (2017) investigou a ação antimicrobiana do geraniol, nerol e acetato de geranila contra diferentes micro-organismos. Todos os compostos demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O geraniol apresentou valores de CIM de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus*, 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157: H7 e *B. cereus* e 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli*. O nerol apresentou valores de CIM de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 e *B. cereus* e 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e *S. typhimurium*. O acetato de geranila apresentou valores de CIM de 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 e *B. cereus* e 16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e *P. aeruginosa*.

As diferenças na suscetibilidade dos micro-organismos aos compostos podem ser atribuídas a uma variação na taxa de penetração através da parede celular e estruturas da membrana celular (BLAŽEKOVIĆ et al., 2018). Além disso, diferenças nos valores de CIM podem estar associadas às cepas utilizadas, à concentração de células bacterianas, às adaptações metodológicas, às concentrações de cada composto testadas nos diferentes estudos e ao grau de pureza dos compostos. As interações entre os componentes podem levar a efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos na atividade antimicrobiana (DĂNILĂ et al., 2018; İřCAN, 2017).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos monoterpenos não é totalmente compreendido. Geralmente, a inibição do crescimento de micro-organismos está associada ao efeito dos compostos na integridade e função da membrana (İřCAN, 2017), o que pode afetar tanto o envelope externo da célula quanto o citoplasma (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; NAZZARO et al., 2013). A passagem dos compostos através da parede celular e da membrana citoplasmática pode romper o arranjo de ácidos graxos diferentes, bicamadas de fosfolipídios e moléculas de polissacarídeos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013; LONGBOTTOM et al., 2004). A permeabilidade através da membrana citoplasmática pode danificar as membranas mitocondriais. Assim, as mitocôndrias produzem radicais livres que oxidam e danificam lipídios, proteínas e o DNA (LI et al., 2019). A quebra da integridade da membrana e o aumento da permeabilidade interrompem muitas atividades celulares, incluindo a produção de energia acoplada à membrana, o transporte e outras funções regulatórias metabólicas (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). Além disso, a mudança na permeabilidade celular aumenta a perda de íons K^+ intracelulares e perturba a respiração celular (COX et al., 2000).

A ação antibacteriana está relacionada à hidrofobicidade dos compostos, à sua natureza lipofílica e depende de grupos funcionais (especialmente terpenos oxigenados), o que permite sua penetração nos lipídios da membrana celular bacteriana - uma vez que os compostos hidrofóbicos restringem a difusão celular - destruindo-a e tornando-a mais permeável (DĂNILĂ et al., 2018; İŞCAN, 2017; DHIFI et al., 2016; SWAMY et al., 2016). Além disso, o efeito também está associado aos potenciais de membrana reduzidos, ao rompimento das bombas de prótons e ao esgotamento do ATP (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016; TURINA et al., 2006). Como resultado desses eventos, pode ocorrer a coagulação de componentes celulares internos no citoplasma e a quebra das ligações entre as camadas de lipídios e proteínas (BURT, 2004).

Em bactérias Gram-negativas, a parede celular é um envelope complexo, constituído pela membrana citoplasmática, pelo periplasma e pela membrana externa (DJIHANE et al., 2016). A maior resistência das bactérias Gram-negativas pode ser atribuída à presença de lipopolissacarídeos na parede celular (BEZIĆ et al., 2003). Os cátions divalentes e a parte polissacarídica dos lipopolissacarídeos na membrana celular externa das bactérias Gram-negativas possuem qualidades hidrofílicas que impedem o contato dos constituintes hidrofóbicos com a célula bacteriana, resultando em maior resistência das bactérias Gram-negativas às propriedades antibacterianas dos compostos (EHSANI et al., 2017).

Assim, os resultados obtidos para a caracterização antibacteriana demonstram que os compostos obtidos a partir da rota proposta neste trabalho são capazes de inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo potenciais candidatos para utilização como aditivos antibacterianos em aplicações futuras nas mais diversas áreas.

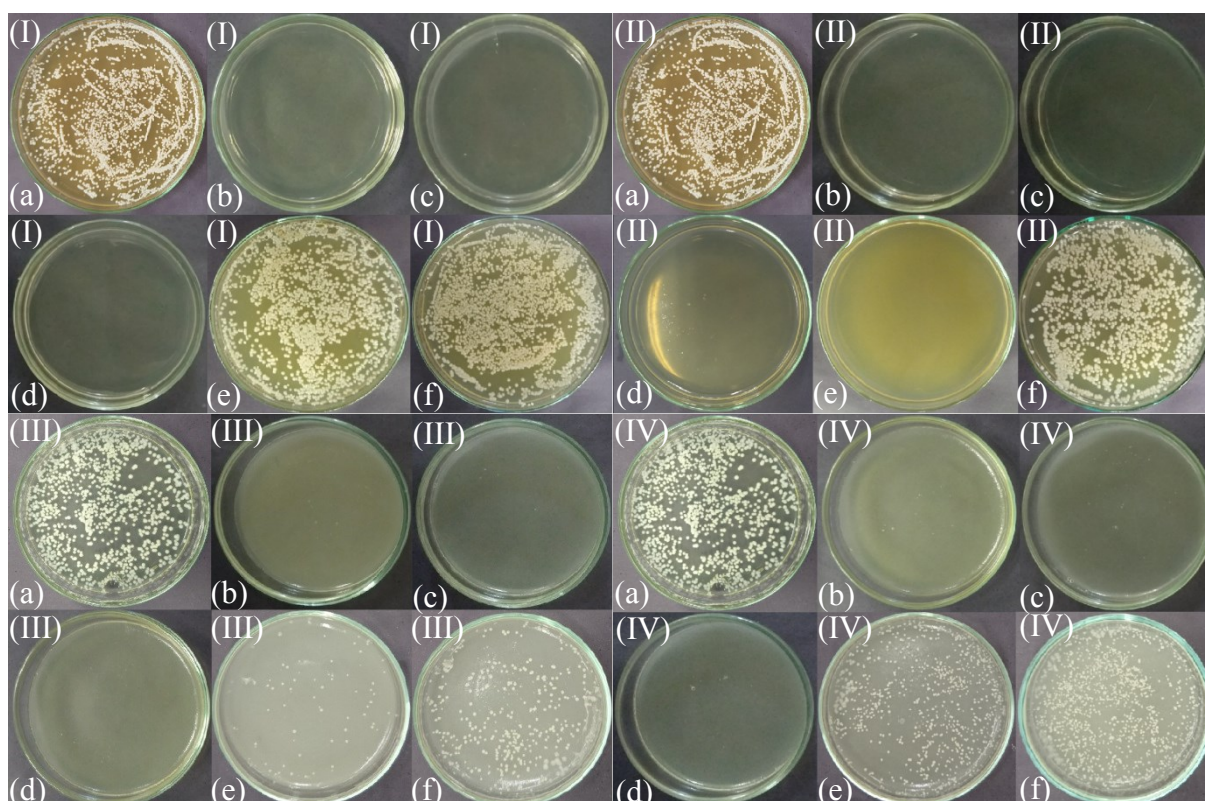
5.4.4 Avaliação da ação antifúngica

Para avaliar se os compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos pela rota proposta neste trabalho possuem ação antifúngica, a caracterização microbiológica frente a três diferentes fungos foi realizada. Para efeito comparativo, a atividade antifúngica dos álcoois precursores, geraniol e nerol, também foi avaliada. As caracterizações antifúngicas foram realizadas com ensaios de diluição em ágar. Os resultados obtidos nesses testes estão apresentados no item a seguir.

5.4.4.1 Ensaio de diluição em ágar

A atividade antifúngica dos compostos contra os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e contra a levedura *Candida albicans* foi determinada pela técnica de diluição em ágar com a concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹. Os resultados obtidos para as imagens das placas estão apresentados na Figura 30 para *C. albicans*, na Figura 31 para *A. flavus*, na Figura 32 para *A. niger* e os valores de CIM correspondentes na Tabela 10.

Figura 30 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans* (24 h) em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) 1,00 µg·mL⁻¹, (c) 0,50 µg·mL⁻¹, (d) 0,25 µg·mL⁻¹, (e) 0,12 µg·mL⁻¹ e (f) 0,06 µg·mL⁻¹, (III) acetato de geranila e (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) 125,0 µg·mL⁻¹, (c) 100,0 µg·mL⁻¹, (d) 75,0 µg·mL⁻¹, (e) 62,5 µg·mL⁻¹ e (f) 50,0 µg·mL⁻¹.



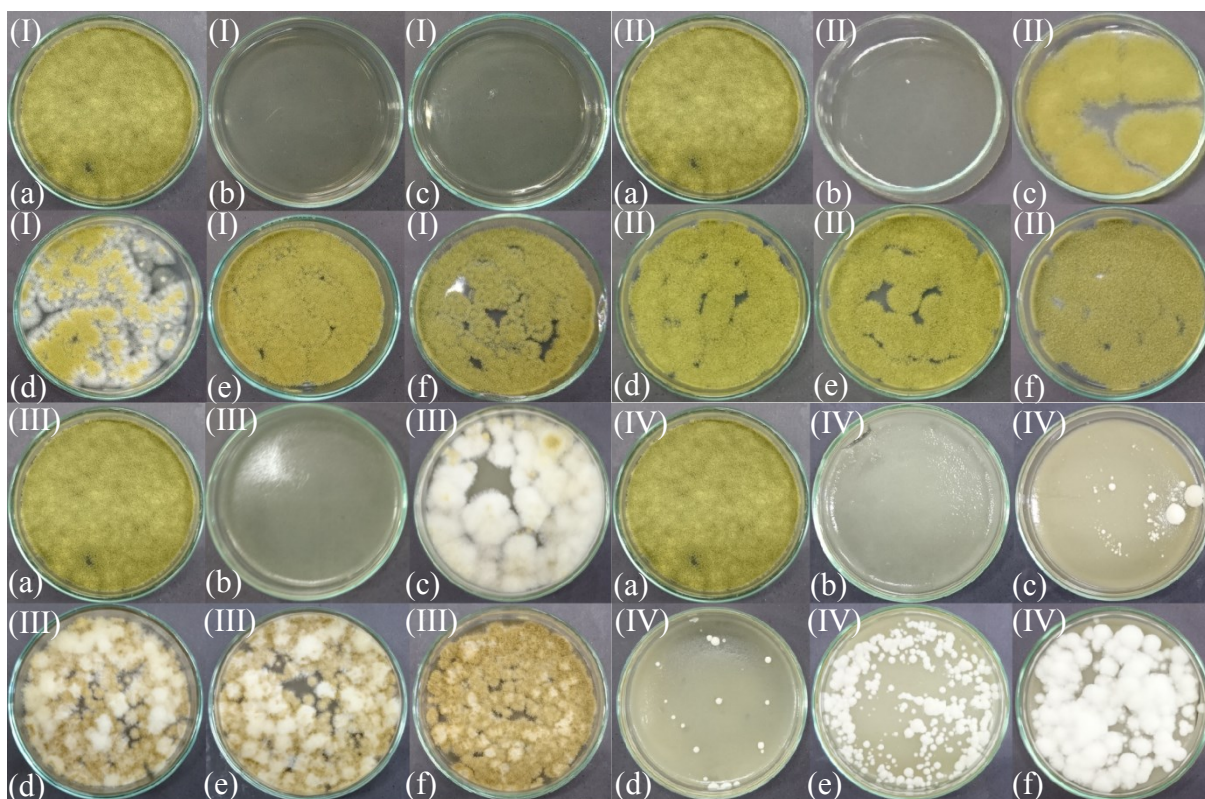
Fonte: a autora (2021).

O acetato de geranila mostrou atividade antifúngica mais forte do que o acetato de nerila para os três micro-organismos, mas ambos os compostos mostraram ação antifúngica mais fraca do que seus reagentes precursores, geraniol e nerol, respectivamente. A concentração inibitória mínima para acetato de nerila foi maior do que para acetato de

geranila, exceto com *C. albicans*, em que ambos os compostos apresentaram a mesma CIM (Tabela 10).

Na concentração inibitória mínima de $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *C. albicans*, o acetato de geranila e o acetato de nerila apresentaram inibição completa, indicando que, nesta concentração, os compostos têm ação fungicida (Figura 30), enquanto na concentração de $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a inibição foi parcial e maior para o acetato de geranila. O geraniol mostrou inibição completa (ação fungicida) contra *C. albicans* a uma concentração de $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e nerol a $0,12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 30, Tabela 10).

Figura 31 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra o fungo *A. flavus* em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (III) acetato de geranila para (a) amostra controle, (b) $125,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $75,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $25,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) $400,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $375,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $350,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $325,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $300,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

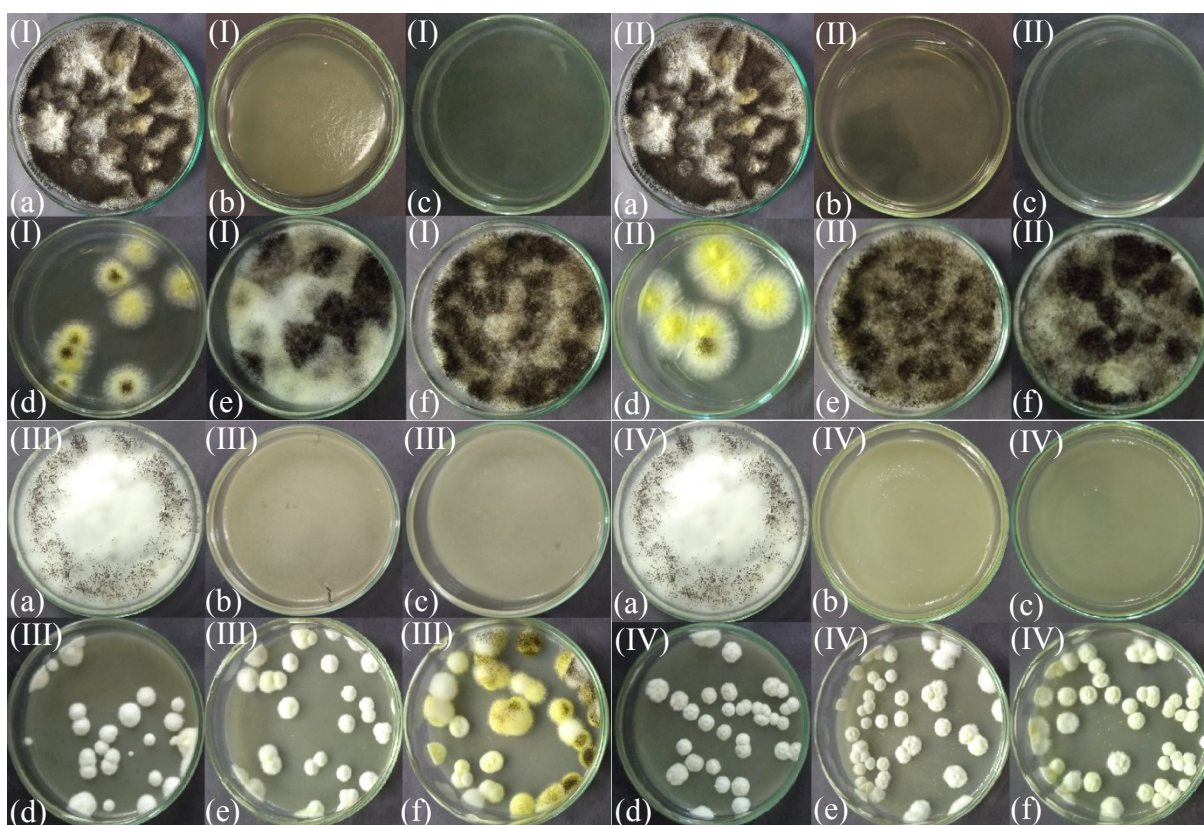


Fonte: a autora (2021).

Contra *A. flavus*, os compostos mostraram inibição completa correspondente à ação fungicida em concentrações de $125,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de geranila, $400,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para

acetato de nerila, $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para geraniol e $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para nerol (Figura 31, Tabela 10). Além disso, também é possível observar inibição parcial quando comparada às amostras controle nas concentrações de $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de geranila, $375,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de nerila, $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para geraniol e $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o nerol (Figura 31, Tabela 10), a partir do qual o crescimento do fungo aumentou com a diminuição da concentração dos compostos.

Figura 32 – Diluição em ágar para a atividade antifúngica contra o fungo *A. niger* em diferentes concentrações de (I) geraniol e (II) nerol para (a) amostra controle, (b) $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (III) acetato de geranila para (a) amostra controle, (b) $250,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $200,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $150,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (IV) acetato de nerila para (a) amostra controle, (b) $350,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) $300,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (d) $250,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) $200,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (f) $150,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Fonte: a autora (2021).

Comportamento semelhante ao do *A. flavus* pode ser observado contra *A. niger* (Figura 32, Tabela 10), onde a inibição completa (ação fungicida) ocorreu em concentrações de $200,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de geranila, $300,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de nerila e $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para

geraniol e nerol, enquanto a inibição parcial ocorreu nas concentrações de 150,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de geranila, 250,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para acetato de nerila e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para geraniol e nerol. Segundo Mihai e Popa (2015), a inibição do crescimento pode ser influenciada pela concentração de terpeno, o que justifica os resultados obtidos.

Tabela 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, acetato de geranila, nerol e acetato de nerila obtida pela técnica da diluição frente à levedura *C. albicans* e aos fungos *A. flavus* e *A. niger*.

Micro-organismo	Concentração inibitória mínima [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]			
	Geraniol	Acetato de geranila	Nerol	Acetato de nerila
<i>C. albicans</i>	0,25	75,0	0,12	75,0
<i>A. flavus</i>	4,0	125,0	8,0	400,0
<i>A. niger</i>	4,0	200,0	4,0	300,0

Fonte: a autora (2021).

A ação antimicrobiana frente aos fungos avaliados também foi encontrada por outros autores para óleos contendo como compostos majoritários o acetato de geranila (BEZÍĆ et al. 2003; MAXIA et al., 2009; ZORE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012;), o acetato de nerila (DEHGHAN et al., 2007; JULIANO et al.; 2018), o geraniol (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014; MARTINS; SOUZA, 2015; PEREIRA; LIMA, 2017) e o nerol (JIROVETZ et al., 2007; TIAN et al., 2013; WANG et al., 2015).

Dehghan et al. (2007) investigaram a ação antifúngica de óleos essenciais obtidos do caule/folhas e flores/frutos de *Ferula szovitsiana* (*Umbelliferae*) que apresentaram acetato de nerila como composto majoritário (33,0% e 41,5%, respectivamente) contra *A. niger* e *C. albicans* e os resultados mostraram que o valor de CIM foi maior que 20 $\text{mg}\cdot\text{disco}^{-1}$. Maxia et al. (2009) investigaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Daucus carota* L. com predomínio de acetato de geranila (até 65% da composição) contra diferentes micro-organismos, incluindo cepas de *Candida* e *Aspergillus*. Os óleos demonstraram ação antifúngica com valores de CIM entre 5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente 4,579 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 18,315 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *C. albicans*, entre 1,25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente 1,145 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 9,158 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *A. niger* e acima de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente 18,315 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *A. flavus*. Além disso, para ambos os fungos, a ação

fungicida ocorreu em concentrações superiores a $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo (aproximadamente $18,315 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Zore et al. (2010) demonstraram que o óleo essencial de gerânio e seus principais constituintes isolados apresentam excelente atividade contra *C. albicans*. Os valores de CIM (com ação fungicida) para geraniol e acetato de geranila foram $561 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $584 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Gonçalves et al. (2012) investigaram a ação antifúngica do óleo essencial *Thapsia minor* com composição majoritária de acetato de geranila (83%) e o éster isolado e observaram atividade contra diferentes cepas de *Candida* e *Aspergillus*. O óleo apresentou valores de CIM de $10 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($9,158 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *C. albicans*, $5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente $4,579 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *A. niger* e maiores que $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente $18,315 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *A. flavus*, enquanto o acetato de geranila isolado apresentou valores de CIM acima de $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente $18,315 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para os três fungos. Além disso, a ação fungicida foi observada para o óleo e para o éster com ambos os micro-organismos em concentrações acima de $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aproximadamente $18,315 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Miron et al. (2014) mostraram que uma concentração superior a $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,145 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para nerol e $0,144 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para geraniol) é necessária para inibir *C. albicans*.

Mihai e Popa (2015) avaliaram a concentração inibitória e fungicida mínima para nerol contra os fungos *A. niger* e *A. flavus* e encontraram resultados (para CIM e CFM) de $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,34 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) e $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,23 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), respectivamente. Wang et al. (2015) demonstraram que o nerol possui atividade antifúngica contra *A. niger*, sendo que o crescimento micelial e a germinação de esporos de *A. niger* foram reduzidos com o aumento da concentração de nerol. Além disso, o crescimento também foi reduzido com o aumento do tempo de incubação. İşcan (2017) investigou a ação antifúngica do geraniol, nerol e acetato de geranila contra *C. albicans*, com valores de CIM de $0,06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Juliano et al. (2018) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo de *Helichrysum microphyllum* subsp. *tyrrhenicum* com acetato de nerila como composto majoritário (33,6%) contra *C. albicans* e os resultados mostraram valores de CIM de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e concentração fungicida mínima de $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Khayyat e Sameeh (2018) realizaram estudos antifúngicos com acetato de geranila e verificaram atividade contra *Candida tropicalis* com zona de inibição de 13,1 mm na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As diferenças nos valores de CIM podem estar relacionadas aos mesmos fatores já discutidos na Seção 5.2.3, como as diferenças na suscetibilidade dos micro-organismos

associadas às cepas utilizadas, à concentração de células fúngicas, às adaptações metodológicas, às concentrações de cada composto testadas nos diferentes estudos, ao grau de pureza dos compostos e, conseqüentemente, às interações entre os componentes.

O mecanismo de ação antifúngica dos monoterpenos oxigenados é semelhante ao mecanismo antibacteriano explicado na Seção 5.2.3.2. Geralmente, o mecanismo está associado a danos à membrana ou ruptura de sua integridade, aumentando a permeabilidade, inibição da síntese de ergosterol ou ligação com o ergosterol na membrana e produção de ROS por ação nas mitocôndrias (İŞCAN, 2017; FREIRES et al., 2014; CHEN et al., 2013; RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013; AHMAD et al., 2011). A exposição aos compostos antimicrobianos pode levar à coagulação de componentes celulares devido a danos irreversíveis à membrana celular (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). Os compostos têm a capacidade de penetrar e romper a parede celular fúngica e as membranas citoplasmáticas, resultando na desintegração das membranas mitocondriais, que é causada por mudanças no fluxo de elétrons na via do sistema de transporte de elétrons (ETS) (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). Eles também podem interromper a despolarização das membranas mitocondriais, afetando os canais de íons, especialmente íons Ca^{2+} , bombas de prótons e *pools* de ATP, diminuindo o potencial de membrana (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; YOON et al., 2000). Este processo também pode danificar o conteúdo de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos das células (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; ARNAL-SCHNEBELEN et al., 2004). A permeabilização das membranas mitocondriais interna e externa pode resultar em apoptose ou necrose celular levando à morte celular, pois a mudança na fluidez da membrana pode causar vazamento de eletrólitos e impedir as vias do citocromo C, metabolismo de proteínas e concentrações de íons de cálcio (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; YOON et al., 2000).

Em células de levedura, os compostos interrompem a produção de ATP e levam a danos na membrana celular (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014). O mecanismo de atividade anti-*Candida* do geraniol e do acetato de geranila parece estar associado a danos à integridade da membrana celular (ZORE et al., 2010). O geraniol é conhecido por sua atividade de fluidificação da membrana, que provoca um aumento na permeabilidade da membrana e despolariza a membrana através da interação direta e reversível com a membrana e/ou receptores, o que leva à formação de poros (ZORE et al., 2010).

Assim, os resultados obtidos para a caracterização antifúngica demonstram que os compostos obtidos a partir da rota proposta neste trabalho são capazes de inibir fungos e leveduras, sendo potenciais candidatos para utilização como aditivos antifúngicos em aplicações futuras para as mais diversas áreas.

5.4.5 Avaliação da toxicidade dos compostos

Para avaliar se os compostos acetato de geranila e nerila e seus álcoois precursores, geraniol e nerol, são considerados tóxicos ou atóxicos com vistas em aplicações futuras como aditivo antimicrobiano, a caracterização da toxicidade oral aguda e subaguda dos compostos em camundongos foi realizada usando as diretrizes da OCDE, que são mundialmente reconhecidas como padrões de referência para testar a toxicidade de estudos químicos (SCAPINELLO et al., 2019). A utilização de camundongos como modelos experimentais permite a identificação precoce de efeitos adversos tóxicos antes que as moléculas estudadas sejam consumidas por humanos (YADAV et al., 2019). Os resultados obtidos nesses testes estão apresentados nos itens a seguir.

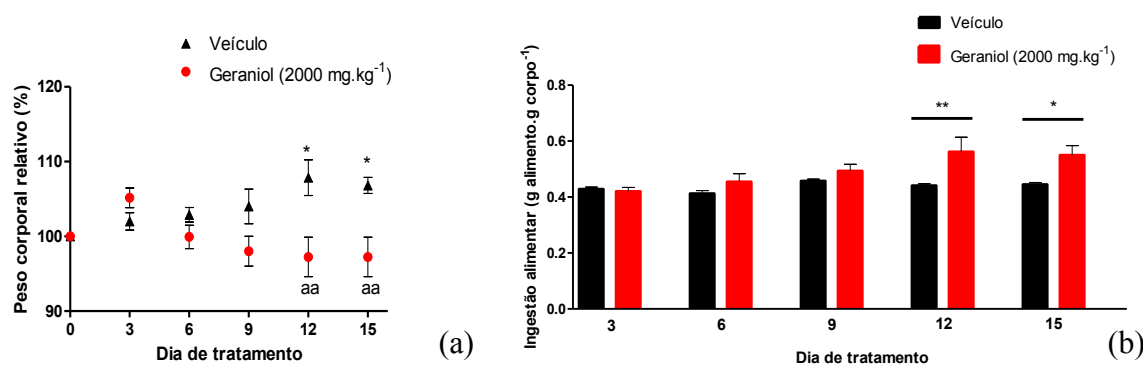
5.4.5.1 Toxicidade aguda

Para facilitar o entendimento do efeito de cada composto na avaliação da toxicidade aguda em camundongos, esta seção está apresentada de forma separada para cada composto e, ao final dela, é realizado o comparativo entre os compostos e a discussão dos resultados.

5.4.5.1.1 Geraniol

A observação dos comportamentos macroscópicos anormais dos camundongos ao longo dos dias de tratamento foi realizada para acompanhamento dos sinais de toxicidade. Durante o primeiro dia de experimento, uma morte por grupo tratado com geraniol (2000 mg·kg⁻¹) foi registrada, 8 h após a administração oral de geraniol. Sinais de toxicidade, como piloereção, paralisia da pata traseira, letargia e sedação extrema foram registrados 1 h após o tratamento. Após 10 dias de administração, ptose palpebral foi observada em um animal tratado com geraniol. Os resultados para o efeito do tratamento com geraniol no peso corporal relativo e na ingestão alimentar dos camundongos estão apresentados na Figura 33.

Figura 33 – Efeito do tratamento agudo com geraniol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.



(a) Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 0) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$): * para $p < 0,05$. As letras representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento: aa para $p < 0,01$.

(b) Os símbolos representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento: * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$.

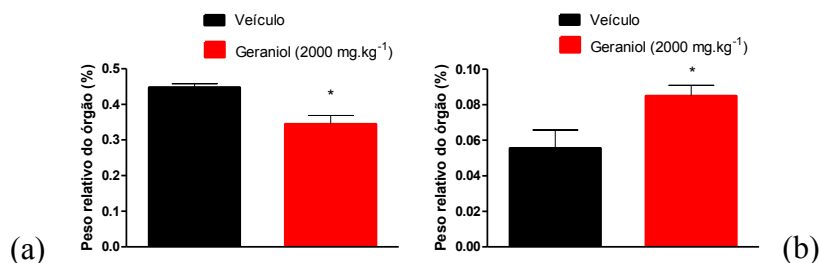
Fonte: a autora (2021).

O peso corporal relativo (Figura 33a) de camundongos tratados com geraniol foi significativamente ($p < 0,01$) diminuído no 12.º e 15.º dias de experimento em comparação com o grupo tratado com veículo. O peso corporal do grupo tratado com veículo aumentou significativamente ($p < 0,05$) no 12.º e 15.º dias de experimento em relação à primeira medida (dia 0). Além disso, o geraniol induziu um aumento significativo na ingestão de alimentos dos animais (Figura 33b) no 12.º ($p < 0,01$) e 15.º ($p < 0,05$) dias experimentais em relação ao grupo tratado com veículo.

Em relação ao peso relativo dos órgãos, houve alterações no baço e nas glândulas suprarrenais, cujos resultados estão apresentados na Figura 34.

O peso relativo do baço (Figura 34a) de camundongos tratados com geraniol foi significativamente ($p < 0,05$) diminuído em comparação com o do grupo tratado com veículo, enquanto o peso relativo das glândulas suprarrenais (Figura 34b) aumentou significativamente ($p < 0,05$).

Figura 34 – Efeito do tratamento agudo com geraniol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado pelo teste t não pareado para (a) baço e (b) glândulas suprarrenais.



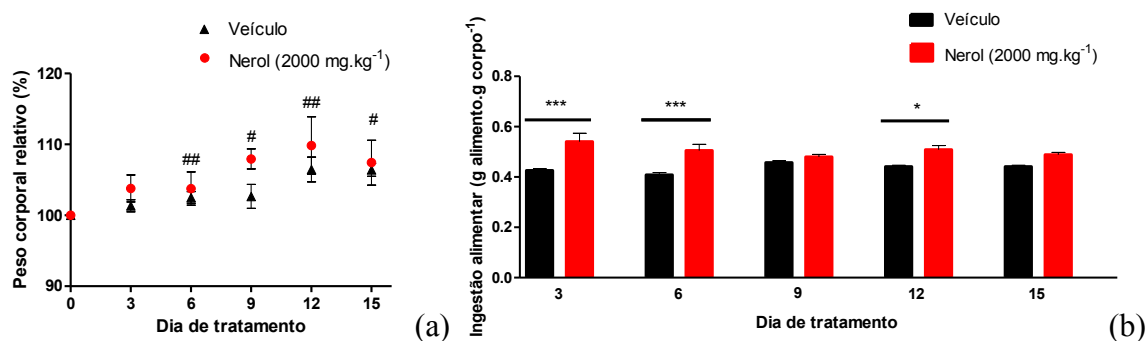
O símbolo representa diferença em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$): * para $p < 0,05$.

Fonte: a autora (2021).

5.4.5.1.2 Nerol

Em relação aos comportamentos macroscópicos anormais observados, camundongos fêmeas tratados com nerol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) apresentaram sinais de toxicidade, como piloereção, contorções abdominais, paralisia da pata traseira, letargia e sedação, no primeiro dia do teste. Nenhuma morte ocorreu durante o experimento. Os resultados para o efeito do tratamento com nerol no peso corporal relativo e na ingestão alimentar dos camundongos estão apresentados na Figura 35.

Figura 35 – Efeito do tratamento agudo com nerol ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.



(a) Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 0) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com nerol: # para $p < 0,05$ e ## para $p < 0,01$.

(b) Os símbolos representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento: * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

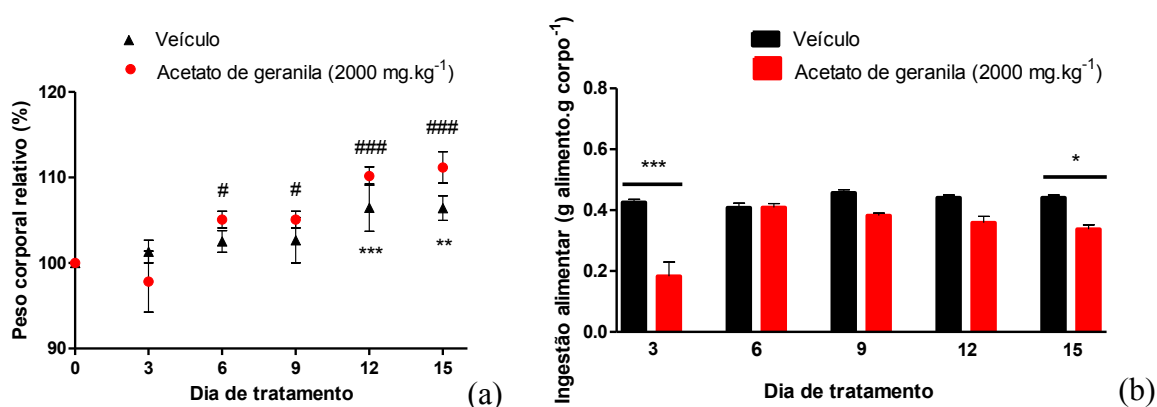
Fonte: a autora (2021).

O peso corporal dos camundongos (Figura 35a) não foi afetado pelo tratamento agudo com nerol quando comparado com o grupo tratado com veículo. Foi observado um aumento significativo no peso corporal dos camundongos tratados com nerol no 6.º ($p < 0,01$), 9.º ($p < 0,05$), 12.º ($p < 0,01$) e 15.º ($p < 0,05$) dias de experimento em comparação com o peso inicial (dia 0) dos animais. O consumo de alimentos (Figura 35b) em camundongos tratados com nerol aumentou significativamente no 3.º ($p < 0,001$), 6.º ($p < 0,001$) e 12.º ($p < 0,05$) dias de experimento em comparação com o grupo tratado com veículo. Nenhum órgão apresentou sinais de toxicidade induzida pelo nerol.

5.4.5.1.3 Acetato de geranila

A administração aguda de acetato de geranila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) desencadeou uma morte de camundongo após 48 h de tratamento nas duas etapas (1 morte/etapa) do experimento. Alguns sinais de toxicidade foram registrados, como piloereção, aumento da frequência respiratória, ptose palpebral, secreção brônquica e sedação. Os resultados para o efeito do tratamento com acetato de geranila no peso corporal relativo e na ingestão alimentar dos camundongos estão apresentados na Figura 36.

Figura 36 – Efeito do tratamento agudo com acetato de geranila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.



(a) Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 0) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$): ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de geranila: # para $p < 0,05$ e ### para $p < 0,001$.

(b) Os símbolos representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento: * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

Fonte: a autora (2021).

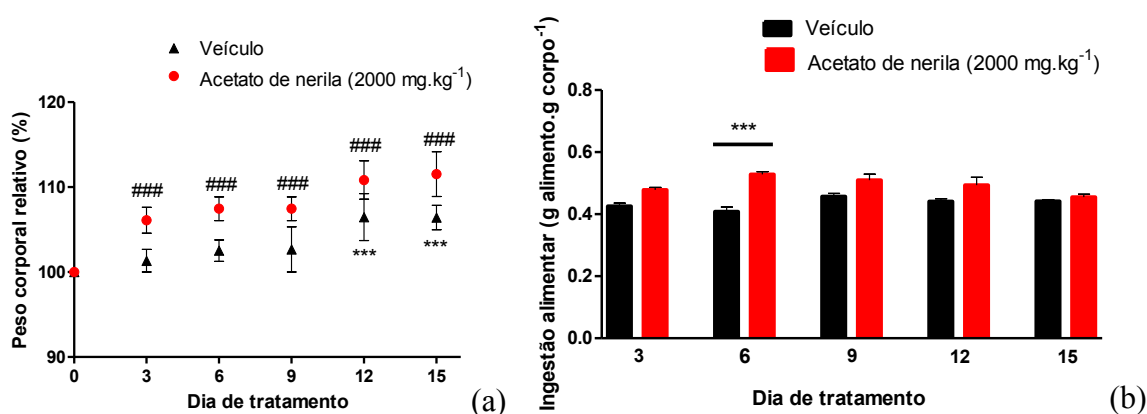
O peso corporal relativo do grupo tratado com acetato de geranila do 6.º ($p < 0,05$) dia até o 15.º dia ($p < 0,001$) de observação (Figura 36a) foi significativamente maior quando comparado ao 1.º dia de tratamento, enquanto o peso corporal do grupo tratado com veículo aumentou significativamente no 12.º ($p < 0,001$) e 15.º ($p < 0,01$) dias de experimento em relação à primeira medida (dia 0).

A ingestão alimentar foi significativamente diminuída pelo acetato de geranila quando comparada ao grupo veículo no 3.º ($p < 0,001$) e 15.º ($p < 0,05$) dias após a administração (Figura 36b). Não houve alterações nos órgãos dos animais tratados com acetato de geranila.

5.4.5.1.4 Acetato de nerila

Os camundongos tratados de forma aguda com acetato de nerila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, via oral.) apresentaram alguns sinais de toxicidade durante 4 h após a administração, como piloereção e aumento da frequência respiratória. Além disso, os animais apresentaram sedação intensa por 40 min após o tratamento. Não houve ocorrência de mortes. Os resultados para o efeito do tratamento com acetato de nerila no peso corporal relativo e na ingestão alimentar dos camundongos estão apresentados na Figura 37.

Figura 37 – Efeito do tratamento agudo com acetato de nerila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) peso corporal relativo e (b) ingestão alimentar.



(a) Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 0) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$): *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila: ### para $p < 0,001$.

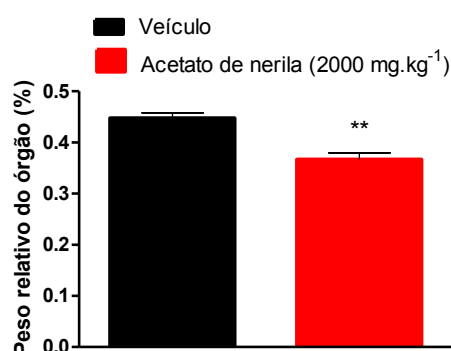
(b) Os símbolos representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento: *** para $p < 0,001$.

Fonte: a autora (2021).

Não houve mudanças significativas no peso corporal relativo dos animais tratados com acetato de nerila quando comparados ao grupo tratado com veículo (Figura 37a). Porém, um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação à primeira medida (dia 0) foi observado no mesmo grupo de tratamento com acetato de nerila do 3.º ao 15.º dias e no grupo tratado com veículo no 12.º e 15.º dias. O grupo que recebeu administração de acetato de nerila apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) na ingestão alimentar no 6.º dia após a administração em relação ao grupo tratado com veículo (Figura 37b).

Em relação ao peso relativo dos órgãos, houve alterações apenas no baço, cujos resultados estão apresentados na Figura 38. Uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no peso relativo do baço foi observada no grupo tratado com acetato de nerila (Figura 38).

Figura 38 – Efeito do tratamento agudo com acetato de nerila ($2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo do baço em camundongos fêmeas ($n = 3 - 6$ camundongos/grupo) avaliado pelo teste t não pareado.



O símbolo representa diferença em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$): ** para $p < 0,01$.

Fonte: a autora (2021).

5.4.5.1.5 Comparativo dos efeitos de toxicidade aguda dos compostos

O estudo de toxicidade aguda oral (OECD, 2001) revelou que o nerol a $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou a ingestão alimentar dos camundongos e, conseqüentemente, o peso corporal relativo, mas não causou a morte dos camundongos nem toxicidade para nenhum órgão analisado. Por outro lado, a administração oral de geraniol na mesma dose induziu alterações no peso relativo das suprarrenais e do baço. Sabe-se que a sedação causada pelos dois álcoois e a ptose palpebral observada em animais tratados com geraniol está relacionada ao efeito depressor do sistema nervoso central de plantas do gênero *Cymbopogon* (SILVA et al., 2010). Esses efeitos foram observados em estudos de toxicidade aguda realizados em roedores com

plantas que apresentam esses mesmos componentes (LEITE et al., 2011; MEDEIROS et al., 2018) e outras espécies do gênero *Cymbopogon*. Além disso, no caso do geraniol, houve aumento na ingestão alimentar e diminuição no ganho de peso, o que pode ser um sinal de disfunção metabólica (HILALY et al., 2004; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002; TOFOVIC; JACKSON, 1999), e uma morte. Esses fatores podem ter ocasionado alterações no sistema imunológico dos animais, resultando nas alterações do peso relativo das suprarrenais e do baço. Assim, geraniol e nerol podem ser classificados na Categoria de perigo 5 do Sistema de Classificação Global Harmonizado (GHS), de acordo com a diretriz n.º 423 da OCDE (2001). Isso significa que seu LD₅₀ (dose aguda letal) está entre 2000 mg·kg⁻¹ e 5000 mg·kg⁻¹. A categoria 5 é destinada a produtos químicos que apresentam baixa toxicidade aguda, mas apresentam perigo para populações vulneráveis em determinadas circunstâncias (OECD, 2001).

Em relação aos ésteres derivados, o estudo de toxicidade aguda oral do acetato de geranila a 2000 mg·kg⁻¹ mostrou que esse composto diminuiu a ingestão alimentar de camundongos no 3.º dia de experimento, o que pode estar relacionado à sedação causada pela molécula. Por outro lado, o acetato de nerila, na mesma dose, causou um aumento na ingestão alimentar de camundongos no 6.º dia após a administração. As mudanças na ingestão de alimentos provocadas por ambos os compostos não foram suficientes para afetar o ganho de peso dos animais no estudo de toxicidade aguda. Além disso, o acetato de nerila induziu uma redução no peso relativo do baço de camundongos, o que pode estar relacionado com alterações no sistema imunológico. Cabe ressaltar que o tratamento agudo com acetato de geranila induziu a morte de um camundongo, ao contrário do acetato de nerila. De acordo com o Sistema de Classificação Global Harmonizado (GHS), ambas as substâncias também podem ser incluídas na Categoria 5 (têm baixa toxicidade aguda, mas podem representar um perigo para populações vulneráveis em algumas circunstâncias) e seu LD₅₀ (dose aguda letal) está entre 2000 mg·kg⁻¹ e 5000 mg·kg⁻¹ (OECD, 2001), assim como seus precursores.

Os resultados para o LD₅₀ estão de acordo com os estudos reportados na literatura por Jenner et al. (1964), Opdyke (1976) e *National Toxicology Program* (1976) para nerol, geraniol e acetato de nerila. Para o acetato de geranila, o valor encontrado neste trabalho está abaixo do reportado por Jenner et al. (1964) e por *National Toxicology Program* (1976), correspondente a 6330 mg·kg⁻¹, o que pode ter ocorrido devido à diferença no grau de pureza dos compostos visto que, nos estudos citados, o acetato de geranila encontra-se numa mistura

de compostos com 60% a 65% da composição, enquanto que, no presente trabalho, o grau de pureza obtido foi de 95,80%.

5.4.5.2 Toxicidade subaguda

Para facilitar o entendimento do efeito de cada composto na avaliação da toxicidade subaguda em camundongos, esta seção está apresentada de forma separada para cada composto e, ao final dela, é realizado o comparativo entre os compostos e a discussão dos resultados. Para cada composto, a avaliação foi realizada em termos de alterações no peso corporal relativo, na ingestão alimentar, nos parâmetros hematológicos, nos parâmetros bioquímicos e no peso relativo dos órgãos.

No estudo de administração repetida, camundongos fêmeas e machos foram usados, conforme recomendado pela diretriz n.º 407 da OCDE (2008), pois permite demonstrar a diferença de sensibilidade entre as funções metabólicas e outros parâmetros em ambos os sexos em estudos toxicológicos, além de fornecer dados sobre efeitos tóxicos persistentes ou cumulativos em órgãos-alvo, relações dose-resposta e também sobre o nível de efeito adverso não observado (NOAEL) (OECD, 2008).

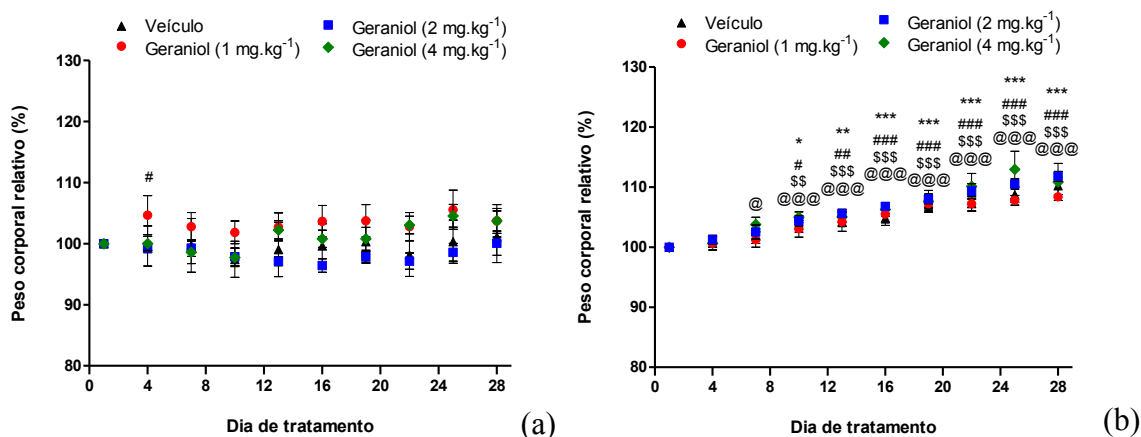
5.4.5.2.1 Geraniol

– Peso corporal relativo

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol no peso corporal relativo de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 39.

O peso corporal relativo de camundongos fêmeas (Figura 39a) não foi afetado pelo tratamento com geraniol. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso corporal relativo de camundongos fêmeas tratados com geraniol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em relação à primeira medida (dia 1) apenas no 4.º dia. As diferentes doses de geraniol não afetaram o ganho de peso corporal dos camundongos machos (Figura 39a). Todos os grupos, incluindo o grupo tratado com veículo, apresentaram aumento significativo no peso corporal relativo do 10.º ao 28.º dia de tratamento em relação à primeira (dia 1) aferição do peso corporal. Apenas no 7.º dia houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso corporal relativo de camundongos machos tratados com geraniol a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em relação à primeira medida (dia 1) não observado nos demais grupos.

Figura 39 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 1) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol 2 mg·kg⁻¹: \$ para $p < 0,01$ e \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol 4 mg·kg⁻¹: @ para $p < 0,05$ e @@@ para $p < 0,001$.
Fonte: a autora (2021).

– Ingestão alimentar

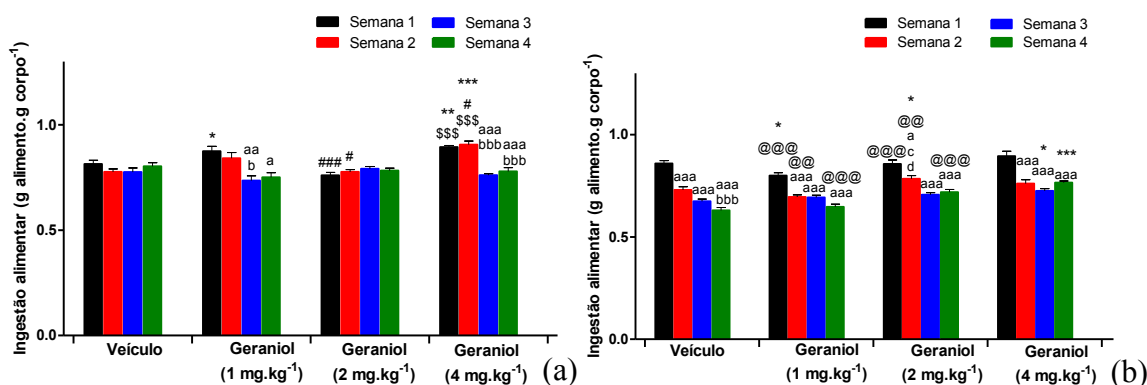
Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol na ingestão alimentar de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 40.

A ingestão de alimentos de camundongos fêmeas (Figura 40a) foi afetada pelo tratamento com geraniol (1 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹). Na 1.^a semana, a ingestão alimentar do grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹ aumentou significativamente ($p < 0,05$) em comparação com o grupo com veículo na mesma semana de tratamento. Camundongos fêmeas que receberam geraniol a 1 mg·kg⁻¹ apresentaram redução significativa no consumo alimentar em relação à 1.^a ($p < 0,01$) e 2.^a semanas ($p < 0,05$) do mesmo grupo de tratamento na 3.^a semana. Na semana 4, no mesmo grupo de tratamento, uma diminuição significativa ($p < 0,01$) também foi observada na ingestão alimentar em relação à 1.^a semana.

Camundongos fêmeas tratados com geraniol 2 mg·kg⁻¹ apresentaram diminuição significativa na ingestão alimentar na 1.^a ($p < 0,001$) e 2.^a semanas ($p < 0,05$) de tratamento quando comparados ao grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹ na mesma semana de tratamento. Camundongos fêmeas tratados com geraniol a 4 mg·kg⁻¹ apresentaram ingestão alimentar significativamente maior na 1.^a semana ($p < 0,01$ comparado ao grupo tratado com veículo e $p < 0,001$ comparado ao grupo tratado com 2 mg·kg⁻¹ de geraniol) e 2.^a semanas (p

< 0,05 comparado ao grupo tratado com geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p < 0,001$ comparado aos grupos tratados com veículo e grupos tratados com geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). A ingestão alimentar de camundongos fêmeas tratados com geraniol a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ diminuiu significativamente na 3.^a ($p < 0,001$) e 4.^a ($p < 0,001$) semanas em relação a 1.^a e 2.^a semanas no mesmo grupo de tratamento.

Figura 40 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) na ingestão avaliada por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças na mesma semana de tratamento em relação aos grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: @@ para $p < 0,01$ e @@@ para $p < 0,001$.

As letras representam diferenças no mesmo grupo de tratamento em relação às semanas. Semana 1: a para $p < 0,05$, aa para $p < 0,01$ e aaa para $p < 0,001$. Semana 2: b para $p < 0,05$ e bbb para $p < 0,001$. Semana 3: c para $p < 0,05$. Semana 4: d para $p < 0,05$.

Fonte: a autora (2021).

Camundongos machos tratados com geraniol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na ingestão de alimentos (Figura 40b) na 1.^a semana quando comparados ao grupo veículo na mesma semana de tratamento. O consumo alimentar do grupo tratado com geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) na 2.^a semana quando comparado ao grupo tratado com veículo na mesma semana de tratamento. O grupo tratado com geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentou aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) na ingestão alimentar na 3.^a e 4.^a semanas de tratamento em relação ao grupo veículo nas mesmas semanas. Observou-se, também, que os grupos tratados com geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ diminuem a ingestão alimentar ($p < 0,001$) na 1.^a e 4.^a semanas em relação ao grupo tratado com geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nas mesmas semanas. A ingestão alimentar de camundongos machos

tratados com geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na 2.^a semana de tratamento foi significativamente ($p < 0,01$) diminuída e a ingestão alimentar de camundongos tratados com geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo tratado com geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na mesma semana de tratamento. Na 4.^a semana de tratamento, o grupo tratado com veículo mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na ingestão de alimentos em comparação com a 1.^a e 2.^a semanas de tratamento, enquanto o consumo alimentar no grupo tratado com geraniol a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi significativamente ($p < 0,05$) maior na 2.^a semana em relação às semanas seguintes de tratamento. Por fim, todos os camundongos machos dos grupos tratados com geraniol, bem como o grupo tratado com veículo, apresentaram uma diminuição significativa no consumo de alimentos da 2.^a ($p < 0,05$) até a 4.^a ($p < 0,001$) semana de tratamento quando comparado com a 1.^a semana.

– Parâmetros hematológicos

Os resultados para o hemograma dos camundongos machos tratados com geraniol estão apresentados na Tabela 11 e dos camundongos fêmeas na Tabela 12.

O hemograma de camundongos machos tratados com geraniol (Tabela 11) revelou uma diminuição significativa nos índices de hemoglobina (Hb) e índices hematimétricos (MCH, MCHC e RDW) desencadeados pelo tratamento com geraniol em relação ao grupo tratado com veículo. Os níveis de hemoglobina (Hb) diminuíram significativamente em camundongos tratados com geraniol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,05$), $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo tratado com veículo. Além disso, camundongos tratados com geraniol a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram níveis de Hb significativamente ($p < 0,05$) mais baixos do que os tratados com geraniol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. A hemoglobina celular média (MCH) diminuiu significativamente nos grupos de camundongos tratados com geraniol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,01$), $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo tratado com veículo. O MCH diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em camundongos tratados com geraniol a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em relação ao grupo tratado com geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Camundongos machos tratados com geraniol a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram uma diminuição significativa na concentração de hemoglobina corpuscular celular média (MCHC) ($p < 0,001$) e na largura de distribuição de células vermelhas (RDW) ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo tratado com veículo.

Tabela 11 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Geraniol 1 mg·kg ⁻¹	Geraniol 2 mg·kg ⁻¹	Geraniol 4 mg·kg ⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	13,88 ± 0,50	11,02 ± 0,92*	8,6 ± 0,31***#	8,3 ± 0,24***#
HCT (%)	45,26 ± 2,68	45,64 ± 1,93	49,02 ± 0,99	47,12 ± 3,39
MCV (µm ³)	50,0 ± 2,78	50,0 ± 1,23	53,40 ± 0,68	52,0 ± 1,10
MCH (pg)	15,32 ± 0,15	12,02 ± 1,00**	9,38 ± 0,23***#	9,30 ± 0,40***#
MCHC (g·dL ⁻¹)	30,92 ± 1,44	24,50 ± 2,73	17,54 ± 0,41***	17,90 ± 1,66***
RDW (%)	17,12 ± 0,32	14,92 ± 0,85	13,00 ± 0,20***	13,68 ± 0,58**
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	518,5 ± 67,79	583,3 ± 153,4	508,4 ± 23,97	562,4 ± 142,5
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	8,52 ± 0,68	7,60 ± 0,30	8,17 ± 0,17	7,84 ± 0,56
Reticulócitos (%)	10,77 ± 0,13	11,77 ± 0,41	11,40 ± 0,44	10,53 ± 0,47
Neutrófilos	5,67 ± 0,88	8,33 ± 1,45	9,67 ± 0,88	8,67 ± 1,76
Linfócitos	94,33 ± 0,88	89,00 ± 1,53	88,25 ± 1,11	91,00 ± 2,08
Monócitos	0,0 ± 0,0	1,67 ± 0,88	0,0 ± 0,0	0,33 ± 0,33
Eosinófilos	0,0 ± 0,0	0,67 ± 0,33	0,75 ± 0,45	0,0 ± 0,0

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para p < 0,05, ** para p < 0,01 e para *** p < 0,001. Grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹: # para p < 0,05. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Para camundongos fêmeas tratados com geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) não foram detectadas diferenças em relação ao hemograma do grupo de veículo (Tabela 12). O número de neutrófilos (%) dos camundongos fêmeas tratados com a maior dose de geraniol foi significativamente (p < 0,05) menor quando comparado ao grupo tratado com 1 mg·kg⁻¹.

Tabela 12 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Geraniol 1 mg·kg ⁻¹	Geraniol 2 mg·kg ⁻¹	Geraniol 4 mg·kg ⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	8,13 ± 1,28	8,80 ± 0,44	9,84 ± 0,86	9,57 ± 1,37
HCT (%)	49,33 ± 5,69	48,40 ± 4,78	52,00 ± 1,17	47,20 ± 1,11
MCV (µm ³)	52,50 ± 1,19	51,33 ± 1,20	52,80 ± 1,24	52,00 ± 2,31
MCH (pg)	8,53 ± 0,51	9,30 ± 0,71	10,02 ± 0,76	10,40 ± 1,15
MCHC (g·dL ⁻¹)	16,20 ± 0,88	18,33 ± 1,84	19,02 ± 1,84	20,33 ± 3,12
RDW (%)	14,18 ± 0,73	13,77 ± 0,67	13,58 ± 0,95	15,30 ± 1,25
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	520,0 ± 340,0	339,0 ± 81,0	450,4 ± 113,4	316,0 ± 162,1
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	8,22 ± 0,95	7,97 ± 0,31	8,67 ± 0,20	7,86 ± 0,17
Reticulócitos (%)	12,73 ± 0,55	12,23 ± 0,64	12,30 ± 0,48	12,67 ± 0,82
Neutrófilos	10,00 ± 1,73	13,33 ± 1,20	8,00 ± 0,89	7,00 ± 0,0 [#]
Linfócitos	89,25 ± 1,89	85,00 ± 1,00	90,80 ± 1,28	91,67 ± 0,33
Monócitos	0,25 ± 0,25	1,67 ± 0,88	0,0 ± 0,0	0,67 ± 0,33
Eosinófilos	1,25 ± 0,63	0,0 ± 0,0	1,60 ± 0,24	0,67 ± 0,33

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹: # para p < 0,05. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).
Fonte: a autora (2021).

– Parâmetros bioquímicos

Os resultados para o biograma dos camundongos machos tratados com geraniol estão apresentados na Tabela 13 e dos camundongos fêmeas na Tabela 14.

A análise de variância unilateral revelou que camundongos machos e fêmeas tratados com geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) não apresentaram alterações nos parâmetros dos perfis glicídico, hepático e renal quando comparados ao grupo tratado com veículo. Os níveis de AST de camundongos machos (Tabela 13) aumentaram significativamente nos grupos tratados com geraniol 2 mg·kg⁻¹ (p < 0,05) e geraniol 4 mg·kg⁻¹ (p < 0,01) em comparação com o grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹.

Tabela 13 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹, via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Geraniol 1 mg·kg ⁻¹	Geraniol 2 mg·kg ⁻¹	Geraniol 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	279,3 ± 31,72	265,9 ± 9,25	324,0 ± 14,87	313,1 ± 8,66
COL (mg·dL ⁻¹)	144,0 ± 13,44	134,2 ± 9,75	154,6 ± 15,10	140,5 ± 14,47
TRI (mg·dL ⁻¹)	155,8 ± 18,62	158,4 ± 17,63	195,0 ± 35,62	118,8 ± 14,86
HDL (mg·dL ⁻¹)	44,40 ± 3,34	52,25 ± 3,95	40,75 ± 1,44	44,20 ± 4,15
LDL (mg·dL ⁻¹)	51,75 ± 16,80	36,80 ± 9,69	68,25 ± 13,40	59,25 ± 11,26
AST (U·L ⁻¹)	159,7 ± 10,53	134,0 ± 7,57	178,0 ± 3,79 [#]	194,0 ± 10,02 ^{##}
ALT (U·L ⁻¹)	59,67 ± 16,01	43,25 ± 11,29	84,00 ± 5,20	75,00 ± 19,20
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,43 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,02

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com geraniol 1 mg·kg⁻¹: # para p < 0,05 e ## para p < 0,01. Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Tabela 14 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Geraniol 1 mg·kg ⁻¹	Geraniol 2 mg·kg ⁻¹	Geraniol 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	214,5 ± 13,66	234,0 ± 15,65	255,3 ± 41,61	284,0 ± 32,53
COL (mg·dL ⁻¹)	101,5 ± 6,12	126,8 ± 1,03	112,8 ± 5,41	106,5 ± 9,77
TRI (mg·dL ⁻¹)	61,25 ± 7,86	101,3 ± 21,92	108,5 ± 17,29	111,8 ± 19,67
HDL (mg·dL ⁻¹)	61,00 ± 1,29	65,60 ± 1,03	60,80 ± 2,65	56,80 ± 4,12
LDL (mg·dL ⁻¹)	49,25 ± 10,18	54,25 ± 8,53	50,50 ± 7,89	41,00 ± 11,53
AST (U·L ⁻¹)	161,7 ± 8,37	79,33 ± 35,33	124,3 ± 33,61	204,0 ± 1,73
ALT (U·L ⁻¹)	44,67 ± 12,13	78,75 ± 11,85	80,50 ± 9,67	56,67 ± 15,88
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,50 ± 0,02	0,44 ± 0,06	0,53 ± 0,006	0,52 ± 0,006

Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

– Peso relativo dos órgãos

Os resultados para o peso relativo dos órgãos de camundongos machos tratados com geraniol estão apresentados na Tabela 15 e dos camundongos fêmeas na Tabela 16.

Tabela 15 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Cérebro (%)	$1,10 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,03$
Coração (%)	$0,37 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,01$
Timo (%)	$0,21 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$
Baço (%)	$0,25 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01^*$
Suprarrenais (%)	$0,03 \pm 0,005$	$0,03 \pm 0,005$	$0,03 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,002$
Rins (%)	$1,35 \pm 0,05$	$1,37 \pm 0,04$	$1,45 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,03$
Fígado (%)	$4,77 \pm 0,13$	$4,60 \pm 0,07$	$4,86 \pm 0,17$	$4,58 \pm 0,09$

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$.

Fonte: a autora (2021).

Tabela 16 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geraniol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Geraniol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Geraniol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Geraniol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Cérebro (%)	$1,50 \pm 0,04$	$1,51 \pm 0,05$	$1,42 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,06$
Coração (%)	$0,43 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,02$
Timo (%)	$0,29 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,02$
Baço (%)	$0,41 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,02$
Suprarrenais (%)	$0,06 \pm 0,007$	$0,06 \pm 0,006$	$0,07 \pm 0,007$	$0,06 \pm 0,007$
Rins (%)	$1,19 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,02$
Fígado (%)	$4,19 \pm 0,22$	$4,35 \pm 0,12$	$4,26 \pm 0,16$	$4,40 \pm 0,16$

Fonte: a autora (2021).

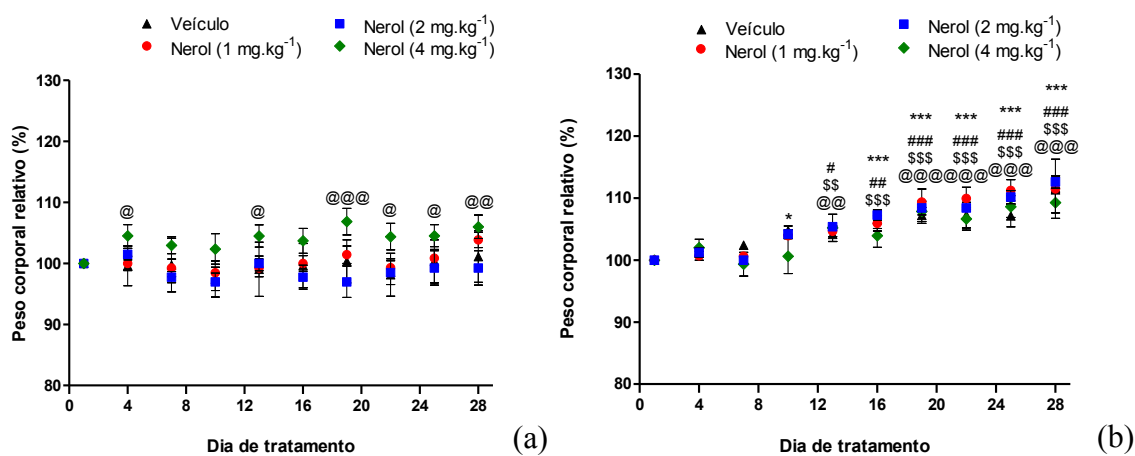
O peso relativo do baço de camundongos machos tratados com geraniol a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo de veículo. Não houve diferenças no peso relativo dos outros órgãos de camundongos machos ou mudanças no peso relativo dos órgãos nos grupos de camundongos fêmeas tratados com geraniol.

5.4.5.2.2 Nerol

– Peso corporal relativo

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de nerol no peso corporal relativo de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 41.

Figura 41 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 1) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$\$ para $p < 0,01$ e \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: @ para $p < 0,05$, @@ para $p < 0,01$ e @@@ para $p < 0,001$.
Fonte: a autora (2021).

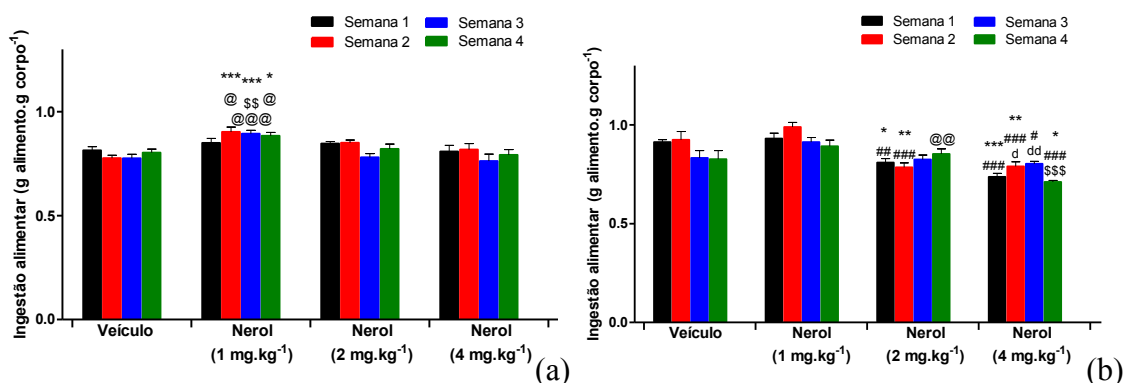
O peso corporal (Figura 41a) de camundongos fêmeas tratados com nerol a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente ao longo do período experimental ($p < 0,05$ no 4.º, 13.º, 22.º e 25.º dias), ($p < 0,01$ no 28.º dia) e ($p < 0,001$ no 19.º dia) quando comparado à 1.ª medida (dia 1). O tratamento com nerol não afetou o peso corporal de camundongos fêmeas em relação ao grupo tratado com veículo. Em relação aos camundongos machos (Figura 41b), um aumento significativo no peso corporal de todos os grupos foi detectado, incluindo o grupo tratado com

veículo, no 10.º ($p < 0,05$ para o grupo veículo), 13.º ($p < 0,05$ para o nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $p < 0,01$ para nerol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e nerol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 16.º ($p < 0,01$ para nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $p < 0,001$ para veículo e nerol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), e, do 19.º ao 28.º dias ($p < 0,001$ para veículo, nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) em comparação com o 1.º dia de tratamento. O tratamento com nerol não afetou o peso corporal de camundongos machos quando comparado ao grupo veículo no mesmo dia do tratamento.

– Ingestão alimentar

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de nerol na ingestão alimentar de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 42.

Figura 42 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças na mesma semana de tratamento em relação aos grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$\$ para $p < 0,01$ e \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com nerol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: @ para $p < 0,05$, @@ para $p < 0,01$ e @@@ para $p < 0,001$. As letras representam diferenças no mesmo grupo de tratamento em relação às semanas. Semana 4: d para $p < 0,05$ e dd para $p < 0,01$.

Fonte: a autora (2021).

Camundongos fêmeas tratados com nerol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram aumento significativo no consumo de alimentos (Figura 42a) em relação aos demais grupos. Na 2.ª semana, a ingestão alimentar do grupo tratado com nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente em comparação com os grupos tratados com veículo ($p < 0,001$) e tratados com nerol $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,05$). Na 3.ª semana, o consumo alimentar do grupo tratado com $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou significativamente em relação aos grupos veículo ($p < 0,001$), nerol 2

mg·kg⁻¹ (p < 0,01) e nerol 4 mg·kg⁻¹ (p < 0,001). O consumo alimentar do grupo tratado com nerol a 1 mg·kg⁻¹ aumentou significativamente em comparação com os grupos tratados com veículo (p < 0,05) e com nerol 4 mg·kg⁻¹ (p < 0,05) na 4.^a semana. Camundongos machos tratados com as doses de nerol a 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ ingeriram significativamente menos alimentos (Figura 42b) do que os grupos tratados com veículo (p < 0,05) e com nerol 1 mg·kg⁻¹ (p < 0,01). O consumo alimentar de camundongos machos tratados com nerol a 4 mg·kg⁻¹ diminuiu significativamente na 4.^a semana comparado com a 2.^a e 3.^a semanas.

– Parâmetros hematológicos

Os resultados para o hemograma dos camundongos machos tratados com nerol estão apresentados na Tabela 17 e dos camundongos fêmeas Tabela 18.

Tabela 17 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Nerol		
		1 mg·kg ⁻¹	2 mg·kg ⁻¹	4 mg·kg ⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	14,16 ± 0,43	12,92 ± 0,71	13,34 ± 0,70	13,84 ± 0,84
HCT (%)	45,42 ± 1,35	41,04 ± 2,55	40,88 ± 2,05	43,80 ± 2,40
MCV (µm ³)	47,8 ± 0,66	48,60 ± 0,51	46,40 ± 0,40 [#]	46,80 ± 0,37
MCH (pg)	14,86 ± 0,18	15,38 ± 0,26	15,12 ± 0,27	14,72 ± 0,12
MCHC (g·dL ⁻¹)	31,18 ± 0,25	31,56 ± 0,27	32,62 ± 0,56	31,60 ± 0,36
RDW (%)	17,80 ± 0,66	18,30 ± 0,35	17,26 ± 0,25	17,32 ± 0,60
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	384,5 ± 67,49	302,7 ± 165,2	349,0 ± 160,0	368,0 ± 162,0
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	7,57 ± 0,22	6,84 ± 0,42	6,80 ± 0,34	7,30 ± 0,40
Reticulócitos (%)	9,0 ± 0,45	10,0 ± 0,51	11,24 ± 0,22	12,33 ± 1,54
Neutrófilos	9,0 ± 1,53	6,25 ± 0,48	6,8 ± 0,86	4,58 ± 0,42 [*]
Linfócitos	88,67 ± 1,20	92,25 ± 0,25	91,80 ± 1,02	93,75 ± 0,63 [*]
Monócitos	1,0 ± 0,58	0,75 ± 0,25	1,0 ± 0,00	0,50 ± 0,29
Eosinófilos	0,33 ± 0,33	0,50 ± 0,29	0,8 ± 0,20	0,33 ± 0,33

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para p < 0,05. Grupo tratado com nerol 1 mg·kg⁻¹: # para p < 0,05. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Tabela 18 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Nerol 1 mg·kg ⁻¹	Nerol 2 mg·kg ⁻¹	Nerol 4 mg·kg ⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	13,43 ± 0,15	14,66 ± 0,06	14,60 ± 0,34	14,53 ± 0,91
HCT (%)	41,07 ± 0,89	46,75 ± 0,52	45,88 ± 1,17	49,78 ± 4,11
MCV (µm ³)	49,67 ± 0,33	49,25 ± 0,25 [@]	48,80 ± 0,37 ^{@@}	50,75 ± 0,25
MCH (pg)	16,23 ± 0,29	15,48 ± 0,09	15,60 ± 0,12	14,97 ± 1,09
MCHC (g·dL ⁻¹)	32,73 ± 0,61	31,35 ± 0,24	31,86 ± 0,14	29,67 ± 2,21
RDW (%)	17,73 ± 0,30	17,60 ± 0,29	17,52 ± 0,15	16,63 ± 1,02
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	630,0 ± 230,0	439,5 ± 172,5	439,4 ± 100,5	585,3 ± 54,41
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	6,84 ± 0,15	7,79 ± 0,08	7,64 ± 0,19	8,26 ± 0,69
Reticulócitos (%)	11,47 ± 0,27	9,23 ± 0,71	9,76 ± 0,40	10,66 ± 0,34
Neutrófilos	6,67 ± 0,7	7,50 ± 0,96	11,40 ± 1,63	7,67 ± 1,20
Linfócitos	93,0 ± 1,00	92,25 ± 1,03	88,0 ± 1,67	92,0 ± 1,53
Monócitos	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,20	0,0 ± 0,0
Eosinófilos	0,33 ± 0,33	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,33 ± 0,33

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com nerol 4 mg·kg⁻¹: @ para p < 0,05 e @@ para p < 0,01. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Os camundongos machos (Tabela 17) tratados com nerol 2 mg·kg⁻¹ apresentaram uma diminuição significativa (p < 0,05) no volume corpuscular médio (MCV) em relação aos animais tratados com nerol 1 mg·kg⁻¹. As contagens de neutrófilos (%) de camundongos machos tratados com nerol a 4 mg·kg⁻¹ foram significativamente (p < 0,05) diminuídas em comparação ao grupo tratado com veículo. Nerol (na dose mais alta) desencadeou um aumento significativo (p < 0,05) nos linfócitos (%) quando comparado ao grupo tratado com veículo. Camundongos fêmeas (Tabela 18) tratados com nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) não apresentaram alteração nos parâmetros hematológicos em comparação ao grupo tratado com veículo. Porém, foi observada uma diminuição significativa no MCV de camundongos fêmeas tratados com nerol a 1 mg·kg⁻¹ e 2 mg·kg⁻¹ (p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente) em relação ao grupo tratado com nerol 4 mg·kg⁻¹.

– Parâmetros bioquímicos

Os resultados para o biograma dos camundongos machos tratados com nerol estão apresentados na Tabela 19 e dos camundongos fêmeas na Tabela 20.

Tabela 19 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Nerol 1 mg·kg ⁻¹	Nerol 2 mg·kg ⁻¹	Nerol 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	235,0 ± 39,77	303,5 ± 64,45	260,0 ± 22,63	300,5 ± 42,24
COL (mg·dL ⁻¹)	169,8 ± 13,19	146,0 ± 8,88	144,0 ± 6,17	148,2 ± 19,67
TRI (mg·dL ⁻¹)	160,4 ± 15,15	231,7 ± 28,64	155,0 ± 23,36	192,0 ± 30,04
HDL (mg·dL ⁻¹)	62,2 ± 1,74	77,0 ± 1,12	88,6 ± 7,68	54,0 ± 9,08 ^{\$}
LDL (mg·dL ⁻¹)	80,8 ± 14,13	29,0 ± 6,56	29,75 ± 3,30	59,5 ± 20,67
AST (U·L ⁻¹)	159,7 ± 10,53	191,7 ± 38,39	125,7 ± 0,33	127,0 ± 14,53
ALT (U·L ⁻¹)	57,5 ± 11,53	30,0 ± 16,74	54,0 ± 28,87	69,0 ± 1,16
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,08	0,47 ± 0,06

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com nerol 2 mg·kg⁻¹: \$ para p < 0,05. Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Tabela 20 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Nerol 1 mg·kg ⁻¹	Nerol 2 mg·kg ⁻¹	Nerol 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	214,5 ± 13,66	282,1 ± 60,35	253,5 ± 24,36	219,6 ± 10,0
COL (mg·dL ⁻¹)	107,8 ± 7,88	116,2 ± 1,63	113,2 ± 12,27	134,4 ± 9,66
TRI (mg·dL ⁻¹)	70,2 ± 10,82	134,6 ± 9,81 ^{**}	120,0 ± 11,43	95,4 ± 14,95
HDL (mg·dL ⁻¹)	45,6 ± 2,40	52,4 ± 9,78	34,3 ± 7,50	46,4 ± 3,09
LDL (mg·dL ⁻¹)	54,0 ± 9,21	37,0 ± 8,60	55,0 ± 11,48	69,0 ± 8,74
AST (U·L ⁻¹)	161,7 ± 8,37	172,0 ± 11,06	137,7 ± 8,37	166,5 ± 10,87
ALT (U·L ⁻¹)	49,0 ± 12,77	72,0 ± 4,04	65,0 ± 7,64	62,25 ± 20,45
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,50 ± 0,02	0,34 ± 0,07	0,73 ± 0,22	0,35 ± 0,11

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: ** para p < 0,01. Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Os padrões bioquímicos não foram alterados em camundongos machos (Tabela 19) tratados com nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral). Apenas o grupo tratado com nerol 4 mg·kg⁻¹ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os níveis da fração de HDL do colesterol quando comparado ao grupo tratado com nerol 2 mg·kg⁻¹.

Camundongos fêmeas (Tabela 20) tratados com nerol a 1 mg·kg⁻¹ apresentaram aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de triglicerídeos (TRI) em relação ao grupo tratado com veículo. No entanto, os outros parâmetros bioquímicos não foram afetados pelo tratamento com nerol em camundongos fêmeas.

– Peso relativo dos órgãos

Os resultados para o peso relativo dos órgãos de camundongos machos tratados com nerol estão apresentados na Tabela 21 e dos camundongos fêmeas na Tabela 22.

Tabela 21 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Nerol 1 mg·kg ⁻¹	Nerol 2 mg·kg ⁻¹	Nerol 4 mg·kg ⁻¹
Cérebro (%)	1,00 ± 0,06	1,16 ± 0,02	1,10 ± 0,06	1,06 ± 0,12
Coração (%)	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,35 ± 0,02
Timo (%)	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,02
Baço (%)	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,01 ^{@@@}	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,01 [*]
Suprarrenais (%)	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,007	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,010
Rins (%)	1,61 ± 0,07	1,52 ± 0,04	1,40 ± 0,02	1,30 ± 0,07 ^{**}
Fígado (%)	5,15 ± 0,16	5,60 ± 0,19	5,04 ± 0,17	4,83 ± 0,16

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Grupo tratado com nerol 4 mg·kg⁻¹: @@@ para $p < 0,001$.

Fonte: a autora (2021).

Uma diminuição significativa no peso do baço ($p < 0,05$) e dos rins ($p < 0,01$) foi observada nos camundongos machos tratados com nerol a 4 mg·kg⁻¹ em comparação com o grupo tratado com veículo. Camundongos machos que receberam nerol a 1 mg·kg⁻¹ apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) no peso relativo do baço quando comparados ao grupo que recebeu a maior dose de nerol (4 mg·kg⁻¹). Animais fêmeas tratados com nerol (Tabela 22) não apresentaram alterações no peso relativo dos órgãos quando comparados ao grupo tratado com veículo.

Tabela 22 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerol (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Órgão	Veículo	Nerol 1 mg·kg ⁻¹	Nerol 2 mg·kg ⁻¹	Nerol 4 mg·kg ⁻¹
Cérebro (%)	1,50 ± 0,04	1,51 ± 0,06	1,56 ± 0,05	1,47 ± 0,06
Coração (%)	0,43 ± 0,04	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Timo (%)	0,29 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,27 ± 0,03
Baço (%)	0,41 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,02
Suprarrenais (%)	0,06 ± 0,007	0,05 ± 0,007	0,05 ± 0,010	0,07 ± 0,006
Rins (%)	1,19 ± 0,05	1,13 ± 0,03	1,26 ± 0,07	1,31 ± 0,06
Fígado (%)	4,19 ± 0,22	4,78 ± 0,13	4,51 ± 0,08	4,45 ± 0,09

Fonte: a autora (2021).

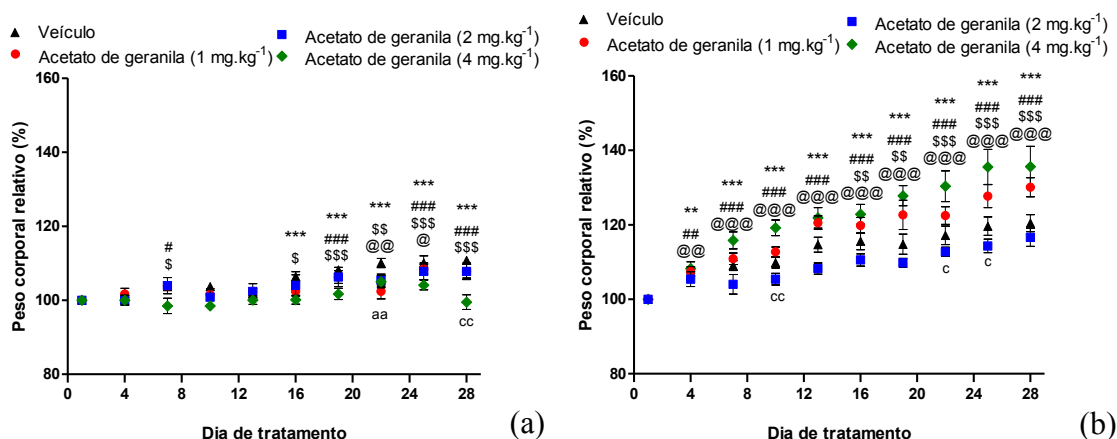
5.4.5.2.3 Acetato de geranila

– Peso corporal relativo

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila no peso corporal relativo de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 43.

Para os camundongos fêmeas (Figura 43a), o grupo tratado com veículo apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) no peso corporal do 16.º ao 28.º dia de tratamento em relação ao 1.º dia. Em relação ao 1.º dia, o grupo tratado com acetato de geranila 1 mg·kg⁻¹ apresentou aumento significativo do peso corporal no dia 7 ($p < 0,05$) e nos dias 19, 25 e 28 ($p < 0,001$). O peso corporal relativo deste grupo foi inferior ao do veículo ($p < 0,01$) no dia 22. O peso corporal de camundongos fêmeas tratados com acetato de geranila a 2 mg·kg⁻¹ foi significativamente maior do que a 1.ª medida (dia 1), nos dias 7 ($p < 0,05$), 16 ($p < 0,05$), 19 ($p < 0,001$), 22 ($p < 0,01$) e 25 a 28 ($p < 0,001$). Os camundongos fêmeas tratados com acetato de geranila a 4 mg·kg⁻¹ apresentaram diminuição significativa ($p < 0,01$) no peso corporal no 28.º dia em comparação ao veículo. Porém, em comparação ao dia 1, o grupo tratado com acetato de geranila 4 mg·kg⁻¹ apresentou aumento no peso corporal relativo nos dias 22 ($p < 0,01$) e 25 ($p < 0,05$).

Figura 43 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas (n = 5 camundongos/grupo) e (b) camundongos machos (n = 5 camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 1) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo: ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de geranila 1 mg·kg⁻¹: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de geranila 2 mg·kg⁻¹: \$ para $p < 0,05$, \$\$ para $p < 0,01$ e \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de geranila 4 mg·kg⁻¹: @ para $p < 0,05$, @@ para $p < 0,01$ e @@@ para $p < 0,001$. As letras representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho 10 mL·kg⁻¹) no mesmo dia de tratamento. Grupo tratado com acetato de geranila 1 mg·kg⁻¹: aa para $p < 0,01$. Grupo tratado com acetato de geranila 4 mg·kg⁻¹: c para $p < 0,05$ e cc para $p < 0,01$.

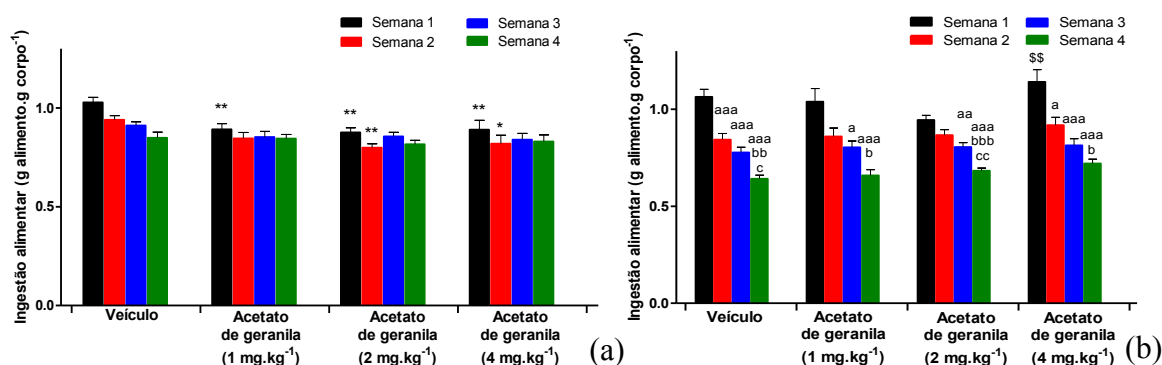
Fonte: a autora (2021).

Em relação ao peso corporal relativo de camundongos machos (Figura 43b), houve um aumento a partir do 4.º dia ($p < 0,01$) para os grupos tratados com veículo, acetato de geranila 1 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ ($p < 0,001$ dos dias 7 a 28) quando comparado ao 1.º dia de tratamento. O peso corporal para o grupo tratado com acetato de geranila 2 mg·kg⁻¹ foi significativamente maior nos dias 16 e 19 ($p < 0,01$) e nos dias 22 a 28 ($p < 0,001$) em relação ao dia 1. A comparação entre os tratamentos no mesmo dia mostrou que os animais tratados com acetato de geranila 4 mg·kg⁻¹ apresentaram aumento significativo do peso corporal relativo quando comparado ao veículo no 10.º ($p < 0,01$), 22.º e 25.º ($p < 0,05$) dias.

– Ingestão alimentar

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila na ingestão alimentar de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 44.

Figura 44 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças na mesma semana de tratamento em relação aos grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Grupo tratado com acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$\$\$ para $p < 0,001$. As letras representam diferenças no mesmo grupo de tratamento em relação às semanas. Semana 1: a para $p < 0,05$, aa para $p < 0,01$ e aaa para $p < 0,001$. Semana 2: b para $p < 0,05$, bb para $p < 0,01$ e bbb para $p < 0,001$. Semana 3: c para $p < 0,05$ e cc para $p < 0,01$.

Fonte: a autora (2021).

Todos os grupos de camundongos fêmeas que receberam acetato de geranila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) apresentaram redução no consumo alimentar ($p < 0,01$) em relação ao grupo tratado com veículo, na 1.^a semana (Figura 44a). Os grupos tratados com acetato de geranila a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,01$) e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,05$) também apresentaram redução na ingestão alimentar em comparação ao grupo tratado com veículo na 2.^a semana de tratamento. Camundongos machos tratados com veículo e acetato de geranila a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ mostraram uma redução na ingestão de alimentos ao longo das semanas de tratamento em comparação com a 1.^a (Figura 44b). Na 4.^a semana, a ingestão alimentar do grupo tratado com veículo foi menor ($p < 0,05$) do que nas semanas anteriores. Além disso, a ingestão alimentar dos animais tratados com acetato de geranila a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ também foi menor ($p < 0,01$) do que nas semanas anteriores. O consumo alimentar dos grupos tratados com acetato de geranila a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi menor ($p < 0,05$) na 4.^a semana em relação à 1.^a e 2.^a semanas. O grupo tratado com acetato de geranila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentou aumento ($p < 0,01$) na ingestão alimentar na semana 1 em relação ao grupo tratado com acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

– Parâmetros hematológicos

Os resultados do hemograma de camundongos machos tratados com acetato de geranila estão apresentados na Tabela 23 e de camundongos fêmeas na Tabela 24.

Tabela 23 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de geranila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de geranila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Hb ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)	$16,33 \pm 0,47$	$15,58 \pm 0,22$	$14,64 \pm 0,91$	$15,64 \pm 0,59$
HCT (%)	$49,04 \pm 1,44$	$46,74 \pm 0,67$	$43,96 \pm 2,74$	$46,94 \pm 1,77$
MCV (μm^3)	$52,00 \pm 0,44$	$52,20 \pm 0,37$	$51,40 \pm 0,74$	$51,00 \pm 0,54$
MCH (pg)	$47,44 \pm 0,77$	$47,52 \pm 0,71$	$47,80 \pm 0,46$	$46,54 \pm 0,58$
MCHC ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)	$90,88 \pm 0,99$	$90,92 \pm 1,02$	$93,06 \pm 1,04$	$91,06 \pm 1,30$
RDW (%)	$14,52 \pm 0,13$	$14,88 \pm 0,12$	$14,96 \pm 0,33$	$14,24 \pm 0,13$
Plaquetas ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	$424,3 \pm 149,5$	$492,8 \pm 119,8$	$745,5 \pm 29,47$	$671,8 \pm 17,53$
Eritrócitos ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	$8,17 \pm 0,24$	$7,78 \pm 0,11$	$7,32 \pm 0,45$	$7,82 \pm 0,29$
Reticulócitos (%)	$0,9 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,08$	$0,80 \pm 0,08$
Neutrófilos	$9,4 \pm 0,92$	$11,6 \pm 1,16$	$11,50 \pm 1,55$	$6,25 \pm 0,00^{\#\$}$
Linfócitos	$89,20 \pm 1,15$	$86,40 \pm 1,47$	$87,75 \pm 1,43$	$93,00 \pm 0,70$
Monócitos	$1,0 \pm 0,0$	$1,25 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Eosinófilos	-	-	-	-

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com acetato de geranila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$. Grupo tratado com acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$ para $p < 0,05$. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Camundongos machos (Tabela 23) tratados com acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de neutrófilos quando comparados aos grupos tratados com acetato de geranila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Os camundongos fêmeas (Tabela 24) tratados com acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram níveis aumentados ($p < 0,05$) de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos quando comparados ao grupo tratado com veículo.

Tabela 24 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de geranila 1 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 2 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 4 mg·kg ⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	13,60 ± 0,63	14,80 ± 0,29	15,10 ± 0,22	15,73 ± 0,46*
HCT (%)	38,36 ± 2,27	45,13 ± 1,04	45,38 ± 1,10	47,93 ± 1,47*
MCV (µm ³)	47,20 ± 0,20	48,00 ± 0,40	49,25 ± 0,25*	47,67 ± 0,88
MCH (pg)	16,38 ± 0,21	15,70 ± 0,10	16,28 ± 0,17	15,70 ± 0,30
MCHC (g·dL ⁻¹)	34,56 ± 0,47	32,83 ± 0,46	33,25 ± 0,35	32,87 ± 0,16
RDW (%)	16,58 ± 0,19	16,98 ± 0,32	16,78 ± 0,085	16,20 ± 0,15
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	164,6 ± 44,89	137,6 ± 32,52	316,0 ± 115,5	253,0 ± 57,09
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	6,40 ± 0,38	7,52 ± 0,16	7,52 ± 0,17	7,93 ± 0,24*
Reticulócitos (%)	1,10 ± 0,11	1,50 ± 0,11	1,10 ± 0,11	1,0 ± 0,11
Neutrófilos	6,6 ± 0,40	7,0 ± 1,41	9,50 ± 1,19	8,66 ± 1,76
Linfócitos	86,0 ± 0,57	88,0 ± 0,57	88,0 ± 0,57	86,0 ± 0,57
Monócitos	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Eosinófilos	-	-	-	-

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para p < 0,05. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Camundongos fêmeas tratados com acetato de geranila a 2 mg·kg⁻¹ apresentaram aumento apenas nos níveis de MCV. Os outros parâmetros (hematócrito, hemoglobina celular média, concentração média de hemoglobina corpuscular celular, largura de distribuição de hemácias, contagem de eritrócitos, plaquetas, reticulócitos, linfócitos e monócitos) não se alteraram significativamente entre os grupos tratados com acetato de geranila em ambos os sexos.

– Parâmetros bioquímicos

Os resultados para o biograma dos camundongos machos tratados com acetato de geranila estão apresentados na Tabela 25 e dos camundongos fêmeas na Tabela 26.

Tabela 25 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geranila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de geranila 1 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 2 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	252,9 ± 34,52	256,4 ± 17,06	214,9 ± 19,06	246,4 ± 41,08
COL (mg·dL ⁻¹)	115,0 ± 3,48	114,0 ± 2,80	140,4 ± 6,64*	141,0 ± 5,44**
TRI (mg·dL ⁻¹)	92,40 ± 10,69	93,20 ± 13,30	179,5 ± 18,4**	125,4 ± 13,53
HDL (mg·dL ⁻¹)	64,20 ± 2,27	66,40 ± 1,47	75,40 ± 3,59	76,20 ± 8,71
LDL (mg·dL ⁻¹)	32,32 ± 2,01	28,96 ± 3,73	27,48 ± 12,21	39,71 ± 7,65
AST (U·L ⁻¹)	83,20 ± 7,13	90,20 ± 15,29	95,0 ± 25,49	117,3 ± 18,60
ALT (U·L ⁻¹)	112,4 ± 17,35	77,80 ± 10,46	69,60 ± 10,11	59,33 ± 11,67
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,51 ± 0,06	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,02	0,52 ± 0,03

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para p < 0,05 e ** para p < 0,01. Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Tabela 26 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de geranila 1 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 2 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 4 mg·kg ⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	236,2 ± 60,77	210,7 ± 14,83	250,8 ± 11,06	299,1 ± 44,30
COL (mg·dL ⁻¹)	74,30 ± 6,69	95,60 ± 6,69	105,5 ± 6,69	98,00 ± 6,69
TRI (mg·dL ⁻¹)	53,30 ± 5,81	67,0 ± 5,81	49,0 ± 5,81	39,0 ± 5,81
HDL (mg·dL ⁻¹)	50,0 ± 4,56	59,20 ± 6,53	48,86 ± 10,5	61,0 ± 7,0
LDL (mg·dL ⁻¹)	54,80 ± 6,02	25,70 ± 6,02	37,70 ± 6,02	36,20 ± 6,02
AST (U·L ⁻¹)	112,4 ± 17,35	77,80 ± 10,46	69,60 ± 10,11	59,33 ± 11,67
ALT (U·L ⁻¹)	66,80 ± 4,70	80,80 ± 11,13	69,0 ± 11,13	53,0 ± 4,16
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,50 ± 0,05

Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Camundongos machos (Tabela 25) tratados com acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,01$) e $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,05$) apresentaram níveis de colesterol significativamente aumentados quando comparados ao veículo. Os níveis de triglicerídeos de camundongos machos tratados com acetato de geranila a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo. Camundongos fêmeas não apresentaram alteração nos parâmetros bioquímicos.

– Peso relativo dos órgãos

Os resultados para o peso relativo dos órgãos de camundongos machos tratados com acetato de geranila estão apresentados na Tabela 27 e dos camundongos fêmeas na Tabela 28.

Tabela 27 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de geranila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Acetato de geranila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de geranila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Cérebro (%)	$1,24 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,03$
Coração (%)	$0,41 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$
Timo (%)	$0,20 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
Baço (%)	$0,31 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,02$
Suprarrenais (%)	$0,03 \pm 0,003$	$0,07 \pm 0,005$	$0,02 \pm 0,005$	$0,03 \pm 0,006$
Rins (%)	$1,56 \pm 0,04$	$1,48 \pm 0,08$	$1,41 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,05$
Fígado (%)	$5,40 \pm 0,06$	$5,52 \pm 0,06$	$5,20 \pm 0,09$	$4,93 \pm 0,09^*$

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$.
Fonte: a autora (2021).

Camundongos machos (Tabela 27) tratados com acetato de geranila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram uma diminuição significativa no peso relativo do fígado ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com veículo.

Camundongos fêmeas (Tabela 28) tratados com acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no peso relativo dos rins quando comparados ao grupo veículo. O peso relativo das suprarrenais deste grupo ($4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo tratado com acetato de geranila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tabela 28 – Efeito do tratamento com doses repetidas de geranila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Órgão	Veículo	Acetato de geranila 1 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 2 mg·kg ⁻¹	Acetato de geranila 4 mg·kg ⁻¹
Cérebro (%)	1,56 ± 0,07	1,40 ± 0,05	1,49 ± 0,04	1,58 ± 0,07
Coração (%)	0,41 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Timo (%)	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Baço (%)	0,43 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Suprarrenais (%)	0,06 ± 0,005	0,07 ± 0,002	0,05 ± 0,003	0,07 ± 0,006 [§]
Rins (%)	1,14 ± 0,03	1,15 ± 0,02	1,19 ± 0,05	1,47 ± 0,12 [*]
Fígado (%)	4,57 ± 0,10	4,32 ± 0,08	4,79 ± 0,25	4,22 ± 0,14

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para p < 0,05. Grupo tratado com acetato de geranila 2 mg·kg⁻¹: § para p < 0,05.

Fonte: a autora (2021).

5.4.5.2.4 Acetato de nerila

– Peso corporal relativo

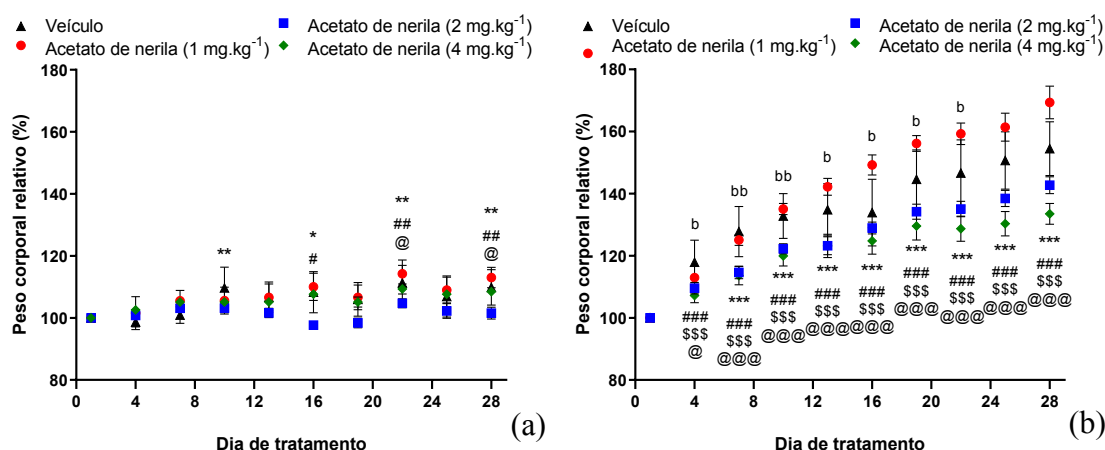
Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila no peso corporal relativo de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 45.

O ganho de peso corporal de camundongos fêmeas (Figura 45a) tratados com veículo aumentou significativamente nos dias 10 (p < 0,01), 16 (p < 0,05), 22 (p < 0,01) e 28 (p < 0,01) em relação ao 1.º dia, no mesmo grupo de tratamento. O ganho de peso corporal de camundongos fêmeas tratados com acetato de nerila 1 mg·kg⁻¹ foi significativamente maior no 16.º (p < 0,05), 22.º (p < 0,01) e 28.º (p < 0,01) dias de experimento quando comparado ao 1.º dia. O peso corporal do grupo tratado com acetato de nerila 4 mg·kg⁻¹ aumentou significativamente (p < 0,05) no 22.º e 28.º dias em relação ao 1.º dia de tratamento. A dose de 2 mg·kg⁻¹ não afetou o peso corporal dos camundongos fêmeas.

Todos os camundongos machos tratados com acetato de nerila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹) apresentaram aumento significativo no peso corporal durante o tratamento (Figura 45b). No 4.º dia, os camundongos tratados com acetato de nerila a 1 mg·kg⁻¹ e 2 mg·kg⁻¹ apresentaram aumento significativo (p < 0,001) no peso corporal em comparação ao 1.º dia, enquanto neste mesmo dia (4.º dia), o peso corporal de camundongos machos tratados com 4

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao 1.º dia. Do 7.º ao 28.º dias de tratamento, todos os grupos (veículo, acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) no peso corporal em comparação ao 1.º dia de tratamento. Ao comparar o grupo tratado com acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ com o grupo veículo, observou-se que o peso corporal dos camundongos tratados com acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aumentou ($p < 0,05$) do 4.º para o 22.º dia de experimento.

Figura 45 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso corporal relativo avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças em relação à primeira medida (dia 1) no mesmo grupo de tratamento. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$\$\$ para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: @ para $p < 0,05$ e @@@ para $p < 0,001$. As letras representam diferenças em comparação com o grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) no mesmo dia de tratamento. Grupo tratado com acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: b para $p < 0,05$ e bb para $p < 0,01$.
Fonte: a autora (2021).

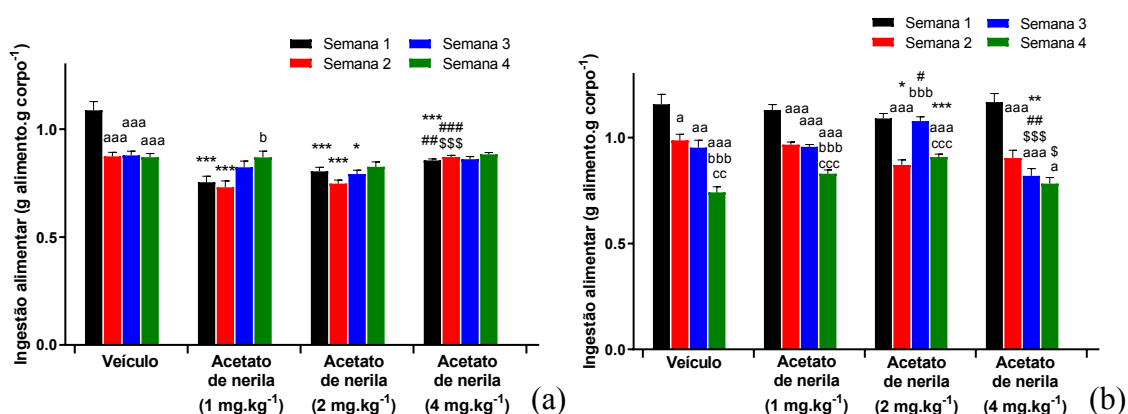
– Ingestão alimentar

Os resultados para o efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila na ingestão alimentar de camundongos machos e fêmeas estão apresentados na Figura 46.

A ingestão alimentar para camundongos fêmeas apresentou alterações significativas entre os grupos tratados com veículo e acetato de nerila (Figura 46a). A ingestão alimentar dos grupos tratados com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi menor ($p < 0,001$) nas semanas 1 e 2 em comparação ao grupo veículo. No caso do acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a ingestão também foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que com o veículo na semana 3. O grupo tratado com acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentou menor ingestão do que o grupo

tratado com veículo ($p < 0,001$) e maior do que o grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p < 0,01$) na semana 1. Na semana 2, o grupo tratado com acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentou maior ingestão alimentar ($p < 0,001$) do que os grupos tratados com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. O grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentou aumento ($p < 0,05$) na ingestão da semana 4 em relação à semana 2. O grupo veículo revelou uma diminuição ($p < 0,001$) na ingestão alimentar nas semanas 2, 3 e 4 em comparação com a semana 1.

Figura 46 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) na ingestão avaliado por ANOVA de medidas repetidas bidirecional *post hoc* Bonferroni para (a) camundongos fêmeas ($n = 5$ camundongos/grupo) e (b) camundongos machos ($n = 5$ camundongos/grupo).



Os símbolos representam diferenças na mesma semana de tratamento em relação aos grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$, ## para $p < 0,01$ e ### para $p < 0,001$. Grupo tratado com acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: \$ para $p < 0,05$ e \$\$\$ para $p < 0,001$.

As letras representam diferenças no mesmo grupo de tratamento em relação às semanas. Semana 1: a para $p < 0,05$, aa para $p < 0,01$ e aaa para $p < 0,001$. Semana 2: b para $p < 0,05$ e bbb para $p < 0,001$. Semana 3: cc para $p < 0,01$ e ccc para $p < 0,001$.

Fonte: a autora (2021).

Camundongos machos tratados com veículo e acetato de nerila em todas as doses testadas apresentaram diminuição na ingestão de alimentos ao longo do período experimental (Figura 46b). O grupo tratado com acetato de nerila a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ teve um aumento significativo ($p < 0,001$) na ingestão alimentar apenas na 3.^a semana em comparação com a 2.^a semana. Camundongos tratados com acetato de nerila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ reduziram ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) a ingestão alimentar na 3.^a semana em relação a todos os outros tratamentos, incluindo com o veículo. Além disso, na 4.^a semana, o grupo tratado a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ também reduziu ($p < 0,05$) a ingestão alimentar em relação ao grupo tratado com $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

– Parâmetros hematológicos

Os resultados do hemograma de camundongos machos tratados com acetato de nerila estão apresentados na Tabela 29 e de camundongos fêmeas Tabela 30.

Tabela 29 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no hemograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Hb ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)	$14,43 \pm 0,08$	$14,54 \pm 0,21$	$14,98 \pm 0,30$	$15,63 \pm 0,17^{* \#}$
HCT (%)	$44,90 \pm 0,64$	$45,02 \pm 0,55$	$46,53 \pm 1,35$	$48,97 \pm 1,16$
MCV (μm^3)	$48,00 \pm 0,57$	$48,40 \pm 0,50$	$47,75 \pm 0,47$	$49,00 \pm 0,00$
MCH (pg)	$15,47 \pm 0,20$	$15,64 \pm 0,20$	$17,85 \pm 2,38$	$15,63 \pm 0,17$
MCHC ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$)	$32,10 \pm 0,30$	$32,30 \pm 0,13$	$32,23 \pm 0,33$	$31,90 \pm 0,45$
RDW (%)	$16,40 \pm 0,05$	$16,36 \pm 0,10$	$16,28 \pm 0,12$	$16,50 \pm 0,25$
Plaquetas ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	$547,7 \pm 367,5$	$844,0 \pm 114,0$	$487,0 \pm 0,0$	$134,0 \pm 0,0$
Eritrócitos ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	$7,48 \pm 0,10$	$7,50 \pm 0,09$	$7,76 \pm 0,23$	$8,33 \pm 0,22$
Reticulócitos (%)	$0,9 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,08$	$0,80 \pm 0,08$
Neutrófilos	$6,33 \pm 0,88$	$7,40 \pm 0,86$	$9,7 \pm 0,86$	$9,0 \pm 0,86$
Linfócitos	$92,67 \pm 0,88$	$90,0 \pm 1,30$	$89,0 \pm 0,81$	$89,33 \pm 0,33$
Monócitos	$1,0 \pm 0,29$	$0,0 \pm 0,29$	$1,0 \pm 0,29$	$0,0 \pm 0,29$
Eosinófilos	-	-	-	-

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com veículo: * para $p < 0,05$. Grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: # para $p < 0,05$. Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).

Fonte: a autora (2021).

Os camundongos machos (Tabela 29) tratados com acetato de nerila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram níveis significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de hemoglobina quando comparados ao grupo tratado com veículo (óleo de milho $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ao grupo tratado com acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Os outros parâmetros não mudaram significativamente entre os grupos. Não houve alterações no hemograma de camundongos fêmeas (Tabela 30) tratados com acetato de nerila.

Tabela 30 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no hemograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de nerila 1 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 2 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 4 mg·kg⁻¹
Hb (g·dL ⁻¹)	15,15 ± 0,25	14,75 ± 0,35	14,20 ± 0,52	15,30 ± 0,40
HCT (%)	44,85 ± 0,62	41,15 ± 1,43	41,54 ± 1,75	32,58 ± 10,86
MCV (µm ³)	46,75 ± 0,25	47,50 ± 0,64	47,00 ± 0,54	46,00 ± 0,00
MCH (pg)	15,73 ± 0,09	16,75 ± 0,53	16,00 ± 0,20	15,83 ± 0,17
MCHC (g·dL ⁻¹)	33,78 ± 0,24	35,38 ± 1,19	34,24 ± 0,18	34,37 ± 0,20
RDW (%)	16,70 ± 0,33	16,45 ± 0,34	16,46 ± 0,26	15,70 ± 0,11
Plaquetas (×10 ³ mm ⁻³)	319,0 ± 180,7	215,7 ± 131,5	384,7 ± 119,2	221,3 ± 61,67
Eritrócitos (×10 ⁶ mm ⁻³)	7,45 ± 0,09	6,82 ± 0,24	6,90 ± 0,29	7,53 ± 0,16
Reticulócitos (%)	1,10 ± 0,11	1,50 ± 0,11	1,10 ± 0,11	1,0 ± 0,11
Neutrófilos	8,7 ± 0,8	5,75 ± 0,85	7,2 ± 0,58	9,0 ± 1,52
Linfócitos	89,00 ± 1,08	92,25 ± 0,85	91,0 ± 0,54	89,33 ± 1,33
Monócitos	2,0 ± 0,48	3,0 ± 0,48	1,0 ± 0,48	3,0 ± 0,48
Eosinófilos	-	-	-	-

Hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC), largura de distribuição de hemácias (RDW).
Fonte: a autora (2021).

– Parâmetros bioquímicos

Os resultados para o biograma dos camundongos machos tratados com acetato de nerila estão apresentados na Tabela 31 e dos camundongos fêmeas na Tabela 32.

Todos os camundongos tratados durante 28 dias com acetato de nerila nas doses 1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ não apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos quando comparados ao grupo veículo. Os níveis de triglicerídeos de camundongos machos (Tabela 31) tratados com acetato de nerila a 4 mg·kg⁻¹ diminuíram (p < 0,05) em comparação ao grupo tratado com acetato de nerila a 1 mg·kg⁻¹. Os parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas (Tabela 32) não apresentaram alterações.

Tabela 31 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de nerila 1 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 2 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 4 mg·kg⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	249,3 ± 27,20	232,9 ± 15,07	241,6 ± 27,44	222,0 ± 23,08
COL (mg·dL ⁻¹)	97,75 ± 3,4	121,0 ± 9,5	113,8 ± 2,26	114,3 ± 2,28
TRI (mg·dL ⁻¹)	83,75 ± 8,10	140,6 ± 19,97	96,80 ± 15,62	66,25 ± 11,46 [#]
HDL (mg·dL ⁻¹)	44,40 ± 6,62	43,75 ± 1,93	51,20 ± 4,18	57,75 ± 7,08
LDL (mg·dL ⁻¹)	35,90 ± 5,06	34,68 ± 7,59	45,58 ± 10,53	28,75 ± 7,27
AST (U·L ⁻¹)	92,0 ± 15,90	81,90 ± 17,78	120,2 ± 17,78	108,3 ± 8,95
ALT (U·L ⁻¹)	47,67 ± 10,11	60,0 ± 8,91	74,50 ± 11,5	26,67 ± 14,15
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,54 ± 0,01

Os símbolos representam diferenças entre os grupos. Grupo tratado com acetato de nerila 1 mg·kg⁻¹: # para p < 0,05. Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

Tabela 32 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila (1 mg·kg⁻¹, 2 mg·kg⁻¹ e 4 mg·kg⁻¹ via oral) no biograma de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral (n = 3 – 5 animais/grupo).

Parâmetro	Veículo	Acetato de nerila 1 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 2 mg·kg⁻¹	Acetato de nerila 4 mg·kg⁻¹
GLU (mg·dL ⁻¹)	204,5 ± 23,30	177,1 ± 54,48	176,4 ± 8,84	174,2 ± 10,76
COL (mg·dL ⁻¹)	74,33 ± 23,25	81,50 ± 11,7	92,75 ± 8,2	79,33 ± 3,1
TRI (mg·dL ⁻¹)	53,25 ± 5,33	51,75 ± 5,33	64,0 ± 5,33	38,0 ± 5,33
HDL (mg·dL ⁻¹)	56,40 ± 3,65	58,20 ± 3,51	48,86 ± 10,67	75,0 ± 4,64
LDL (mg·dL ⁻¹)	54,80 ± 7,10	36,60 ± 7,10	29,70 ± 7,10	21,40 ± 7,10
AST (U·L ⁻¹)	112,4 ± 17,35	122,0 ± 48,57	126,0 ± 9,06	135,2 ± 18,74
ALT (U·L ⁻¹)	66,80 ± 4,70	101,3 ± 36,42	66,20 ± 3,54	67,50 ± 7,33
CRE (mg·dL ⁻¹)	0,51 ± 0,06	0,46 ± 0,02	0,66 ± 0,18	0,49 ± 0,02

Glicose (GLU), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI), frações do colesterol (HDL e LDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CRE).

Fonte: a autora (2021).

– Peso relativo dos órgãos

Os resultados para o peso relativo dos órgãos de camundongos machos tratados com acetato de nerila estão apresentados na Tabela 33 e dos camundongos fêmeas na Tabela 34.

Tabela 33 – Efeito do tratamento com doses repetidas de acetato de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos machos avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Cérebro (%)	$1,34 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,03$
Coração (%)	$0,44 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$
Timo (%)	$0,23 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,02$
Baço (%)	$0,31 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
Suprarrenais (%)	$0,02 \pm 0,006$	$0,03 \pm 0,007$	$0,01 \pm 0,003$	$0,01 \pm 0,002$
Rins (%)	$1,66 \pm 0,12$	$1,50 \pm 0,06$	$1,45 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,03$
Fígado (%)	$4,38 \pm 0,29$	$5,75 \pm 0,03$	$5,30 \pm 0,01$	$5,06 \pm 0,06$

Fonte: a autora (2021).

Tabela 34 – Efeito do tratamento com doses repetidas de nerila ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via oral) no peso relativo dos órgãos de camundongos fêmeas avaliado por ANOVA *post hoc* Bonferroni unilateral ($n = 3 - 5$ animais/grupo).

Órgão	Veículo	Acetato de nerila $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Acetato de nerila $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Cérebro (%)	$1,40 \pm 0,07$	$1,44 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,04$	$1,61 \pm 0,03$
Coração (%)	$0,39 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$
Timo (%)	$0,32 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,01$
Baço (%)	$0,38 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$
Suprarrenais (%)	$0,06 \pm 0,004$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,004$	$0,06 \pm 0,004$
Rins (%)	$1,18 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,09$	$1,23 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,01$
Fígado (%)	$4,48 \pm 0,13$	$4,49 \pm 0,13$	$4,68 \pm 0,08$	$4,39 \pm 0,16$

Fonte: a autora (2021).

Nenhuma diferença no peso relativo do cérebro, coração, timo, baço, suprarrenais, rins e fígado foram detectados entre os grupos experimentais de camundongos machos e fêmeas.

5.4.5.2.5 Comparativo dos efeitos de toxicidade subaguda dos compostos

Em relação à investigação de toxicidade de doses repetidas, camundongos tratados com nerol e geraniol não exibiram comportamentos anormais durante os 28 dias e nenhuma morte foi detectada. No entanto, a ingestão alimentar de camundongos fêmeas tratados com nerol a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi maior do que o grupo tratado com veículo, mas não foi suficiente para aumentar significativamente o peso corporal. Além disso, houve aumento significativo dos níveis de triglicerídeos nesse grupo (tratado com nerol $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), o que pode estar relacionado ao aumento do consumo alimentar. Os principais responsáveis pela variabilidade dos resultados dos níveis de triglicerídeos são as variações pré-analíticas relacionadas aos fatores intrínsecos do indivíduo, como estresse, dieta, obesidade, entre outros (SCHIAVO; LUNARDELLI; OLIVEIRA, 2003). Ao contrário dos camundongos fêmeas, os machos tratados com nerol a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram redução no consumo de alimentos em relação ao grupo veículo, mas não houve alteração no ganho de peso corporal e nem no perfil lipídico. Esta disfunção metabólica pode ser indicativa de efeitos adversos (HILALY et al., 2004; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002; TOFOVIC; JACKSON, 1999) do nerol.

Estudos têm demonstrado que espécies de plantas contendo os óleos essenciais nerol e geraniol não causaram alterações bioquímicas e hematológicas em estudos de toxicidade crônica (CAMPÊLO et al., 2013). No entanto, esses estudos não foram realizados com nerol e geraniol isolados, como no presente estudo. Andrade et al. (2014) demonstraram que a inalação de geraniol a $136,2 \mu\text{L}$ em um estudo de toxicidade subaguda não causou alterações hematológicas em ratos. No entanto, os resultados deste trabalho revelam alterações significativas em alguns parâmetros hematológicos.

Embora o aumento discreto no número de linfócitos dos machos tratados com nerol na dose mais alta e a diminuição de neutrófilos possam caracterizar um processo viral (THRALL et al., 2017), nenhum sinal clínico de virose foi observado no período de experimento. Além disso, esses parâmetros estão de acordo com os valores de referência do *Canadian Council on Animal Care* (CCAC, 2020). Apesar da diminuição do peso relativo do baço e dos rins em machos tratados com a maior dose de nerol, a análise histopatológica não demonstrou qualquer dano a esses órgãos e alterações de seu peso podem refletir a variabilidade biológica

dos animais (BETTI et al., 2012). A administração de doses repetidas de nerol não teve efeitos adversos na maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos fêmeas e machos.

Apesar do aumento na ingestão alimentar observado em camundongos fêmeas que receberam geraniol na dose de $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, o ganho de peso corporal não foi afetado, o que pode estar relacionado aos efeitos adversos do geraniol no metabolismo de camundongos fêmeas. O peso corporal dos camundongos machos tratados com geraniol e tratados com veículo aumentou em relação ao primeiro dia de tratamento. Curiosamente, o consumo alimentar de todos os grupos, incluindo o grupo tratado com veículo, diminuiu gradativamente após a primeira semana de tratamento. Assim, sugere-se que o estresse causado pela gavagem orogástrica repetida diariamente pode ser responsável por essas alterações (DE MEIJER et al., 2010).

Em relação ao hemograma de camundongos machos tratados com geraniol, alterações significativas na hemoglobina, hemoglobina celular média (MCH) e concentração média de hemoglobina corpuscular celular (MCHC) foram detectadas nos animais tratados com a molécula a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Em vista desses resultados, pode-se sugerir que o geraniol desencadeou uma anemia normocítica hipocrômica em camundongos machos (SGNAOLIN et al., 2013). A anemia pode estar relacionada à redução da hemoglobina, hematócrito ou redução dos eritrócitos circulantes (BROADWAY-DUREN; KLAASSEN, 2013). O termo hipocromia refere-se à baixa coloração de eritrócitos devido à diminuição da hemoglobina e é usado quando os índices de MCH e MCHC estão reduzidos (PALMER et al., 2015). Essas alterações hematológicas observadas em camundongos machos tratados com a maior dose de geraniol podem estar relacionadas à depleção de ferro, causando esplenomegalia (baço aumentado) e anemia do tipo deficiência de ferro (WANG et al., 2018).

Em relação aos acetatos, assim como seus álcoois precursores, nas doses mais altas ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ambas as substâncias afetaram o ganho de peso corporal e a ingestão de alimentos dos camundongos, o que pode ser um indicador de efeitos adversos (HILALY et al., 2004; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002; TOFOVIC; JACKSON, 1999). No estudo de toxicidade de doses repetidas, os camundongos tratados com acetato de nerila e geranila não apresentaram comportamentos anormais durante os 28 dias e nenhuma morte foi detectada. Os animais tratados com veículo apresentaram redução na ingestão alimentar da 2.^a para a 4.^a semana de tratamento, o que pode também estar relacionado ao estresse produzido pela repetição da gavagem orogástrica (DE MEIJER et al., 2010). No entanto, os camundongos

machos tratados repetidamente com acetato de geranila apresentaram diminuição da ingestão de alimentos desde o início do tratamento em todas as doses testadas, e isso possivelmente se deve aos efeitos adversos da substância (HILALY et al., 2004; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002; TOFOVIC; JACKSON, 1999). Os camundongos fêmeas tratados com acetato de geranila apresentaram diminuição na ingestão alimentar em comparação ao grupo veículo nas primeiras semanas de tratamento, o que pode representar um efeito anorexígeno (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010) do composto, porém não o suficiente para afetar no peso nesse período.

Nenhuma lesão estomacal foi observada em camundongos após o período experimental em ambos os tratamentos. O acetato de nerila não induziu diferença no peso relativo dos órgãos. Por outro lado, o acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ induziu um aumento na massa renal em camundongos fêmeas. No entanto, não foram detectadas alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à função renal. Em camundongos machos tratados com acetato de geranila na mesma dose, observou-se uma diminuição do peso relativo do fígado. Esse resultado pode estar relacionado às alterações nos níveis de colesterol, que estavam significativamente aumentados em camundongos tratados com acetato de geranila a $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Considerando que o fígado é o principal órgão relacionado ao metabolismo (BETTI et al., 2012), pode-se sugerir que a alteração do peso do fígado pode estar relacionada à lesão hepática. No entanto, não foram detectadas alterações na histologia hepática.

O acetato de geranila a $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ induziu o aumento nos níveis de triglicerídeos em camundongos machos. Considerando que o armazenamento de gordura no tecido adiposo e nas células musculares é feito, principalmente, na forma de triglicerídeos (HARVEY; CHAMPE, 2011), esse resultado pode estar relacionado ao peso corporal relativo desse grupo que cresceu durante o experimento. A análise dos parâmetros hematológicos demonstrou aumento nos níveis de hemoglobina em machos tratados com acetato de nerila, mas os valores obtidos estão de acordo com os limites de normalidade estabelecidos para camundongos (CCAC, 2020). As fêmeas tratadas com acetato de geranila também apresentaram esse aumento nos níveis de hemoglobina, bem como na contagem de hematócrito e eritrócitos, que podem estar associados à policitemia (THRALL et al., 2017). Neste caso, a contagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos não mudou, então a melhor denominação é eritrocitose (THRALL et al., 2017).

Cabe ressaltar que nenhum dos quatro compostos induziu alterações significativas nos parâmetros urinários quando comparados ao grupo tratado com veículo, bem como não foram

detectadas quaisquer anormalidades anatômicas dos órgãos dos animais no estudo histopatológico.

De acordo com os resultados dos parâmetros bioquímicos, peso dos órgãos e análise histopatológica, o estudo de doses repetidas revelou que o nerol e o geraniol não alteraram as funções hepática e renal. Os efeitos toxicológicos do nerol estão relacionados, principalmente, à ingestão de alimentos e alterações no perfil lipídico sanguíneo. A administração repetida do geraniol provocou toxicidade hematológica em camundongos machos em todas as doses testadas, desde a mais baixa, sugerindo que deve ser usado com cautela. Ambos os acetatos não apresentaram toxicidade para camundongos fêmeas e machos administrados repetidamente na menor dose ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). As alterações bioquímicas e hematológicas foram detectadas apenas no grupo de camundongos tratados com acetato de nerila e geranila na maior dose. Por fim, sugere-se que o órgão alvo da toxicidade do acetato de geranila é possivelmente o fígado.

Tais resultados demonstram que os compostos obtidos a partir da rota proposta neste trabalho não apresentam toxicidade oral quando ingeridos respeitando as doses indicadas. Quando aliado aos resultados da caracterização antimicrobiana, os resultados da avaliação da toxicidade oral indicam que os compostos são potenciais candidatos para utilização como aditivos antibacterianos atóxicos em aplicações futuras para diversas áreas, especialmente alimentos e fármacos.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de catálise heterogênea com resinas de troca iônica na síntese orgânica é um campo promissor visto que as resinas unem as vantagens dos catalisadores homogêneos, devido à funcionalização da superfície com ácidos fortes, com as vantagens dos catalisadores heterogêneos, dentre as quais se destaca a facilidade de separação do meio, elevada conversão e seletividade, baixa corrosão dos equipamentos, impacto ambiental reduzido, fácil manuseio e armazenamento, bem como a possibilidade de reutilização. Tais propriedades tornam as resinas potenciais catalisadores para a síntese de ésteres na química fina, que requerem alto grau de pureza, com menores custos e maior facilidade de operação do que catalisadores enzimáticos. Desta forma, avaliou-se, nesta tese, a proposta de rota para a síntese química dos ésteres acetato de geranila e acetato de nerila a partir da esterificação de geraniol ou nerol com anidrido acético utilizando como catalisador a resina de troca iônica comercial Lewatit® GF 101.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a rota proposta é viável visto que é possível obter os compostos acetato de geranila e acetato de nerila com elevada conversão e seletividade a partir da reação de esterificação direta de seus álcoois precursores, geraniol e nerol, com anidrido acético catalisada pela resina de troca iônica Lewatit® GF 101. A condição experimental ótima para a síntese de acetato de geranila e nerila ocorreu na temperatura de 40 °C, teor de catalisador de 7% (m/m) e razão molar de álcool para anidrido acético de 1:4. A taxa de reação foi controlada apenas pelo decaimento do álcool, comportamento esperado devido ao excesso de anidrido acético utilizado. O valor obtido para a constante cinética da reação principal para a síntese de acetato de geranila foi 31 vezes maior que o da reação secundária, enquanto para a síntese de acetato de nerila foi 6 vezes maior, ambos encontrados pelo modelo pseudo-homogêneo. A reutilização do catalisador foi investigada e após 3 ciclos de utilização observou-se baixa perda da atividade catalítica.

Os compostos acetato de geranila e acetato de nerila obtidos por meio da rota proposta apresentaram ação antimicrobiana frente a micro-organismos representantes de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Além disso, foi possível verificar pelo estudo da toxicidade oral dos compostos, que os mesmos se enquadram na Categoria 5 do Sistema de Classificação Global Harmonizado (GHS), apresentando LD₅₀ entre 2000 mg·kg⁻¹ e 5000 mg·kg⁻¹, sendo que, quando ingeridos em doses repetidas de até 1 mg·kg⁻¹, os compostos não apresentaram toxicidade. Estes resultados combinados indicam que tais compostos possuem

potencial para serem utilizados como aditivos antimicrobianos atóxicos para diversas aplicações na indústria.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos nesta tese contribuem com o campo da catálise heterogênea, especialmente na síntese dos ésteres acetato de geranila e nerila utilizando resina de troca iônica como catalisador, bem como com a caracterização da ação antimicrobiana e da toxicidade oral destes compostos. Porém, ao longo do desenvolvimento do trabalho, surgiram novos questionamentos que podem ampliar o embasamento da teoria aqui proposta. No entanto, estas questões não teriam como ser contempladas nesta tese, o que abre possibilidades para que novos estudos sejam realizados nessa área. Desta forma, as seguintes propostas para trabalhos futuros são sugeridas:

- ✓ analisar a influência da agitação do meio reacional em faixas de variação maiores e menores que a utilizada neste trabalho na conversão dos álcoois e na seletividade dos ésteres;
- ✓ avaliar o estudo cinético e o mecanismo de reação através do modelo pseudo-heterogêneo, bem como determinar outros parâmetros cinéticos como a energia de ativação e os fatores pré-exponenciais;
- ✓ analisar a rota de reação com outros doadores de acila e com outros catalisadores heterogêneos ácidos na conversão dos álcoois e na seletividade dos ésteres;
- ✓ avaliar a rota proposta em outras configurações de reatores, tais como PBR, bem como analisar a atividade da resina polimérica aplicada nesta configuração em função dos ciclos de reutilização;
- ✓ analisar a necessidade de ativação do catalisador entre os ciclos reacionais, bem como avaliar a capacidade de regeneração da resina;
- ✓ analisar a ação antibacteriana e antifúngica dos compostos ampliando o range de micro-organismos;
- ✓ avaliar o mecanismo de ação antibacteriana e antifúngica dos compostos;
- ✓ analisar a toxicidade dos compostos por outras vias, tais como intravenosa e dermatológica;
- ✓ avaliar o mecanismo de ação da toxicidade oral dos compostos;
- ✓ estudar a aplicação dos compostos como aditivos antimicrobianos em diferentes áreas como alimentos, fármacos e na obtenção de materiais antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASZYŃSKA, M.; SWARCEWICZ, M.; DZIĘCIOŁ, M.; DOBROWOLSKA, A.. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of lavender varieties from Poland. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 27, n. 16, p. 1497-1501, ago. 2013. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.724408>. Acesso em: jul. 2019.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; KUMAR, P.; BHATT, R. P.; MANZOOR, N.. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, [s.l.], v. 28, n. 8, p. 611-617, 2011. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/yea.1890>. Acesso em: ago. 2021.
- AKOH, C. C.; YEE, L. N.. Lipase-catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 149-153, mar. 1998. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177\(97\)00029-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177(97)00029-5). Acesso em: jul. 2019.
- AL-BAWAB, A.; BOZEYA, A.; FRIBERG, S. E.; AIKEN, P. A.. Geranyl Acetate Emulsions: Surfactant Association Structures and Stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 606-610, 21 abr. 2010. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01932690903217783>. Acesso em: jul. 2019.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P.. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L.. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 169, n. 4, p. 240-254, 2014. Elsevier BV. Disponível em: <https://10.1016/j.micres.2013.10.003>. Acesso em: ago. 2021.
- ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F. A.; JUNIOR, S. A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 368-373, 2000.
- ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; JUNIOR, A. F.. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 34-40, 29 nov. 2013. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>. Acesso em: jul. 2019.
- ANDRADE, B. F.; BRAGA, C. P.; DOS SANTOS, K. C.; BARBOSA, L. N.; RALL, V. L.; SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. A.; FERNANDES JUNIOR, A.. Effect of Inhaling *Cymbopogon martinii* Essential Oil and Geraniol on Serum Biochemistry Parameters and Oxidative Stress in Rats. **Biochemistry Research International**, [s.l.], v. 2014, p. 1-7, 2014. Hindawi. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/493183>. Acesso em: set. 2020.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; RUSSO, M. T.; PIRISI, F. M.; SATTA, M.; CABRAS, P.. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *Microphyllum* (Willd) Nym. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 4, p. 1030-1034, fev. 2003. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf025940c>. Acesso em: jul. 2019.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P.. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 48, n. 7, p. 1817-1820, 2010. Elsevier BV. Disponível em: doi:10.1016/j.fct.2010.04.013. Acesso em: set. 2020.

ARNAL-SCHNEBELEN, B.; HADJIMINAGLOU, F.; PEROTEAU, J.; RIBEYRE, F.; DEBILLERBECK, V.. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. **The International Journal of Aromatherapy**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 192-197, 2004. Elsevier BV. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijat.2004.09.003. Acesso em: ago. 2021.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M.. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 8, p. 1304-1313, ago. 2014. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.014. Acesso em: jul. 2019.

BABU, K. M.; RAVINDRA, K. B.. Bioactive antimicrobial agents for finishing of textiles for health care products. **The Journal of the Textile Institute**, [s.l.], v. 106, n. 7, p. 706-717, set. 2014. Informa UK Limited. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/00405000.2014.936670. Acesso em: out. 2017.

BARTLING, K.; THOMPSON, J. U. S.; PFROMM, P. H.; CZERMAK, P.; REZAC, M. E.. Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in hexane with membrane-mediated water removal. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 75, n. 6, p. 676-681, 2001. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/bit.1193. Acesso em: jul. 2019.

BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J. M.; ROGERS, A. E.; SAURAT, J. H.; SIPES, I.G.; TAGAMI, H.. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 46, n. 11, p. 1-71, nov. 2008. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.085. Acesso em: jul. 2019.

BETTI, A. H.; STEIN, A. C.; DALLEGRAVE, E.; WOUTERS, A. T.; WATANABE, T. T.; DRIEMEIER, D.; BUFFON, A.; RATES, S. M.. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (*Guttiferare*) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 7, p. 2349-2355, 2012. Elsevier BV. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.012. Acesso em: set. 2020.

BEZIĆ, N.; SKOČIBUŠIĆ, M.; DUNKIĆ, V.; RADONIĆ, A.. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 17, n. 9, p. 1037-1040, 2003. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1290. Acesso em: jul. 2019.

BHAVSAR, K. V.; YADAV, G. D.. Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 288-293, 18 jun. 2019. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/ffj.3502. Acesso em: jul. 2019.

- BHUIYAN, M. N. I.; BEGUM, J.; SULTANA, M.. Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 150-153, 20 abr. 2009. Bangladesh Journals Online (JOL). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3329/bjp.v4i2.2800>. Acesso em: jul. 2019.
- BIANCHINI, A.; TOMI, P.; BERNARDINI, A. F.; MORELLI, I.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; USAI, M.; MARCHETTI, M.. A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy). **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 18, n. 6, p. 487-491, 24 out. 2003. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1231>. Acesso em: jul. 2019.
- BLAŽEKOVIĆ, B.; YANG, W.; WANG, Y.; LI, C.; KINDL, M.; PEPELJNJAK, S.; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S.. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula × intermedia* ‘Budrovka’ and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 173-182, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.041>. Acesso em: jul. 2019.
- BOURKAIB, M. C.; RANDRIAMALALA, H.; DETTORI, L.; HUMEAU, C.; DELAUNAY, S.; CHEVALOT, I.; GUIAVARC’H, Y.. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 71, p. 118-126, ago. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>. Acesso em: jul. 2019.
- BRASIL, 2008. Lei nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. **Procedimentos para o uso científico de animais**. Diário Oficial da União. Brasília/DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em: fev. 2018.
- BROADWAY-DUREN, J. B.; KLAASSEN, H.. Anemias. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 411-426, 2013. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2013.09.004>. Acesso em: set. 2020.
- BURT, S.. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03>. Acesso em: ago. 2021.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 1-2, p. 73-79, ago. 1998. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00099-3). Acesso em: jul. 2019.
- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O’BRYAN, C. A.; RICKE, S. C.. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review, **Food Control**, [s.l.], v. 54, p. 111-119, ago. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>. Acesso em: out. 2017.
- CAMPÊLO, L. M. L.; SÁ, C. G.; DE ALMEIDA, A. A. C.; DA COSTA, J. P.; MARQUES, T. H. C.; FEITOSA, C. M.; SALDANHA, G. B.; DE FREITAS, R. M.. Sedative, anxiolytic

and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Pharmazie**, [s.l.], n. 8, p. 623-627, ago. 2011. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2011.1508>. Acesso em: jul. 2019.

CAMPÊLO, L. M. L.; SÁ, C. G.; FEITOSA, C. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M.. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (*Rutaceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 708-716, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-05722013000500011>. SciELO. Acesso em: set. 2020.

CALVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FREITAS, J. R.. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 319-329, out. 2015. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2015.07.003>. Acesso em: jul. 2019.

CCAC. **Guide to the care and use of experimental animals**. v. 1. 2 ed. Publication date: 1993. Revision date: April, 2020 (ISBN: 0-919087-18-3). Canadian Council on Animal Care, 190 O'Connor St., Suite 800, Ottawa, Ontario, K2P 2R3. Disponível em: https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf. Acesso em: set. 2020.

CHAKRABARTI, A.; SHARMA, M. M.. Cationic ion exchange resins as catalyst. **Reactive Polymers**, [s.l.], v. 20, n. 1-2, p. 1-45, 1993. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0923-1137\(93\)90064-m](http://dx.doi.org/10.1016/0923-1137(93)90064-m). Acesso em: ago. 2020.

CHANG, S.; CHEN, P.; CHANG, S.. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 123-127, set. 2001. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00273-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00273-2). Acesso em: jul. 2019.

CHEN, J.; LIN, W.; CHANG, M.. Synthesis of geranyl acetate by esterification with lipase entrapped in hybrid sol-gel formed within nonwoven fabric. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 309-314, mar. 2002. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-002-0479-5>. Acesso em: jul. 2019.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M.. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal Of Botany**, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 643-651, out. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>. Acesso em: jul. 2019.

CHEN, Y.; ZENG, H.; TIAN, J.; BAN, X.; MA, B.; WANG, Y.. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. Pt_8, p. 1175-1183, 2013. Microbiology Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0>. Acesso em: ago. 2021.

CHEN, H.; YANG, K. YOU, C. X.; DU, S. S.; CAI, Q.; HE, Q.; GENG, Z. F.; DENG, Z. W.. Chemical constituents and biological activities against *Tribolium castaneum* (Herbst) of the essential oil from *Citrus wilsonii* leaves. **Journal of the Serbian Chemical Society**, [s.l.], v. 79, n. 10, p. 1213-1222, 2014. National Library of Serbia. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2298/jsc140227037c>. Acesso em: jul. 2019.

CHEN, Y.; DING, S.; ZHENG, W.; ZHANG, Y.; WU, Y.; HU, X.. Proton-gradient-transfer acid complexes and their catalytic performance for the synthesis of geranyl acetate. **Chinese Journal of Catalysis**, [s.l.], v. 37, n. 12, p. 2114-2121, 2016. Elsevier BV. Disponível em: [http://10.1016/S1872-2067\(16\)62577-9](http://10.1016/S1872-2067(16)62577-9). Acesso em: jul. 2019.

CHINTALURI, A. K.; KUMAR, A.; KOMARRAJU, A. L.; VEMULAPALLI, B.. Comparative study of antimicrobial activity of essential oils of selected plants of *Rutaceae* and TLC bioautographic studies for detection of bioactive compounds. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 9-16, 4 nov. 2014. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2014.974837>. Acesso em: jul. 2019.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J.; COMBES, D.. Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 293-298, abr. 1992. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90154-g](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(92)90154-g). Acesso em: jul. 2019

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J.; COMBES, D.. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 691-698, ago. 1993. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90071-9](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(93)90071-9). Acesso em: jul. 2019.

CHUTIA, M.; BHUYAN, P. D.; PATHAK, M. G.; SARMA, T. C.; BORUAH, P.. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 42, n. 3, p. 777-780, abr. 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.015>. Acesso em: jul. 2019.

CLAON, P. A.; AKOH, C. C.. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida antarctica* lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 71, n. 6, p. 575-578, jun. 1994. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02540581>. Acesso em: jul. 2019.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard - 11th ed. CLSI document M07-A11 (ISBN 1-56238-837-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018^a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard - 11th ed. CLSI document M02-A13 (ISBN 1-56238-835-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018^b.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard - 4th ed. CLSI document M27-A4 (ISBN 1-56238-827-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017^a.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Approved Standard - 3th ed. CLSI document M38-A3 (ISBN 1-56238-

831-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017^b.

COÊLHO, M. L.; SILVA, H. O. M.; ISLAM, M. T.; VIANA, V. G. F.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.. Preparation, characterization and featuring of an inclusion complex of nerol with β -cyclodextrin. **International Journal of Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 195-198, 2017. Research Gate. Disponível em: <https://doi.org/10.14419/ijm.v5i2.7933>. Acesso em: ago. 2021.

CONCEA, 2018. **Diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Brasília/DF. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf. Acesso em: fev. 2018.

COUTO, R.; VIDINHA, P.; PERES, C.; RIBEIRO, A. S.; FERREIRA, O.; OLIVEIRA, M. V.; MACEDO, E. A.; LOUREIRO, J. M.; BARREIROS, S.. Geranyl Acetate Synthesis in a Packed-Bed Reactor Catalyzed by Novozym in Supercritical Carbon Dioxide and in Supercritical Ethane. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 1938-1946, 16 fev. 2011. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie101489j>. Acesso em: jul. 2019.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G.. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>. Acesso em: ago. 2021.

DĂNILĂ, E.; MOLDOVAN, Z.; POPA, M.; CHIFIRIUC, M. C.; KAYA, A. D.; KAYA, M. A.. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm efficacy of *C. limon* and *L. angustifolia* EOs and of their mixtures against *Staphylococcus epidermidis* clinical strains. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 122, p. 483-492, out. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.019>. Acesso em: jul. 2019.

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. dos S.; MARQUES, J. de L.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, A. M.. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 81, p. 314-318, ago. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002>. Acesso em: out. 2017.

DA ROCHA NETO, A. C.; DE OLIVEIRA DA ROCHA, A. B.; MARASCHIN, M.; DI PIERO, R. M.; ALMENAR, E.. Factors affecting the entrapment efficiency of β -cyclodextrins and their effects on the formation of inclusion complexes containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 77, p. 509-523, 2018. Elsevier BV. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.029>. Acesso em: ago. 2021.

DEGHAN, G.; SOLAIMANIAN, R.; SHAHVERDI, A. R.; AMIN, G.; ABDOLLAHI, M.; SHAFIEE, A.. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ferula szovitsiana* D.C. **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 224-227, 2007. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1789>. Acesso em: jul. 2019.

DE MEIJER, V. E.; LE, H. D.; MEISEL, J. A.; PUDER, M.. Repetitive orogastric gavage affects the phenotype of diet-induced obese mice. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 387-393, 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.001>. Acesso em: set. 2020.

DHAKE, K. P.; TAMBADE, P. J.; QURESHI, Z. S.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M.. HPMC-PVA Film Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase as a Biocatalyst for Transesterification Reaction. **ACS Catalysis**, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 316-322, mar. 2011^a. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/cs100162t>. Acesso em: jul. 2019.

DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K. M.; PATIL, Y. P.; SINGHAL; BHANAGE, R. S.. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 156, n. 1, p. 46-51, out. 2011^b. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.019>. Acesso em: jul. 2019.

DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W.. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 25, 2016. MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>. Acesso em: ago. 2021.

DJIHANE, B.; WAFI, N.; ELKHAMSSA, S.; PEDRO, D. H. J.; MARIA, A. E.; MIHOUB, Z. M.. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 780-787, 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2016.11.001>. Acesso em: jul. 2019.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C.. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 305-311, fev. 2005. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>. Acesso em: jul. 2019.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 111, n. 2, p. 197-201, maio 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.034>. Acesso em: jul. 2019.

DUBEY, V. S.; LUTHRA, R.. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia) inflorescence development. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 57, n. 5, p. 675-680, jul. 2001. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00122-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00122-4). Acesso em: jul. 2019.

EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J.; RANJBAR, H.. Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 24, n. 14, p. 1287-1294, 10 set. 2010. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786410903132316>. Acesso em: jul. 2019.

EHSANI A.; ALIZADEH O.; HASHEMI M.; AFSHARI A.; AMINZARE M.. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. **Veterinary Research Forum**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 223-229, 2017. PMC. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5653886>. Acesso em: ago. 2021.

ELENI, M.; ANTONIOS, M.; GEORGE, K.; ALEXIOS-LEANDROS, S.; PROKOPIOS, M.. High Quality Bergamot Oil from Greece: Chemical Analysis Using Chiral Gas Chromatography and Larvicidal Activity against the West Nile Virus Vector. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 839-849, 18 fev. 2009. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14020839>. Acesso em: jul. 2019.

EUROPEAN UNION. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Official Journal of the European Communities**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>. Acesso em: fev. 2018.

FAGUNDES, P.; CARNIEL, T. K.; HALL, M. C.; COLPANI, G. L.; SILVA, L. L.; ZANETTI, M.; MELLO, J. M. M.; DALCANTON, F.; FIORI, M. A.. Encapsulation of Nerol Oil in Polycaprolactone Polymer and Stability Evaluation. **Journal of Polymers and the Environment**, [s.l.], 2021. Springer. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02176-5>. Acesso em: ago. 2021.

FAHLBUSCH, K. G.; HAMMERSCHMIDT, F. J.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Flavors and Fragrances. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Germany, v. 15, p. 73-198, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1002/14356007.a11_141. Acesso em: jul. 2019.

FAKHARI, A. R.; SALEHI, P.; HEYDARI, R.; EBRAHIMI, S. M.; HADDAD, P. R.. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1098, n. 1-2, p. 14-18, dez. 2005. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.054>. Acesso em: jul. 2019.

FERRAZ, L. I. R.; POSSEBOM, G.; ALVEZ, E. V.; CANSIAN, R. L.; PAROUL, N.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.. 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**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 44-48, jan. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.003>. Acesso em: jul. 2019.

FREIRES, I. DE A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A.; ALENCAR, S. M. DE; FIGUEIRA, G. M.; RODRIGUES, J. A. O.; DIARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L.. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. e99086, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>. Acesso em: ago. 2021.

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**, [s.l.], v. 65, n. 10, p. 1545-1560, out. 2002. International Association for Food Protection. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-65.10.1545>. Acesso em: jul. 2019.

GANGADWALA, J.; MANKAR, S.; MAHAJANI, S.; KIENLE, A.; STEIN, E.. Esterification of Acetic Acid with Butanol in the Presence of Ion-Exchange Resins as Catalysts. **Industrial Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 42, n. 10, p. 2146-2155, 2003. American Chemistry Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie0204989>. Acesso em: ago. 2020.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R.. Geranyl Acetate Esterase Controls and Regulates the Level of Geraniol in Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Nees ex Steud.) Mutant cv. GRL-1 Leaves. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 64, n. 3-4, p. 251-259, 1 abr. 2009. Walter de Gruyter GmbH. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2009-3-417>. Acesso em: jul. 2019.

GAO, R.; YANG, W.; XU, J.; CHEN, L.; YANG, J.; WANG, B.; YANG, B.. Host-Guest Inclusion Complexes of Geraniol and Nerol with Acyclic Cucurbit[n]urils: Preparation, Characterization and Controlled Release. **Organic & Supramolecular Chemistry**, [s.l.], v. 6, p. 1357-1365, 2021. Chemistry Select. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1002/slct.202004685>. Acesso em: ago. 2021.

GELBARD, G.. Organic Synthesis by Catalysis with Ion-Exchange Resins. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 44, n. 23, p. 8468-8498, nov. 2005. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie0580405>. Acesso em: jul. 2019.

GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; TAVARES, A. C.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L.. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 166-171, jan. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>. Acesso em: jul. 2019.

GRAS Reference 2509. Disponível em: <https://www.femaflavor.org/flavor-library/geranyl-acetate>. Acesso em: jul. 2018.

GUPTA, P.; TANEJA, S. C.; SHAH, B. A.; SETHI, V. K.; QAZI, G. N.. Lipase-catalyzed Separation of Geometrical Isomers: Geraniol–Nerol. **Chemistry Letters**, [s.l.], v. 36, n. 9, p. 1110-1111, 5 set. 2007. The Chemical Society of Japan. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.2007.1110>. Acesso em: jul. 2019.

GUPTA, A.; DHAKATE, S. R.; PAHWA, M.; SINHA, S.; CHAND, S.; MATHUR, R. B.. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 124-132, jan. 2013. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.028>. Acesso em: jul. 2019.

HAJI, S.; ERKEY, C.. Kinetics of Hydrolysis of Acetic Anhydride by In-Situ FTIR Spectroscopy: An Experiment for the Undergraduate Laboratory. **Win** 2005, [s.l.], v. 39, n. 1, 2005. Disponível em: <https://eric.ed.gov/?id=EJ1085719>. Acesso em: ago. 2021.

HARVEY, RICHARD A.; CHAMPE, PAMELA C.; FERRIER, DENISE R., Ph.d. **Bioquímica Ilustrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 520 p. ISBN 9788536326252.

HILALY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSS, B.. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>. Acesso em: set. 2020.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D.. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 273-292, ago. 2005. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>. Acesso em: jul. 2019.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y.. Synthesis of geranyl acetate by lipase entrap-immobilized in cellulose acetate-TiO₂ gel fiber. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 78, n. 11, p. 1099-1103, nov. 2001. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-001-0396-7>. Acesso em: jul. 2019.

IŞCAN, G.. Antibacterial and Anticandidal Activities of Common Essential Oil Constituents. **Records of Natural Products**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 374-388, 2017. Research Gate. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/317318818>. Acesso em: ago. 2021.

JAGADEESHBABU, P. E.; SANDESH, K.; SAIDUTTA, M. B.. Kinetics of Esterification of Acetic Acid with Methanol in the Presence of Ion Exchange Resin Catalysts. **Industrial Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 50, n. 12, p. 7155-7160, 2011. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie101755r>. Acesso em: ago.2020.

JIANG, C.; CHENG, G.. Optimization of Enzymatic Synthesis of Neryl Acetate in a Solvent Free System. **Open Access Library Journal**, [s.l.], v. 7, n. e6254, p. 1-13, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1106254>. Acesso em: ago. 2021.

JENNER, P. M.; HAGAN, E. C.; TAYLOR, J. M.; COOK, E. L.; FITZHUGH, O. G.. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**, [s.l.], v. 2, p. 327-343, 1964. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264\(64\)80192-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264(64)80192-9). Acesso em: jul. 2019.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A. S.; DENKOVA, Z.; NIKOLOVA, R.; GEISLER, M.. Purity, Antimicrobial Activities and Olfactoric Evaluations of Geraniol/Nerol and Various of Their Derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 288-291, maio 2007. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699283>. Acesso em: jul. 2019.

JUDZENTIENE, A.; GARJONYTE, R.; BUDIENE, J.. Variability, toxicity, and antioxidant activity of *Eupatorium cannabinum* (hemp agrimony) essential oils. **Pharmaceutical**

Biology, [s.l.], v. 54, n. 6, p. 945-953, 6 out. 2015. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1078384>. Acesso em: jul. 2019.

JULIANO, C.; MARCHETTI, M.; CAMPAGNA, P.; USAI, M.. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso collected in South-West Sardinia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 897-905, jul. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.009>. Acesso em: jul. 2019.

KAKASY, A. Z.; LEMBERKOVICS, É.; SIMÁNDI, B.; LELIK, L.; HÉTHELYI, É.; ANTAL, I.; SZÖKE, É.. Comparative study of traditional essential oil and supercritical fluid extracts of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 598-603, 2006. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1569>. Acesso em: jul. 2019.

KENAWY, E.; WORLEY, S. D.; BROUGHTON, R.. The Chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 1359-1384, maio 2007. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bm061150q>. Acesso em: out. 2017.

KHAYYAT, S. A.; SAMEEH, M. Y.. Bioactive epoxides and hydroperoxides derived from naturally monoterpene geranyl acetate. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 14-19, jan. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2017.11.005>. Acesso em: jul. 2019.

KIRDI, R.; AKACHA, N. B.; GARGOURI, M.. Biosynthesis Coupled to the Extraction of Geranyl Acetate in a Liquid-Gas System: Optimization of the Transesterification Reaction and Modeling of the Transfer. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 117-125, 17 abr. 2016. Croatian Society of Chemical Engineers/HDKI. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15255/cabeq.2015.2232>. Acesso em: jul. 2019.

KOLAH, A. K.; ASTHANA, N. S.; VU, D. T.; LIRA, C. T.; MILLER, D. J.. Reaction Kinetics for the Heterogeneously Catalyzed Esterification of Succinic Acid with Ethanol. **Industrial Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 47, n. 15, p. 5313-5317, 2008. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie0706616>. Acesso em: ago. 2020.

KOSTER, R.; LINDEN, B. V. D.; POELS, E., BLIEK, A.. The Mechanism of the Gas-Phase Esterification of Acetic Acid and Ethanol over MCM-41. **Journal of Catalysis**, [s.l.], v. 204, n. 2, p. 333-338, 2001. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jcat.2001.3356>. Acesso em: ago. 2020.

LANXESS, Energizing Chemistry. **Product Information Lewatit® GF 101**. Leverkusen: Lanxess Deutschland GmbH, 2014. 3 p.

LARIOS, A.; GARCÍA, H. S.; OLIART, R. M.; VALERIO-ALFARO, G.. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 65, n. 4, p. 373-376, 10 jul. 2004. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1602-x>. Acesso em: jul. 2019.

LARSON, A. M.; KLIBANOV, A. M.. Biocidal packing for pharmaceuticals, foods and other perishables. **Annual Review of Chemical Biomolecular Engineering**, [s.l.], v. 4, p. 171-186, jun. 2013. Annual Reviews. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103253>. Acesso em: out. 2017.

LEITE, B. L. S.; SOUZA, T. T.; ANTONIOLLI, A. R.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, R. S.; QUINTANS, J. S. S.; BONJARDIM, L. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; BOTELHO, M. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.. Volatile constituents and behavioral change induced by *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil in rodents. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 42, p. 8312-8319, 2011. Academic Journals. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajb10.509>. Acesso em: set. 2020.

LEONARDI, M.; AMBRYSZEWSKA, K. E.; MELAI, B.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; PARRI, F.; PISTELLI, L.. Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Donssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 343-355, mar. 2013. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201200222>. Acesso em: jul. 2019.

LEWIS, R. J. Sr. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 14 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 532.

LI, Z.-H.; CAI, M.; LIU, Y.-S.; SUN, P.-L.; LUO, S.-L.. Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 8, p. 1577, 2019. MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24081577>. Acesso em: ago. 2021.

LITTUNEN, K.; CASTRO, J. S. de; SAMOYLENKO, A.; XU, Q.; QUAGGIN, S.; VAINIO, S.; SEPPÄLÄ, J.. Synthesis of cationized nanofibrillated cellulose and its antimicrobial properties. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 75, p. 116-124, fev. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.12.008>. Acesso em: out. 2017.

LONGBOTTOM, C. J.; CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; MEE, B. J.; RILEY, T. V.. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n. 2, p. 386-392, 2004. Oxford Academic. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh359>. Acesso em: ago. 2021.

LOZANO, P.; BERNAL, J. M.; NAVARRO, A.. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. **Green Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 3026-3034, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c2gc36081k>. Acesso em: jul. 2019.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; KUMAR, G. V.; BANERJEE, R.; NAG, A.. Kinetics of solvent-free geranyl acetate synthesis by *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 lipase immobilized on to cross-linked silica. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 124-130, jan. 2009. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10242420802583366>. Acesso em: jul. 2019.

MARTINS, C. T.; SOUZA, L. K. H. **Atividade dos óleos essenciais de *Litsea cubeba* e *Cymbopogon martini* sobre isolados do complexo *Cryptococcus neoformans***. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MATSUURA, R.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M.. Tyrosinase Inhibitory Activity of Citrus Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 6, p. 2309-2313, mar. 2006. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf051682i>. Acesso em: jul. 2019.

MAXIA, A.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; TUVERI, E.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 57-61, jan. 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2008.09.008>. Acesso em: jul. 2019.

MEDEIROS K. A. A. L.; DOS SANTOS, J. R.; MELO, T. C. S.; DE SOUZA, M. F.; SANTOS, L. G.; DE GOIS, A. M.; CINTRA, R. R.; LINS, L. C. R. F.; RIBEIRO, A. M.; MARCHIORO, M.. Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats: Behavior and ECoG power spectra. **Biomedical Journal**, [s.l.], v. 41, n. 5, p. 298-305, 2018. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.008>. Acesso em: set. 2020.

MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; SANTANA, B. V.; NUNES, R. S.; QUINTANS, L. J.; SILVA, G. F.; MEDEIROS, I. A.; MARCHIORO, M.; FRAGA, B. P.; SANTOS, M. R. V.; ARAÚJO, A. A. S.. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, [s.l.], v. 548, p. 45-50, 2012. Elsevier BV. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2012.08.023>. Acesso em: ago. 2021.

MIAO, S.; SHANKS, B. H.. Mechanism of acetic acid esterification over sulfonic acid-functionalized mesoporous silica. **Journal of Catalysis**, [s.l.], v. 279, n. 1, p. 136-143, 2011. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcat.2011.01.008>. Acesso em: ago. 2020.

MIHAI, A. L.; POPA, M. E.. *In vitro* Activity of Natural Antimicrobial Compounds against *Aspergillus* Strains. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, [s.l.], v. 6, p. 585-592, 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.092>. Acesso em: jul. 2019.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRÍA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E. E.. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>. Acesso em: ago.2021.

MSAADA, K.; HOSNI, K.; TAARIT, M. B.; CHAHED, T.; KCHOUK, M. E.; MARZOUC, B.. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 102, n. 4, p. 1131-1134, jan. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.046>. Acesso em: jul. 2019.

MURCIA, M. D.; GÓMEZ, M.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J. L.; HIDALGO, A. M.; SÁNCHEZ, A.; VERGARA, P.. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. **Chemical Engineering Research and Design**, [s.l.], v. 138, p. 135-143, out. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2018.08.025>. Acesso em: jul. 2019.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V.. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013. MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>. Acesso em: ago. 2021.

NICOLETTI, G.; CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; CARBONERA, N. T. G.; SOARES, N. S.; THEILACKER, E.; NINOW, J. L.; DE OLIVEIRA, D.. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 9, p. 1739-1748, 3 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1415-6>. Acesso em: jul. 2019.

NTP. National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709. **Carcinogenesis Studies of Food Grade Geranyl Acetate (71% Geranyl acetate, 29% Citronelly acetate) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study)**. Technical Report Series No. 252 (1987) NIH Publication No. 88-2508.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.. Antimicrobials from herbs and spices. **Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods**, [s.l.], p. 176-200, 2003. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1533/9781855737037.176>. Acesso em: jul. 2019.

OECD. Guideline 423. **Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. Adopted by the Council on 17th December of 2001. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf. Acesso em: fev. 2018.

OECD. Guideline 407. **Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Adopted by the Council on 3r October of 2008. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070684-en.pdf?expires=1629461370&id=id&accname=guest&checksum=9B20A519142E8F4E6B296A8CE61B023F>. Acesso em: fev. 2018.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C.. Synthesis of Fruity Flavor Esters: An Experiment for Undergraduate Courses within one of the Principles of Green Chemistry. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 152-167, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140012>. Acesso em: jul. 2019.

OPDYKE, D. L. J.. Nerol. **Food and Cosmetics Toxicology**, [s.l.], v. 14 n. 6, p. 623-624, 1976. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264\(76\)80026-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264(76)80026-0). Acesso em: ago. 2021.

OPDYKE, D. L. J.. Neryl acetate. **Food and Cosmetics Toxicology**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 625, 1976. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264\(76\)80027-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-6264(76)80027-2). Acesso em: ago. 2021.

ORNANO, L.; VENDITTI, A.; SANNA, C.; BALLERO, M.; MAGGI, F.; LUPIDI, G.; BRAMUCCI, M.; QUASSINTI, L.; BIANCO, A.. Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia. **Journal of Oleo Science**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.19-26, 2015. Japan Oil Chemists' Society. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5650/jos.ess14171>. Acesso em: jul. 2019.

OTERA, J; NISHIKIDO, J.. **Esterification**: methods, reactions, and applications. 2 ed. New York: Wiley -VCH, 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/9783527627622>. Acesso em: jul. 2019.

PALMER, L.; BRIGGS, C.; MCFADDEN, S.; ZINI, G.; BURTHEM, J.; ROZENBERG, G.; PROYTICHEVA, M.; MACHIN, S. J.. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. **International Journal of Laboratory Hematology**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 287-303, 2015. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijlh.12327>. Acesso em: set. 2020.

PAOLINI, J.; DESJOBERT, J.; COSTA, J.; BERNARDINI, A.; CASTELLINI, C. B.; CIONI, P.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 805-808, 2006. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1726>. Acesso em: jul. 2019.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; DE OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 323-329, 28 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-010-0475-x>. Acesso em: jul. 2019.

PATEL, V.; SHAH, C.; DESHPANDE, M.; MADAMWAR, D.. Zinc Oxide Nanoparticles Supported Lipase Immobilization for Biotransformation in Organic Solvents: A Facile Synthesis of Geranyl Acetate, Effect of Operative Variables and Kinetic Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 178, n. 8, p. 1630-1651, 9 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1972-9>. Acesso em: jul. 2019.

PAUL, S.; DUBEY, R.C.; MAHESWARI, D. K.; KANG, S. C.. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. **Food Control**, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 725-731, maio 2011. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.003>. Acesso em: jul. 2019.

PEREIRA, J. A; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Candida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico***. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2017.

PERES, C.; SILVA, M. D. R. G. da; BARREIROS, S.. Water Activity Effects on Geranyl Acetate Synthesis Catalyzed by Novozym in Supercritical Ethane and in Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 7, p. 1884-1888, mar. 2003. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf026071u>. Acesso em: jul. 2019.

PETRAKIS, P. V.; TSITSIMPIKOU, C.; TZAKOU, O.; COULADIS, M.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V.. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 249-252, 2001. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.990>. Acesso em: jul. 2019

PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PETSİKOS-PANAYOTAROU, N.; TZAKOU, A.. Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential Oil of *Salvia sclarea* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 23, p. 6688-6691, nov. 2002. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf020422n>. Acesso em: jul. 2019.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VANESS, R. G.; EVANS, C. S.. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 63, n. 5, p. 569-575, jul. 2003. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00226-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00226-7). Acesso em: jul. 2019.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Nerol**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/643820>. Acesso em: jul. 2019.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Geraniol**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geraniol>. Acesso em: jul. 2019.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Neryl acetate**. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neryl_acetate. Acesso em: jul. 2019.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Geranyl acetate**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549026>. Acesso em: jul. 2019.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; MOREIRA, J. C. F.; PASQUALI, M. A., B.; RABIE, S., M. S.; PIRES, A. S.; SCHRÖDER, R.; RABELO, T. K.; SANTOS, J. P. A.; LIMA, P. S. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS, J. S. S.; GELAIN, D. P.. Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. **Isrn Toxicology**, [s.l.], v. 2013, p. 1-11, 2013. Hindawi Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/459530>. Acesso em: jul. 2019.

RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M.. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **SpringerPlus**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 26, 2013. Springer. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-26>. Acesso em: ago. 2021.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M.. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 62, p. 250-264, 2014. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>. Acesso em: ago. 2021.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A.. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, [s.l.], v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002. MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.3797/scipharm.aut-02-16>. Acesso em: set. 2020.

RIZZI, M.; STYLOS, P.; RIEK, A.; REUSS, M.. A kinetic study of immobilized lipase catalysing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 14, n. 9, p. 709-714, set. 1992. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90110-a](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(92)90110-a). Acesso em: jul. 2019.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 269-277, jan. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.009>. Acesso em: jul. 2019.

RÖNNBACK, R.; SALMI, T.; VUORI, A.; HAARIO, H.; LEHTONEN, J.; SUNDQVIST, A.; TIRRONEN, E.. Development of a kinetic model for the esterification of acetic acid with methanol in the presence of a homogeneous acid catalyst. **Chemical Engineering Science**, [s.l.], v. 52, n. 19, p. 3369-3381, 1997. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2509\(97\)00139-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2509(97)00139-5). Acesso em: ago. 2020.

ROSA, B. H.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; CARVALHO, R. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MALDONADO, R. R.; KAMIMURA, E. S.. Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 12, p. 90-95, out. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.005>. Acesso em: jul. 2019.

RUIZ, B.; FLOTATS, X.. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. **Waste Management**, [s.l.], v. 34, n. 11, p. 2063-2079, nov. 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.026>. Acesso em: jul. 2019.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A.. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>. Acesso em: ago. 2021.

SALGUEIRO, A. M.; SANTOS, M. D.; SARAIVA, J. A.; ALMEIDA, F.; SOUSA, I.; TEDIM, J.; NOGUEIRA, H. I.S.; EVTUGUIN, D. V.. Ultra-high pressure modified cellulosic fibres with antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 175, p. 303-310, nov. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.081>. Acesso em: out. 2017.

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 and Biotechnology**, [s.l.], v. 184, n. 2, p. 630-643, 23 ago. 2017. Springer Nature. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2572-7>. Acesso em: jul. 2019.

SCAPINELLO, J.; MÜLLER, L. G.; SCHINDLER, M. S. Z.; ANZOLLIN, G. S.; SIEBEL, A. M.; BOLIGON, A. A.; NIERO, R.; SARAIVA, T. E. S.; MAUS, N. P.; BETTI, A. H.; OLIVEIRA, J. V.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, D.. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (*Araceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 236, p. 21-30, 2019. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.037>. Acesso em: set. 2020.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. de.. The influence of diet on the triglycerides serum concentration. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003. SciELO. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1676-24442003000400004>. Acesso em: set. 2020.

SGNAOLIN, V.; ENGROFF, P.; ELY, L. S.; SCHNEIDER, R. H.; SCHWANKE, C. H.; GOMES, I.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A.. Hematological parameters and prevalence of anemia among free living elderly in south Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 115-118, 2013. SciELO. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20130032>. Acesso em: set. 2020.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T.. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000400013>. Acesso em: jul. 2019.

SIEDENBIEDEL, F.; TILLER, J. C.. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles. **Polymers**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 46-71, jan. 2012. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/polym4010046>. Acesso em: out. 2017.

SILVA, M. R.; XIMENES, R. M.; DA COSTA, J. G. M.; LEAL, L. K. A. M.; DE LOPES, A. A.; DE BARROS VIANA, G. S.. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s.l.], v. 381, n. 5, p. 415-426, 2010. Pubmed. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00210-010-0494-9>. Acesso em: set. 2020.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 th edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. ISBN 0-471-39362-2. WIE ISBN 0-471-42913-9.

SMITHA, G. R.; RANA, V. S.. Variations in essential oil yield, geraniol and geranyl acetate contents in palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. Wats. var. motia) influenced by inflorescence development. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 66, p. 150-160, abr. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.062>. Acesso em: jul. 2019.

SIMONCIC, B.; TOMSIC, B.. Structures of novel antimicrobial agents for textile - a review. **Textile Research Journal**, [s.l.], v. 80, n. 16, p. 1721-1737, mar. 2010. SAGE. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/0040517510363193>. Acesso em: out. 2017.

STAMATIS, H.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; KOLISIS, F. N.. Studies on the synthesis of short-chain geranyl esters catalysed by *Fusarium oxysporum*

esterase in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 229-236, jun. 1998. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177\(98\)00003-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177(98)00003-4). Acesso em: jul. 2019.

SUN, T.; LI, B.; LI, Y.; ZHAO, X.; SONG, Q.; JIANG, X.; SHUAI, X.; LI, Y.; CAI, Z.; HU, S.. Amphiphilic Star-Shaped Calix[4]resorcinarene as Stationary Phase for Capillary Gas Chromatography. **Chromatographia**, [s.l.], v. 82, p. 1697-1708, 2019. Springer. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03783-0>. Acesso em: ago. 2021.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHA, U. R.. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2016, p. 1-21, 2016. Hindawi. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>. Acesso em: ago. 2021.

TATMAN, D.; MO, H.. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 175, n. 2, p. 129-139, jan. 2002. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00723-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00723-6). Acesso em: jul. 2019.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIROPES, A.; KHETANI, V.. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, [s.l.], v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002. Elsevier BV. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00338-4). Acesso em: set. 2020.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W.. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 688 p.

TIAN, J.; ZENG, X. B.; ZENG, H.; FENG, Z. Z.; MIAO, X. M.; PENG, X.. Investigations on the Antifungal Effect of Nerol against *Aspergillus flavus* Causing Food Spoilage. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, p.1-8, 2013. Hindawi Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/230795>. Acesso em: jul. 2019.

TIAN, J.; LU, Z.; WANG, Y.; ZHANG, M.; WANG, X.; TANG, X.; PENG, X.; ZENG, Z.. Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca²⁺ and ROS in *Candida albicans*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 85, p. 114-122, abr. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.02.006>. Acesso em: jul. 2019.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K.. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999. Pubmed. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00005344-199903000-00003>. Acesso em: set. 2020.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; CHARLES, D. J.; SIMON, J. E.. Volatile Leaf Oil of the Curry Plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and Dwarf Curry Plant [subsp. *Microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American Herb Trade. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. 583-585, set. 1997. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1997.9700781>. Acesso em: jul. 2019.

TISCHER, J. S.; POSSAN, H. J. L.; MALAGUTTI, N. B.; MARTELLO, R.; VALÉRIO, A.; DAL MAGRO, J.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.. Synthesis of eugenyl acetate through heterogeneous catalysis. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 312-318, 21 fev. 2019. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2019.1566098>. Acesso em: jul. 2019.

TURINA, A. DE. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A.. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 122, n. 2, p. 101-113, 2006. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.02.007>. Acesso em: ago. 2021.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Hazard Characterization Document**. Screening-level hazard characterization. Terpenoid Primary Alcohols and Related Esters Category. September, 2009. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.175.5171&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: set. 2020.

ULTEE, A.; SMID, E.. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 373-378, 2001. Elsevier BV. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00480-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00480-3). Acesso em: ago. 2021.

WANG, Y.; ZENG, X.; ZHOU, Z.; KING, K.; TASSEMA, A.; ZENG, H.; TIAN, J. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. **Food Control**, [s.l.], v. 55, p. 54-61, set. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.029>. Acesso em: jul. 2019.

WANG, X.; FLORES, S. R.; HA, J. H.; DOGUER, C.; WOLOSHUN, R. R.; XIANG, P.; GROSCHE, A.; VIDYASAGAR, S.; COLLINS, J. F.. Intestinal DMT1 Is Essential for Optimal Assimilation of Dietary Copper in Male and Female Mice with Iron-Deficiency Anemia. **The Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 148, n. 8, p. 1244-1252, 2018. MDPI. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/nxy111>. Acesso em: set. 2020.

WORZAKOWSKA, M.; ŚCIGALSKI, P.. Synthesis and thermal behavior of linear neryl diesters in inert and oxidative atmosphere. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s.l.], v. 115, n. 1, p. 783-792, 2013. Springer. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3355-1>. Acesso em: ago.2021.

WU, T.; LI, S.; ZHANG, B.; BI, C.; ZHANG, X.. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the production of the valuable monoterpene ester geranyl acetate. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 1-10, 5 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0930-y>. Acesso em: jul. 2019.

XIE, Y.; WANG, K.; HUANG, Q.; LEI, C.. Evaluation toxicity of monoterpenes to subterranean termite, *Reticulitermes chinensis* Snyder. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 53, p. 163-166, fev. 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.021>. Acesso em: jul. 2019.

XIONG, J.; HUANG, Y.; ZHANG, H.; HOU, L.. Lipase-catalyzed transesterification synthesis of geranyl acetate in organic solvents and its kinetics. **Food Science and**

Technology Research, [s.l.], v. 20, p. 207-216, 2014. Japanese Society for Food Science and Technology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3136/fstr.20.207>. Acesso em: jul. 2019.

XU, Z. P.; CHUANG, K. T.. Kinetics of acetic acid esterification over ion exchange catalysts. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 493-500, 1996. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.5450740409>. Acesso em: ago. 2020.

XU, L.; HILTON, M. J.; ZHANG, X.; NORRBY, P. -O.; WU, Y. -D.; SIGMAN, M. S.; WIEST, O.. Mechanism, Reactivity, and Selectivity in Palladium-Catalyzed Redox-Relay Heck Arylations of Alkenyl Alcohols. **Journal of American Chemical Society**, [s.l.], v. 136, n. 5, p. 1960-1967, 2014. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ja4109616>. Acesso em: ago. 2020.

YADAV, G. D.; MEHTA, P. H.. Heterogeneous Catalysis in Esterification Reactions: Preparation of Phenethyl Acetate and Cyclohexyl Acetate by Using a Variety of Solid Acidic Catalysts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 33, n. 9, p. 2198-2208, set. 1994. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ie00033a025>. Acesso em: jul. 2019.

YADAV, G. D.; RAHUMAN, M. S. M. M.. Cation-Exchange Resin-Catalysed Acylations and Esterifications in Fine Chemical and Perfumery Industries. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 706-713, set. 2002. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/op0255229>. Acesso em: jul. 2019.

YADAV, G. D.; RAHUMAN, M. S. M. M.. Synthesis of fragrance and flavour grade esters: activities of different ion exchange resins and kinetic studies. **Clean Technologies and Environmental Policy**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 128-135, 1 jul. 2003. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10098-003-0196-9>. Acesso em: jul. 2019.

YADAV, G. D.; KADAM, A. A.. Atom-Efficient Benzoin Condensation in Liquid-Liquid System Using Quaternary Ammonium Salts: Pseudo-Phase Transfer Catalysis. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 755-763, 16 abr. 2012. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/op300027j>. Acesso em: jul. 2019.

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**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 1-14, 30 maio 2018. Walter de Gruyter GmbH. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1515/ijcre-2017-0179>. Acesso em: jul. 2019.

YADAV, M. K.; SINGH, S. K.; SINGH, M.; MISHRA, S. S.; SINGH, A. K.; TRIPATHI, J. S.; TRIPATHI, Y. B.. *In Vivo* Toxicity Study of Ethanolic Extracts of *Evolvulus alsinoides* & *Centella asiatica* in Swiss Albino Mice. *Journal of Medical Sciences*, [s.l.], v. 7, n. 7, p. 1071-1076, 2019. Pubmed. Disponível em: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.209>. Acesso em: set. 2020.

YANG, Z.-J.; ZHOU, D.; FANG, Y.-X.; JI, H.-B.. Shape-selective separation of geraniol and nerol via noncovalent interactions with β -cyclodextrin. **Separation Science and Technology**,

[s.l.], v. 51, n. 1, p. 168-180, 2015. Taylor & Francis. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1080/01496395.2015.1078357>. Acesso em: ago. 2021.

YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S.. *Pseudomonas* sp. lipase-catalyzed synthesis of geranyl esters by transesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 72, n. 11, p. 1407-1408, nov. 1995. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02546220>. Acesso em: jul. 2019.

YEE, L.; N.; AKOH, C. C.. Enzymatic synthesis of geranyl acetate by transesterification with acetic anhydride as acyl donor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 73, n. 11, p. 1379-1384, nov. 1996. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02523500>. Acesso em: jul. 2019.

YI, F.; SUN, J., BAO, X., MA, B., SUN, M.. Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils. **LWT**, [s.l.], v. 102, p. 310-316, mar. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.051>. Acesso em: jul. 2019.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M.. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de Pimenta *pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, *Myrtaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 513-520, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_097. Acesso em: jul. 2019.

YOON, H. S.; MOON, S. C.; KIM, N. D.; PARK, B. S.; JEONG, M. H.; YOO, Y. H.. Genistein Induces Apoptosis of RPE-J Cells by Opening Mitochondrial PTP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 276, n. 1, p. 151-156, 2000. Ideal Library. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3445>. Acesso em: ago. 2021.

ZANETTI, M.; TERNUS, R. Z.; DALCANTON, F.; DE MELLO, J. M. M.; DE OLIVEIRA, D.; DE ARAÚJO, P. H. H.; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A.. Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, [s.l.], v. 07, n. 04, p. 186-193, 2015. OMICS Publishing Group. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000203>. Acesso em jul. 2019.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T. K.; VALÉRIO, A.; DE OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.; DE ARAÚJO, P. H. H.; RIELLA, H. C.; FIORI, M. A.. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 115-121, 3 maio 2016. Disponível em: Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4998>. Acesso em: jul. 2019.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T. K.; DALCANTON, F.; DOS ANJOS, R. S.; RIELLA, H. C.; DE ARAÚJO, P. H. H.; DE OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.; FIORI, M. A. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 81, p. 51-60, nov. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.003>. Acesso em: jul. 2019.

ZONG, Z.; ZHANG, S.; ZHEN, M.; XU, N.; LI, D.; WANG, C.; GAO, B.; HUA, Q.; LIU, Z.. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of neryl acetate.

Biochemical Engineering Journal, [s.l.], v. 161, n. 107704, set. 2020. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107704>. Acesso em: ago. 2021.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; RATHOD, V.; KARUPPAYIL, S. M.. Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. **Mycoses**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 99-109, 11 mar. 2010. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01852.x>. Acesso em: jul. 2019.