

Camila Silveira

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO EM  
SISTEMA ASSISTIDO POR ULTRASSOM**

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio

Coorientadora: Prof. Dra. Débora de Oliveira

Florianópolis  
2015

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

Silveira, Camila

Síntese enzimática de ascorbil oleato em sistema  
assistido por ultrassom / Camila Silveira ; orientador,  
Marco Di Luccio ; coorientadora, Débora de Oliveira. -  
Florianópolis, SC, 2015.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Síntese enzimática. 3.  
Ascorbil oleato. 4. Antioxidante. 5. Ultrassom. I. Luccio,  
Marco Di. II. Oliveira, Débora de. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Camila Silveira

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO EM  
SISTEMA ASSISTIDO POR ULTRASSOM**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 03 de março de 2015.

---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Dra. Luciane Maria Colla  
Universidade de Passo Fundo

---

Prof. Dr. Marcelo Lanza  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dra. Katia Rezzadori  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
que me deram todo o apoio e  
incentivo, os responsáveis por toda a  
minha dedicação e aos quais devo  
todas as conquistas da minha vida.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me permitir concretizar mais um sonho, por sempre iluminar meu caminho e me dar forças pra seguir em frente.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marco Di Luccio e Profa. Dra. Débora de Oliveira, por terem me aceitado como orientada, por todo incentivo, confiança e pelas valiosas contribuições para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional.

A Manu, que abraçou comigo esse projeto e não mediu esforços para que tudo pudesse ser cumprido da melhor maneira possível! Obrigada pela ajuda, paciência, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados! Agradeço também, ao Marcelo por todas as caronas, conselhos, lanches e pelas vezes em que ajudou a fechar a porta da Central. Muito obrigada!

Ao Jadel Kratz, por viabilizar o uso do HPLC, pelos ensinamentos e por toda a ajuda com as análises no HPLC.

Ao Lindomar Lerin, por toda a ajuda no início dos experimentos.

Ao Leandro Guarezi Nandi, por toda a ajuda com a purificação das amostras e análise de RMN de <sup>1</sup>H.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos e à Universidade Federal de Santa Catarina.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos meus pais, Vilmo e Cristina, por todo amor, compreensão, dedicação, e principalmente, incentivo para que eu pudesse prosseguir e realizar meus sonhos. Nenhuma palavra expressa à gratidão e amor que sinto por vocês. Obrigada por sempre me criar e educar com tanto carinho, por sempre colocar a gente em primeiro lugar em suas vidas. Tantos momentos que me vêm em mente agora... mas em todos eles, sempre feliz por ter os melhores pais do mundo comigo. Obrigada por sempre me compreender, acalmar meus anseios, dúvidas, entender minhas distâncias, e me fazer ver que família é de fato, a base de tudo. Obrigada por me fazer aproveitar a cada pequeno momento ao lado de vocês. Amo vocês!

Aos meus irmãos Marcelo e Rodrigo, que apesar da distância sempre torceram muito por mim. Vocês são exemplos para mim! Amo vocês!

A minha família por todo apoio, em especial minha tia Ereni, minha segunda mãe, por todas orações, carinho, amor e grande incentivo durante todas as épocas da minha vida até aqui! Agradeço também os meus tios Maristella e Pedro, por terem me recebido com muito carinho

em sua casa em Floripa! Agradeço especialmente também, a minha madrinha Maria, por todo carinho, amor, amizade e incentivo! Admiro-te muito! Obrigada! Vocês são muito especiais para mim!

A minha grande amiga Bruna, que mesmo distante sempre esteve muito presente na minha vida, sempre me estendendo a mão quando eu mais precisei e vibrando comigo a cada notícia boa, a cada sonho conquistado. Meu muito obrigada pelas longas conversas, pelas muitas e muitas risadas, pelo ombro amigo, por partilhar comigo a pessoa maravilhosa que és, eu te amo minha amiga!

Aos amigos que ganhei em Floripa, Clarissa, Gabrieli, Márcio e Wiaslan, obrigada pela amizade, por toda ajuda e pelos bons momentos compartilhados. Vocês são amigos que ganhei para uma vida inteira! Agradeço em especial as minhas amigas, Cíntia e Mirian, por toda amizade, compreensão, conselhos, por toda ajuda sempre, pelas inúmeras horas de estudo e por todos os momentos de diversão. Vocês são presentes que ganhei no mestrado!

As professoras Telma e Luciane da Universidade de Passo Fundo (UPF), pelas primeiras indicações no caminho da pesquisa. Aos professores do curso de Engenharia de Alimentos da UPF, pelo esforço e dedicação à profissão, sempre um bom exemplo a ser seguido.

Por fim, a todas as pessoas que de uma maneira ou outra, perto ou distantes, contribuíram para a realização deste trabalho.





*“Depois de um tempo você começa a aceitar suas derrotas de cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos... Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser... Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se não sabe onde está indo, todo lugar serve... Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências... Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha... E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”*

William Shakespeare



## RESUMO

Os antioxidantes são amplamente utilizados em alimentos e cosméticos para controlar o processo de oxidação. Entretanto, a quantidade de antioxidantes obtidos a partir de recursos naturais não é suficiente para atender à demanda atual e muitas vezes alguns destes antioxidantes, como o ácido L-ascórbico, não são estáveis em determinados produtos. Com isso, diversos métodos têm sido desenvolvidos visando à produção de antioxidantes estáveis tanto em produtos hidrofílicos como lipofílicos. A catálise enzimática para produção de ascorbil oleato a partir do ácido L-ascórbico usando ácido oleico está sendo investigada como um método de síntese alternativo ao método químico. O estudo da produção deste composto via síntese enzimática em sistemas alternativos, como banho de ultrassom é considerado uma tecnologia inovadora, visto que na literatura há poucos relatos da síntese de ascorbil ésteres, porém, com resultados vantajosos, o que a torna uma tecnologia promissora e passível de ser explorada em outros sistemas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi propor uma nova tecnologia para a produção enzimática de ascorbil oleato a partir de ácido L-ascórbico e ácido oleico, empregando a lipase Novozym 435, em sistema assistido por ultrassom. Estudos cinéticos foram realizados nas razões molares de ácido L-ascórbico:ácido oleico de 1:3, 1:6 e 1:9, 100% da potência do ultrassom (132 W), temperatura de 50, 60 e 70 °C, 20 mL de terc-butanol, com ou sem adição de peneira molecular (2,5; 5; 10 e 20% (m/m)), com de 5% (m/m) da enzima. Ensaio controle sem utilização do ultrassom durante a reação de síntese enzimática de ascorbil oleato também foram realizados. Pela avaliação cinética do efeito da razão molar dos substratos e da temperatura foi identificado que a máxima conversão em ascorbil oleato (66%) foi obtida na razão molar de 1:9 e temperatura de 70 °C, porém as cinéticas apresentaram comportamento instável. O uso de peneira molecular pré-ativada no meio reacional (20%) levou a um comportamento mais estável da reação e uma conversão máxima em ascorbil oleato de 60%. Desta forma, a síntese enzimática de ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom mostra-se uma tecnologia bastante promissora.

**Palavras-chave:** síntese enzimática 1. ácido L-ascórbico 2. ácido oleico 3. ascorbil oleato 4. ultrassom 5. antioxidante 6.



## ABSTRACT

Antioxidants are widely used in food and cosmetics to control the oxidation process. However, the amount of antioxidants obtained from natural resources is not sufficient to meet current demand and often these are not stable in certain products, such as L-ascorbic acid. Thus, several methods have been developed aiming stable antioxidants production either in hydrophilic products such as lipophilic. The enzymatic catalysis to ascorbyl oleate production from L-ascorbic acid using oleic acid is being investigated as an alternative method of synthesis instead of chemical methods. The study of the production of this compound via enzymatic synthesis in alternative systems such as ultrasound bath is considered an innovative technology, since in the literature there are only reports of other ascorbyl esters synthesis, with advantageous results, which makes it a promising and capable technology to be explored in other systems. In this context, the aim of this study was to propose a new technology for the enzymatic production of ascorbyl oleate from L-ascorbic acid and oleic acid, using Novozym 435 lipase, in system assisted by ultrasound. Kinetic studies were performed in molar ratios of L-ascorbic acid:oleic acid 1:3, 1:6, 1:9, 100% of the power of the ultrasound (132 W), temperature 50, 60 and 70 °C, 20 mL terc-butanol, with or without addition of molecular sieves, preactivated or not (2.5, 5, 10 and 20% (w/w)), and 5% (w/w) of the enzyme. Testing control without ultrasound use during the enzymatic synthesis of ascorbyl oleate was also conducted. By the kinetic study of the molar ratio of the substrate temperature and was identified that the maximum conversion ascorbyl oleate (66%) was obtained in a molar ratio of 1:9 and a temperature of 70 °C, but the kinetics exhibited unstable behavior. The use of pre-activated molecular sieve in the reaction system (20%) led to a more stable and a maximum conversion of 60% ascorbyl oleate. In this, the enzymatic synthesis of ascorbyl oleate in system assisted by ultrasound is shown to be a very promising technology.

**Keywords:** enzymatic synthesis 1. L-ascorbic acid 2. oleic acid 3. ascorbyl oleate 4. ultrasound 5. antioxidants 6.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedade físicas e químicas do ácido oleico. ....	31
Tabela 2 – Estudos sobre esterificação enzimática assistida por ultrassom. ....	49
Tabela 3 – Efeito combinado da razão molar entre os substratos e da temperatura na síntese enzimática de ascorbil oleato. ....	61
Tabela 4 – Efeito do ultrassom na síntese enzimática de ascorbil oleato. ....	61
Tabela 5 – Efeito da concentração de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato. ....	61
Tabela 6 – Efeito da concentração de enzima na síntese enzimática de ascorbil oleato. ....	61
Tabela 7 – Teste de solubilidade do ácido L-ascórbico e ácido oleico em diferentes solventes. ....	65
Tabela 8 - Resumo dos trabalhos de síntese enzimática de ascorbil oleato reportados na literatura. ....	87



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Relação dos setores, tipos de aplicação e produtos obtidos com utilização de lipases.....	42
---	----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.....	30
Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido oleico.....	31
Figura 3 - Esquema reacional para a produção enzimática de ascorbil oleato.....	35
Figura 4 – Esquema genérico de um banho ultrassom.....	45
Figura 5 - Etapas desenvolvidas no projeto de síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.....	57
Figura 6 – Aparato experimental da síntese enzimática de ascorbil oleato em ultrassom.....	60
Figura 7 - Cinética do efeito da temperatura (50 °C e 70 °C) nas três diferentes razões molares de L-ascórbico:ácido oleico, 1:3 (a), 1:6 (b) e 1:9 (c), na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais da reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 10,95; 4,48 (a), 37,55; 55,35 (b) e 3,00; 54,12 (c), nas temperaturas de 50 °C e 70 °C, respectivamente.....	67
Figura 8 - Cinética do efeito do ultrassom na produção de ascorbil oleato, para as três diferentes razões molares: 1:3 (a), 1:6 (b) e 1:9 (c). Velocidades iniciais da reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 4,48; 2,36 (a), 55,35; 2,37 (b) e 54,12; 4,16 (c), na presença e ausência do ultrassom, respectivamente.....	72
Figura 9 - Cinética do efeito da concentração de peneira molecular ativa na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais de reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 16,50; 22,76; 37,87 e 51,54, respectivamente.....	76
Figura 10 - Cinética do efeito da concentração de peneira molecular não ativada na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais de reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 20,58; 32,49; 36,12 e 56,24, respectivamente.....	78
Figura 11 - Comparativo entre a cinética da produção de ascorbil oleato na ausência e presença de peneira molecular (20%). Velocidades iniciais de reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 54,12 e 51,54, respectivamente.....	80
Figura 12 - Efeito da quantidade de enzima na cinética da produção de ascorbil oleato em ultrassom. Velocidade inicial reação, $r$ ( $h^{-1}$ ) de 51,54 e 43,64, respectivamente.....	82
Figura 13 - Cromatograma da amostra de produto da reação enzimática antes (a) e após (b) purificação por cromatografia em coluna.....	84
Figura 14 - Espectro de RMN de $^1H$ para a amostra obtida via esterificação enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico, através da análise de RMN de $^1H$ .....	85
Figura 15 – Comparativo entre a cinética da produção de ascorbil oleato, obtida pelo método de Lowry-Tinsley e pelo método cromatográfico.....	112



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1.1 OBJETIVOS .....	27
1.1.2 Objetivos específicos.....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 OS SUBSTRATOS: ÁCIDO L-ASCÓRBICO E ÁCIDO OLEICO .....	29
2.2 SÍNTESE DE ASCORBIL ÉSTERES .....	32
2.2.1 Síntese de ascorbil oleato .....	35
2.2.2 Síntese de ascorbil ésteres em ultrassom.....	36
2.2.3 Ascorbil ésteres: aplicações.....	37
2.3 LIPASES .....	39
2.4 BIOCATÁLISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS .....	43
2.5 CATÁLISE ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM.....	44
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
3.1 MATERIAIS .....	58
3.1.1 Reagentes .....	58
3.1.2 Enzima.....	58
3.2 MÉTODOS .....	59
3.2.1 Teste de solubilidade dos substratos .....	59
3.2.2 Procedimento experimental para síntese enzimática de ascorbil oleato .....	59
3.2.3 Estudo cinético da síntese enzimática de ascorbil oleato .....	60
3.3.4 Quantificação do produto .....	62
3.3.5 Cálculo da velocidade inicial de reação .....	62
3.3.6 Purificação do produto .....	62
3.3.7 Identificação do produto.....	63
4.1 SELEÇÃO DO SOLVENTE.....	64
4.2 CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO EM BANHO DE ULTRASSOM .....	66
4.2.1 Efeito da temperatura e da razão molar entre os substratos .....	66
4.2.2 Efeito do emprego do ultrassom.....	71
4.2.3 Efeito da concentração da peneira molecular .....	75
4.2.4 Efeito da concentração de enzima .....	81
4.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO E IDENTIFICAÇÃO POR RMN H1 .....	83
<b>4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>86</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>93</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE A – Método de Lowry .....</b>	<b>111</b>
A.1 ESTUDO DO MÉTODO DE LOWRY-TINSLEY PARA QUANTIFICAÇÃO DE ASCORBIL OLEATO .....	111
A.2 MÉTODO DE LOWRY-TINSLEY PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ASCORBIL OLEATO.....	111

## INTRODUÇÃO

Os antioxidantes têm sido amplamente utilizados em alimentos e cosméticos para controlar o processo de oxidação. Entre estes, destaca-se o uso de tocoferóis e do ácido L-ascórbico, que são altamente eficientes em retardar a oxidação lipídica, e com isso possuem papel fundamental no aumento da vida útil dos produtos. O uso de antioxidantes na indústria de alimentos tem sido amplamente estudado, pois quando adicionados aos alimentos controlam o processo de oxidação, bem como promovem um aumento da vida útil dos alimentos. Com isso, diversos métodos têm sido desenvolvidos visando à produção de antioxidantes, entre estes, a síntese enzimática de antioxidantes naturais e seus derivados (SHAHIDI et al., 1992; TORRES DE PINEDO et al., 2007; KARMEE, 2009).

O ascorbil oleato é um éster anfipático do ácido L-ascórbico que é usado amplamente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica por suas propriedades antioxidantes (ROSS et al., 1999). O modo comumente utilizado para a obtenção deste composto é a catálise ácida de acilação de ácido L-ascórbico. Porém este método de síntese possui alto gasto de energia, e frequentemente conduz à formação de uma mistura de produtos que dificultam a purificação (HUMEAU et al., 1995). A catálise enzimática de acilação de ácido L-ascórbico usando ácido oleico está sendo desenvolvida como um método de síntese alternativo para o ascorbil oleato.

A biocatálise é atualmente uma das áreas mais promissoras dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. As enzimas, além de serem atrativas e versáteis, catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reações, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. Além disso, os catalisadores químicos em geral necessitam de condições tão severas que produzem compostos de menor qualidade, necessitando de processos de purificação mais elaborados (CASTRO et al., 2004; ANTUNES, 2005; SRINIVAS, 2011).

A crescente preocupação com o meio ambiente, com a qualidade dos produtos e com o custo energético torna o uso de biocatalisadores atraente a vários setores industriais que buscam tecnologias “limpas”, mais sofisticadas e com menores custos. As lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Estas enzimas estão sendo utilizadas como uma importante ferramenta tecnológica, uma vez que representam uma perspectiva de

desenvolvimento nos processos para obtenção de inúmeros compostos, mono e diacilgliceróis, ácidos graxos, agentes biotensoativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou modificados (TREICHEL et al., 2010).

A catálise enzimática, tradicionalmente, limitava-se ao estudo de reações em meio aquoso, o que restringia em muito as possibilidades de aplicações industriais. A partir da observação de que muitas enzimas, tais como as lipases, atuam *in vivo* em ambientes ricos em lipídios, constatou-se que os ambientes com restrição de água também poderiam ser meios adequados à catálise enzimática (BARON, 2003). Assim, foram iniciadas pesquisas dedicadas a explorar a catálise enzimática nos chamados meios reacionais não convencionais, nos quais podem ser incluídos os solventes orgânicos.

Com o avanço de novas tecnologias em química orgânica, surgem novas e eficientes formas de transferência de energia. Uma delas é o emprego de ultrassom, um método reconhecidamente eficaz para a redução de tamanho de partículas em dispersões e emulsões. Esta técnica pode gerar partículas de tamanho nanométrico em suspensões, dispersões e emulsões e, além disso, acelerar reações químicas e bioquímicas pela maior facilidade da mistura dos reagentes e aumento nas taxas de difusão, entre muitas outras (KULDILOKE, 2002). A irradiação por ultrassom pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do microambiente em função do efeito cavitacional.

Há estudos na literatura que descrevem a síntese enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom como uma tecnologia promissora por contribuir para a solubilidade dos substratos, melhorar a transferência de massa, reduzir o tempo de reação e aumentar o rendimento. Porém, o número de trabalhos que investigaram a produção enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom é pequeno e restrito à produção de ascorbil palmitato. Assim, a síntese enzimática de ascorbil oleato em ultrassom torna-se uma tecnologia passível de ser investigada.

Os aspectos expostos acima motivaram a realização deste trabalho, levando-se em consideração a importância do estudo desta nova tecnologia e a investigação do comportamento enzimático sob a ação de ultrassom.

### 1.1.1 OBJETIVOS

Objetiva-se estudar a síntese enzimática de ascorbil oleato em sistema assistido de banho de ultrassom.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Com base no objetivo geral, os objetivos específicos foram:

- a) Selecionar o melhor solvente, visando posterior emprego na reação de síntese enzimática de ascorbil oleato;
- b) Investigar a influência do banho de ultrassom sobre a produção de ascorbil oleato;
- c) Avaliar o efeito dos parâmetros de processo (razão molar ácido L-ascórbico:ácido oleico, temperatura, concentração de peneira molecular, concentração de enzima), na cinética reacional de síntese enzimática de ascorbil oleato;
- d) Purificar e caracterizar a estrutura do éster obtido por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo tem por objetivo apresentar, a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre enzimas, mais especificamente lipases; esterificação enzimática de ácidos graxos, tecnologias empregadas e produtos resultantes da reação de esterificação; ascorbil ésteres, ascorbil oleato e aplicação da tecnologia de ultrassom.

### 2.1 OS SUBSTRATOS: ÁCIDO L-ASCÓRBICO E ÁCIDO OLEICO

O ácido L-ascórbico, também conhecido como vitamina C (Figura 1), é uma vitamina solúvel em água, considerada indispensável em várias funções fisiológicas. A vitamina C foi isolada primeiramente a partir de glândulas suprarrenais (SZENT-GYÖRGYI, 1928) e, posteriormente, caracterizada a partir de tecidos vegetais (HERBERT et al., 1933), sendo o composto também obtido por isolamento a partir do limão. A vitamina C é produzida comercialmente por dois métodos: o processo Reichstein e por processo de fermentação em duas etapas (REICHSTEIN; GRUSSNER, 1934; LIESE et al., 2006).

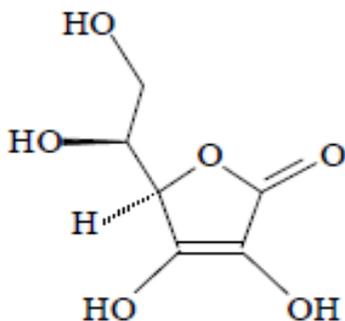
A vitamina C é considerada um forte e poderoso antioxidante não enzimático, solúvel em água, que protege eficazmente as moléculas biológicas contra a degradação oxidativa. Devido à variedade de funções celulares afetadas pelo ácido L-ascórbico (KOJO, 2004; JACOB; SOTOUDEH, 2002), o seu papel na síntese de colágeno tem sido demonstrado (MAY; QU, 2005), como a melhora da elasticidade da pele e redução das rugas, pelo estímulo da síntese de colágeno (PHILIPS et al., 1994).

*In vitro*, a vitamina C tem sido utilizada apenas em meio aquoso como antioxidante devido à sua natureza hidrofílica. Por isso, a aplicação de vitamina C como antioxidante em alimentos lipofílicos é rara (LIU et al., 1996a). A sua baixa estabilidade é a principal limitação da utilização deste em produtos lipofílicos. O ácido L-ascórbico é facilmente oxidado, principalmente em condições aeróbias e exposição à luz, sendo degradada, em primeiro lugar em uma etapa reversível para ácido dehidroascórbico e, por outro, irreversivelmente ao ácido oxálico (AUSTRIA et al., 1997).

Uma função importante da vitamina C é a de proteger os tecidos dos produtos oxidativos nocivos, que acarretam muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer (CHEN et al.,

2005). Além disso, as descobertas recentes sobre o papel específico do ácido L-ascórbico para a atividade de várias dioxigenases dependentes, envolvidas na sinalização celular e na ativação de fatores de transcrição têm sido descritas na literatura (DE TULLIO; ARRIGONI, 2004). As diversas aplicações deste composto têm atraído uma atenção especial das indústrias e conduzido a uma crescente demanda pelo ácido L-ascórbico (BREMUS et al., 2006).

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.

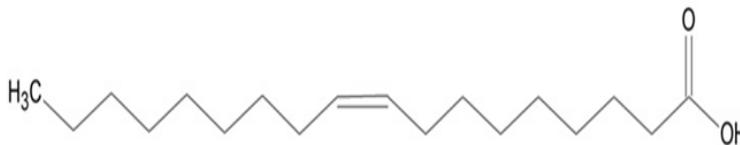


Fonte: LERIN, (2010).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em gorduras e óleos naturais. Estes podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como insaturados ou saturados. Os ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados ou poliinsaturados. Quimicamente, os ácidos graxos consistem de compostos que apresentam uma cadeia carbônica relativamente longa, contendo em uma extremidade o grupo alquila – CH<sub>3</sub>, e na outra extremidade o grupo carboxila – COOH (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Entre os diversos ácidos graxos existentes e conhecidos, pode-se destacar o ácido (9Z)-9-octadecenóico, comercialmente conhecido como ácido oleico. O ácido oleico possui uma cadeia insaturada com 18 carbonos na sua estrutura, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 2 (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido oleico.



Fonte: NICOLAU, (2009).

Os ácidos graxos podem ser agrupados em famílias conhecidas como ômega ( $\omega$ ), por meio desta classificação o ácido oleico pertence à família ômega 9, o que o torna essencial na participação do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios. Devido à sua dupla ligação, esse ácido graxo possui uma curvatura na cadeia, o que dificulta o rearranjo das moléculas, enfraquecendo as interações entre moléculas vizinhas (interação de Van der Waals). Assim sendo, à temperatura ambiente, o ácido oleico encontra-se na fase líquida. As principais fontes de obtenção do ácido oleico são o óleo de oliva e o de canola (ASAKURA et al., 2000).

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físicas e químicas de ácido oleico.

Tabela 1 – Propriedade físicas e químicas do ácido oleico.

<b>Propriedades</b>	<b>Ácido oleico</b>
Fórmula molecular	$C_{18}H_{34}O_2$
Massa molar (g/mol)	282,47
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,891
Índice de refração	1,4595
Ponto de fusão (°C)	16-17
Ponto de ebulição (°C)	286

Fonte: PASSOS (2007).

A modificação do ácido L-ascórbico via esterificação ou transesterificação com moléculas alifáticas, tais como ácidos graxos, é um modo para alterar sua solubilidade em fórmulas oleosas e emulsões. Alguns derivados de ascorbil, como ascorbil laurato, ascorbil palmitato

e arcorbil oleato, obtidos através de síntese enzimática utilizando lipases imobilizadas, já foram descritos na literatura (HUMEAU et al., 1995; BRADDOO et al., 1999; YAN et al., 1999; MAUGARD et al., 2000; MORENO-PEREZ et al., 2013).

## 2.2 SÍNTESE DE ASCORBIL ÉSTERES

Os antioxidantes naturais, como os tocoferóis e o ácido L-ascórbico, são altamente eficientes em retardar a oxidação lipídica em alimentos. No entanto, a quantidade de antioxidantes obtidos a partir de recursos naturais não é suficiente para atender às exigências atuais. Com isso, muitos métodos têm sido desenvolvidos visando a produção de antioxidantes, entre estes, a síntese enzimática de antioxidantes naturais e seus derivados (SHAHIDI et al., 1992; KARMEE, 2009; COSTA et al., 2014).

As rotas mais utilizadas para a síntese de ascorbil ésteres de ácidos graxos são por meio de métodos químicos que utilizam catalisadores ácidos ou alcalinos (SCHULER, 1990). Os principais problemas da síntese química estão relacionados com o baixo rendimento do produto, devido à falta de regioseletividade das reações, com os subprodutos gerados por rotas químicas, e a necessidade de processos de purificação elaborados. Além disso, as reações químicas apresentam limitações devido ao uso de temperaturas elevadas nas reações de esterificação e transesterificação, uma vez que pode ocorrer a oxidação e degradação da vitamina C (SRINIVAS, 2011).

A síntese de ésteres de vitamina C via catálise realizada por lipases tem sido aplicada devido à regiosseletividade apresentada e ao alto rendimento do produto. Para a acilação da vitamina C, geralmente são utilizados ácidos graxos (AGs), ésteres de ácidos graxos (metil, etil, ou vinil) e triglicerídeos (TGs) como doadores de acila, que são obtidos a partir de recursos renováveis. Os ácidos graxos podem ser saturados e insaturados. Os FA como caprílico (C8), cáprico (C10), láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) são conhecidos como doadores acila (KARMEE, 2008, 2009).

Os ácidos graxos têm sido amplamente utilizados como doadores acila para produção de ascorbil ésteres de ácidos graxos e, entre estes, vários grupos têm investigado a síntese de ascorbil ésteres de AGs (KARMEE, 2009). Viklund et al. (2003) estudaram a síntese de ascorbil palmitato com razões molares ácido L-ascórbico e ácido palmítico de 1:1, 1;1.5 e 1:2, com volume de solvente, álcool terc-amil,

de 10 mL na temperatura de 60 °C. Neste estudo, os autores obtiveram 71%, 80% e 86% de conversão, para cada razão molar testada, respectivamente, em 50 horas de reação.

A catálise de acilação com a enzima Novozym 435 do ácido L-ascórbico com ácido láurico e metil laurato foram estudados. Watanabe et al. (1999) estudaram a cinética de esterificação do ácido láurico e obtiveram a conversão de 8% após 50 horas, enquanto que a transesterificação de metil laurato, a conversão foi de 4% em 25 horas, na temperatura de 60 °C e razão molar dos substrato de 1:5 (ácido L-ascórbico: ácido láurico/metil laurato). Além disso, a esterificação do ácido láurico com ácido L-ascórbico na temperatura de 60 °C e razão molar dos substratos de 1:5 foi estudada em diferentes solventes, álcool terc-amil, acetonitrila e terc-butanol, com conversões de 24%, 20% e 11% (WATANABE et al., 1999).

Em um estudo realizado por Humeau et al. (1998), utilizando o ácido L-ascórbico e o ácido palmítico na razão de 1:9, respectivamente, verificou-se uma conversão de aproximadamente 40% de ascorbil palmitato após 5 horas de reação, em terc-butanol. Porém, não foi observado um aumento significativo na conversão após prolongados tempos de reação.

Outros ácidos graxos também foram estudados, como o ácido linolênico,  $\alpha$  linolênico e  $\gamma$ -linolênico, como doadores de acila em acetona a 50 °C para a síntese de ascorbil ésteres usando Chirazyme L-2C2 (KUWABARA et al. 2003a,b). Watanabe et al. (1999) sintetizaram ascorbil ésteres com ácidos graxos insaturados em acetona com rendimento de 47% por esterificação de ácido eicosapentanóico usando lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL-B) com razão molar de 5:1 (ácido eicosapentanóico/ácido L-ascórbico). Uma investigação detalhada foi realizada utilizando vários ácidos graxos poliinsaturados, dentre eles o ácido linolênico,  $\alpha$ -inolênico,  $\gamma$ -linolênico, araquidônico e docosahexaenóico para a síntese de ascorbil ésteres insaturados usando Chiralzyme L-2C2 (WATANABE et al., 2001b).

Os óleos, triglicerídeos, são compostos alternativos para a síntese de ascorbil ésteres. A acilação de ácido L-ascórbico com óleos pode produzir uma mistura de ascorbil ésteres de ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia. Neste sentido, foi realizada a síntese de ascorbil ésteres utilizando biodiesel derivado do óleo de soja e de palma na presença de Novozym 435 em acetona, e obteve-se 62% de conversão durante a transesterificação de metil éster do óleo de palma com ácido L-ascórbico em razão molar de 1:4 e 50 °C. A mistura de ésteres resultante continha 46% de ascorbil palmitato, 43% de ascorbil

oleato e 10% de ascorbil linoleato. Quando utilizado o óleo de soja como substrato os autores obtiveram conversão de 17%, produzindo uma mistura de ésteres composta de 10% de ascorbil palmitato, 21% de ascorbil oleato e 65% de ascorbil linoleato (HSIEH et al., 2005).

Na reação de acilação, durante a transferência do grupo acila, o comprimento da cadeia do ácido graxo apresenta um efeito considerável sobre o rendimento do produto. Song et al. (2006) estudaram a influência do comprimento da cadeia do ácido graxo no rendimento e na velocidade inicial da reação, utilizando a enzima Novozym 435, e observaram que a enzima é seletiva para ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, o ácido graxo C18 insaturado, ácido oleico, apresentou melhor rendimento em relação ao ácido graxo C18 saturado, ácido esteárico. Uma tendência semelhante foi observada por Yan et al. (1999), durante a síntese de ascorbil ésteres catalisada por CAL-B, usando razão molar de 3:1 de ésteres de vinil de ácidos graxos e ácido L-ascórbico a 40 °C em terc-butanol. Foram utilizados os ésteres de vinil de ácido caprílico (C8), cáprico (C10), láurico (C12) e palmítico (C16) e obtiveram rendimentos de 65%, 87%, 74% e 91% dos correspondentes ascorbil ésteres, enquanto que em acetona os rendimentos foram de 55%, 75%, 60% e 75%, respectivamente.

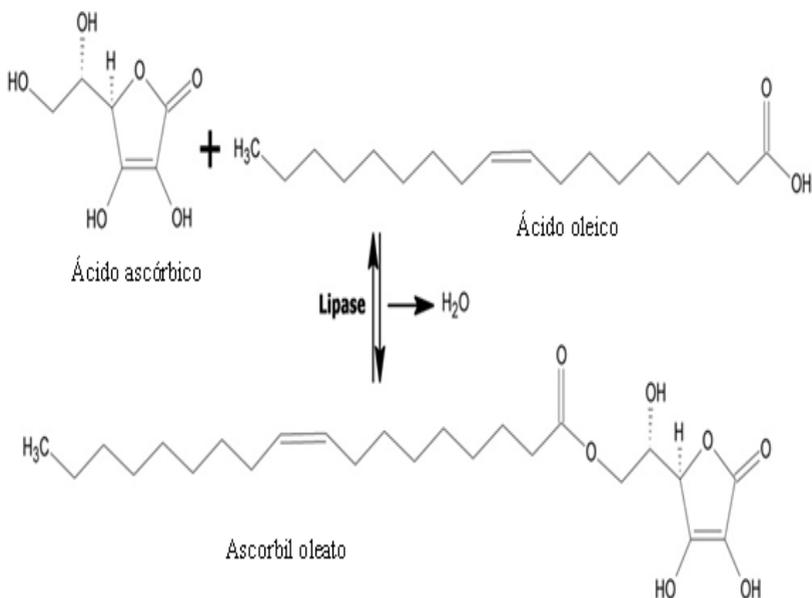
Um aumento no comprimento da cadeia dos ácidos graxos ou seus ésteres nem sempre conduz a um aumento do rendimento da reação, como no estudo de Stamatis et al. (1999) que observaram redução no rendimento de 60% para 40% quando aumentaram o comprimento da cadeia do ácido graxo de C12 a C18 com ácido láurico, mirístico, palmítico e esteárico. Em outro estudo de Watanabe et al. (1999), o comprimento da cadeia do ácido graxo variou de C6 a C12, durante a reação dos ácidos caprílico, caprílico, cáprico e láurico em acetonitrila, e nenhum efeito sobre a conversão foi encontrado.

Os ascorbil ésteres são compostos anfífilos (WATANABE et al., 2001a), que formam agregados em sistema aquoso, com um núcleo lipofílico interior e uma superfície hidrofílica exterior. Estes sistemas têm sido utilizados para a estabilização e solubilização de moléculas sensíveis (PALMA et al., 2002). Estudos revelam que os ascorbil ésteres são eficazes na peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LIU et al., 1996b). Além disso, ascorbil ésteres podem atuar como promotores antimutágenos e antitumorais (RAO et al., 1995; NAIDU, 2003), e na área dermatológica podem auxiliar no tratamento de manchas de pele (WORTZMAN; GANS; PATEL, 2002).

### 2.2.1 Síntese de ascorbil oleato

O ascorbil oleato é um éster de vitamina C lipossolúvel. Assim, o ascorbil oleato é formado a partir da esterificação do ácido oleico com ácido L-ascórbico para formar um éster de vitamina C. A síntese de ascorbil oleato pode ser realizada por rota química ou enzimática. Um esquema da reação por esterificação enzimática está apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema reacional para a produção enzimática de ascorbil oleato.



Fonte: BEZBRADICA et al. (2013).

Viklund, Alander e Hult (2003) estudaram a síntese de ascorbil oleato com razão molar ácido L-ascórbico e ácido oleico de 2:1, obtiveram um rendimento de 87% em 100 horas, mas o rendimento isolado do produto foi de apenas 29%, devido ao extenso tempo de

reação. Em outro estudo, realizado com diferentes preparações de lipases CAL-A e CAL-B, foi avaliada a síntese de ascorbil oleato em diferentes solventes: etanol, n-hexano, éter de petróleo e acetona, a uma temperatura de 45 °C. Em acetona, todas as preparações de enzima, ou seja, Chirazyme L-2C1, Chirazyme L-2C2, Chirazyme L-2C3, L-Chirazyme 5C1, Novozym 435 e lipase bruta de *Candida antarctica* ATCC-28323 conduziram a conversões de 39%, 43%, 32%, 21%, 40% e 28% em ascorbil oleato após 24 horas de reação. Com a Chirazyme L-2C2, estudou-se também o uso de peneiras moleculares (3-4 Å) na reação e mostrou-se um aumento da conversão de até 46% em comparação a 15%, sem peneira molecular. Os autores também testaram a utilização de metil oleato e observaram que com o aumento da razão molar de ácido L-ascórbico e metil oleato de 1:2 para 1:4, ocorreu um aumento a conversão de 57% para 63% (ADAMCZAK et al., 2005).

Song e Wei (2002) investigaram a síntese de ascorbil oleato usando uma lipase imobilizada de *Candida* sp. e uma série de solventes orgânicos, entre eles, o álcool t-amílico ( $\log P = 1,15$ ) foi utilizado para o estudo, no qual a vitamina C foi suficientemente solúvel e a enzima se manteve estável. O produto (18,5 g/L) foi formado depois de 10 horas com 50 g/L de peneira molecular e temperatura de 50 °C, enquanto que 15 g/L de produto foi produzido na ausência de peneira molecular, em condições reacionais idênticas.

Stojanovic et al. (2013) estudaram a otimização da síntese de ascorbil oleato em acetona, a reação foi realizada em shaker a 250 rpm por 72 horas, as variáveis estudadas foram: teor de água, temperatura, quantidade de enzima, razão molar dos substratos e concentração de ácido L-ascórbico. Os autores observaram uma máxima conversão de 57%, na condição com 0,0118% de água, 55 °C, 0,8% de lipase, razão molar dos substratos de 1:12 e 0,07 M de ácido L-ascórbico.

### **2.2.2 Síntese de ascorbil ésteres em ultrassom**

A síntese enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom tem sido descrita na literatura como uma tecnologia promissora por contribuir para a solubilidade dos substratos, melhorar a transferência de massa, reduzir o tempo de reação e aumentar o rendimento. Porém, há poucos trabalhos na literatura sobre a produção enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom.

Entre os estudos relatados na literatura sobre a produção de ascorbil palmitato em ultrassom pode-se citar o realizado por Lerin et al. (2011), que avaliou a influência da temperatura (40-70 °C), da razão

molar (1:1-1:9) e da concentração de enzima (5-15%) na síntese enzimática de ascorbil palmitato. A maior conversão obtida neste estudo foi de 27%, na condição de temperatura de 70 °C, razão molar de 1:9, concentração de enzima de 5% e 100% de potência do ultrassom, com um tempo de reação de 3 horas. As cinéticas apresentadas neste estudo mostram uma conversão semelhante a obtida para a condição otimizada, 26% para um tempo de reação de 2 horas.

Wen et al. (2007) estudaram o efeito do ultrassom na síntese enzimática de ascorbil palmitato variando a potência do ultrassom (40%, 60%, 80% e 100%) a temperatura (20-80 °C), a razão molar, ácido palmítico:ácido L-ascórbico (1:1-1.5:1) e razão molar, ácido sulfúrico:ácido L-ascórbico (3:1-6:1). Neste estudo, os autores verificaram que o uso do ultrassom acelerou a velocidade de dissolução dos substratos e melhorou a transferência de massa, acelerando a velocidade da reação. O ultrassom promoveu um aumento no rendimento da reação de 85% para 93%, reduziu o tempo de reação 36 horas para 2 horas e minimizou o uso de solvente de 99% para 95%, para a condição otimizada de 35 °C de temperatura, 1,3:1 de razão molar de ácido palmítico e ácido L-ascórbico, tempo de reação de 2 horas e intensidade do ultrassom superior 0,71 W/cm<sup>2</sup>.

Assim, a síntese enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom torna-se uma tecnologia promissora, uma vez que apenas a produção de ascorbil palmitato foi relatada na literatura, porém com resultados relevantes. Os resultados apresentados na literatura estimulam a síntese de outros ascorbil ésteres em banho de ultrassom.

### **2.2.3 Ascorbil ésteres: aplicações**

Os antioxidantes são amplamente utilizados na indústria de alimentos e cosméticos para evitar as reações oxidativas. Entre os antioxidantes naturais, ácido L-ascórbico é o mais utilizado na estabilização dos produtos à base de água. No entanto, o ácido L-ascórbico é altamente hidrofílico, limitando sua aplicação em produtos formulados com derivados de petróleo e de gordura (COSTA et al., 2014). O problema da solubilidade pode ser contornado pela conversão de vitamina C hidrofílica em ésteres hidrofóbicos, ésteres de ascorbil, formando uma estrutura anfifílica, que melhora a sua solubilidade em ambientes lipofílicos, bem como, aumenta a capacidade de eliminação de radicais (LIU et al., 1996b). Ainda, cabe ressaltar que os ésteres de ácidos graxos derivados de ácido L-ascórbico não devem adicionar gosto, cheiro e cor indesejáveis aos alimentos e cosméticos.

O ascorbil oleato é uma molécula anfipática, ou seja, uma extremidade é hidrofílica e a outra é hidrofóbica, esta característica permite que o composto seja incorporado pelas membranas celulares. Quando incorporado pelas membranas celulares das hemácias humanas, o ascorbil oleato protege contra os danos oxidativos e protege o alfa-tocoferol, antioxidante solúvel em gordura, da oxidação por radicais livres (ROSS et al., 1999; LIU; MA; LIU, 1999).

Porém, os efeitos protetores dos ascorbil ésteres nas membranas celulares resumem-se a testes realizados *in vitro*. O uso de ascorbil ésteres por via oral pode não resultar na incorporação significativa pelas membranas celulares, pois a maior parte deste pode ser hidrolisada no trato digestivo humano antes que seja absorvido. O ácido L-ascórbico liberado pela hidrólise do ascorbil éster pode ser tão biodisponível quanto o ácido L-ascórbico sozinho (DE RITTER et al., 1951). No entanto, há estudos que afirmam que os ascorbil ésteres, como o ascorbil palmitato, são parcialmente absorvidos na sua forma íntegra (MAY et al., 1996).

A presença de ascorbil ésteres em suplementos orais contribui para o teor de ácido L-ascórbico do suplemento e ajuda a proteger as gorduras solúveis de oxidantes em suplementos. Isso também é válido para produtos alimentícios. Os ascorbil ésteres são utilizados em combinação com corantes alimentares, como  $\beta$ -caroteno e xantofilas para impedir a sua oxidação, como agentes redutores em pães, conferindo uma maior maciez a massa, e como agentes antimicrobianos (WATANABE et al., 2001). Entre os ascorbil ésteres, o mais conhecido e utilizado é o ascorbil palmitato, entretanto o ascorbil oleato é reconhecido como o mais ativo ascorbil éster, provavelmente devido à sua maior solubilidade. Porém, o ascorbil oleato não é utilizado em escala comercial na indústria de alimentos, apenas em uma menor escala em indústrias de cosméticos (VIKLUND; ALANDER; HULT, 2003).

O papel da vitamina C na promoção da síntese de colágeno e sua capacidade antioxidante tem gerado interesse no seu uso em cosméticos. Os ascorbil ésteres são frequentemente utilizados em preparações tópicas, porque são mais estáveis do que algumas preparações aquosas de vitamina C. Também é sugerido que esta forma de vitamina C é capaz de penetrar na pele e em membranas finas de células (devido à sua dupla solubilidade), e isto pode ajudar na produção de colágeno e elastina (AUSTRIA et al., 1997).

As propriedades antioxidantes do ascorbil palmitato e do ascorbil oleato foram comparadas em estudo realizado por Viklund, Alander e Hult (2003), 600 mg de cada antioxidante foram adicionados

em 1 kg de óleo de colza. O índice de peróxidos (IP) deste óleo foi avaliado ao longo de semanas a 30 °C e 40 °C. Os dados apresentados mostram que o desenvolvimento de peróxido em óleo foi acelerado após 4 semanas a 40 °C e 9 semanas a 30 °C para ascorbil oleato, enquanto que para ascorbil palmitato, o aparecimento de peróxido foi observado em 3 semanas a 30 °C e 2 semanas a 40 °C. Além disso, o conteúdo de tocoferol nas amostras de óleo foi analisado após 10 semanas a 40 °C. Apurou-se que o óleo sem ascorbil éster não apresentava tocoferol, enquanto 3% de  $\gamma$ -tocoferol foi encontrado na amostra com ascorbil palmitato e na amostra contendo ascorbil oleato, 57% de  $\gamma$ -tocoferol e 86%  $\delta$ -tocoferol foram observados. Isto demonstra que ascorbil oleato apresentou melhor atividade antioxidante comparado com o ascorbil palmitato.

### 2.3 LIPASES

Há um crescente interesse do setor industrial por tecnologias enzimáticas, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais expandiram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse podem-se citar as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (CASTRO et al., 2004).

As principais razões do uso das lipases em processos biotecnológicos estão relacionadas com a sua alta estabilidade em solventes orgânicos, por não requererem a presença de cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente ampla, possuir uma larga especificidade pelo substrato e exibirem uma alta enantiosseletividade. O reconhecimento dessas vantagens tem originado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2006).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3), capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese em grupamentos ésteres de diversos compostos. Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de água/lipídio, hidrolisando, principalmente, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) (VILLENEUVE et al., 2000; CÔTÉ; SHARECK, 2008). Estas enzimas têm a capacidade de catalisar tanto reações de hidrólise de acilgliceróis, quanto atuar na síntese de ésteres a partir de

glicerol e ácidos graxos de cadeias longas (VILLENEUVE et al., 2000). O deslocamento do equilíbrio na reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela quantidade de água presente na mistura do meio reacional (OLIVEIRA et al., 2000).

As lipases normalmente são encontradas em tecidos de animais (pâncreas, fígado e mucosa gástrica) e vegetais (sementes, polpas e raízes), podendo também ser produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases produzidas por microrganismos apresentam vantagens em relação às obtidas a partir de fontes animais e vegetais, devido à sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las e custo inferior (CASTRO et al., 1995).

A estabilidade das lipases depende de sua origem, sendo que as de procedência microbiana possuem maior estabilidade térmica (VULFSON, 1994; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 2002). A temperatura de operação dessas enzimas pode variar desde à ambiente até 70 °C, mas em sua maioria, possuem uma atividade de ótimo entre 30 °C e 40 °C. A termoestabilidade da lipase também depende da origem, e da sua massa molecular que varia entre 20 KDa e 75 KDa e da faixa de pH relacionada a atividade, variando entre 4 a 9 com um máximo situado entre 6 e 8 (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005).

As lipases também podem apresentar como características a especificidade ou seletividade em relação a um substrato (químico), à posição (regio) e a isômeros (estéreo). As reações de hidrólise catalisadas pelas lipases abrangem a maior parte das aplicações industriais (indústrias de detergentes e de alimentos), porém a transesterificação juntamente com as características enantio e régio seletivas das lipases vêm ganhando espaço nos mais diversos campos (indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais) (CASTILHO et al., 2000; VILLENEUVE, 2003).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. As lipases constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala (HASAN et al., 2006). Estas enzimas apresentam muitas vantagens em processos de biotransformações, em função de sua grande afinidade por um largo espectro de substratos, versatilidade quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial (PANDEY et

al., 1999). As áreas nas quais a aplicação das lipases têm ganhado destaque podem ser visualizadas no Quadro 1 (WAKABAYASHI, 2004; BARON, 2003).

O maior empecilho atualmente encontrado na aplicação de enzimas lipolíticas em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de modificação, e imobilização de enzimas lipolíticas têm grande possibilidade de mudar este quadro no futuro (SAXENA et al., 2003; CIPOLATTI et al., 2014).

Quadro 1- Relação dos setores, tipos de aplicação e produtos obtidos com utilização de lipases.

Setor industrial	Aplicação	Produto	Referência
Alimentício	Processamento de carnes e peixes	Produtos embutidos	MOTOKI; SEGURO, 1998
	Transesterificação de óleos	Manteiga de cacau	PAQUES; MACEDO, 2006; HASAN et al., 2006
	Melhorar aroma e remover excesso de gorduras	Maionese, molhos e cremes	SISAK et al., 2006
	Síntese de ésteres	Ésteres e emulsificantes	FREIRE; CASTILHOS, 2008; PAQUES; MACEDO, 2006
	Hidrólise de gordura do leite	Agentes aromatizantes para produtos lácteos	PAQUES; MACEDO, 2006; HASAN et al., 2006; FREIRE; CASTILHOS, 2008
Químico	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	PAQUES e MACEDO, 2006; HASAN et al., 2006; FREIRE; CASTILHOS, 2008
	Síntese de ésteres	Ésteres	BORNSCHEUER, 2002; WATANABE et al., 2007
Médico	Dosagem de triglicerídeos do sangue	Kit diagnóstico	FREIRE; CASTILHOS, 2008 <i>apud</i> MACHADO, 2011
Cosméticos	Remoção de lipídeos, hidratação, clareamento de manchas	Cosméticos em geral	GUTH; LENTNER, 2006

Fonte: ITABAIANA (2014).

## 2.4 BIOCATALISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS

A catálise enzimática inicialmente restringia-se ao emprego de reações em meio aquoso. Dessa forma, o potencial de utilização das enzimas em síntese orgânica era minimizado devido à baixa solubilidade de alguns substratos em água (GARCÍA-JUNCEDA et al., 2004). Com o intuito de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos introduziu-se o uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas (MAY et al., 2002).

A substituição da água por solventes orgânicos apresenta uma série de vantagens. Entre estas, a mudança do equilíbrio reacional favorecendo a esterificação ao invés da hidrólise, as reações competitivas são desfavorecidas prevenindo a decomposição de compostos sensíveis à água, fácil recuperação das enzimas, maior estabilidade enzimática, a especificidade do substrato pode ser alterada e uso de substratos não polares (PEDERSEN et al., 2002; GOTOR-FÉRNANDEZ et al., 2006).

A polaridade dos solventes afeta fortemente as reações enzimáticas, uma vez que a alta atividade do biocatalisador é atingida em solventes relativamente hidrofóbicos, e nenhuma ou baixa atividade é observada em solventes relativamente hidrofílicos, devido aos efeitos de desnaturação deste catalisador (CASTRO; ANDERSON, 1995).

Na catálise enzimática em meios orgânicos, a solubilidade dos substratos pode ser um fator limitante a algumas reações, devido, as moléculas polares, como os carboidratos, possuem baixa solubilidade nesses solventes (ARCOS et al., 1998). Assim, tanto a taxa quanto a velocidade reacional na esterificação de carboidratos é diretamente proporcional à solubilidade dos mesmos (OOSTEROM et al., 1996).

O critério mais relevante na seleção de um solvente orgânico é sua compatibilidade com o catalisador e os substratos da reação. Na seleção do solvente, os critérios analisados incluem fatores físico-químicos, como a capacidade de solubilizar os substratos e de permitir a transferência de massa. Este solvente deve apresentar estabilidade química e térmica, não deve ser tóxico ao ambiente nem prejudicial para a saúde e não deve formar emulsões em meio aquoso, de forma a facilitar a separação de fases ao final da reação (HALL et al., 1988). A escolha do solvente orgânico também deve considerar que o mesmo não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima, necessária para manter sua conformação nativa (CASTRO; ANDERSON, 1995).

As reações de catálise envolvendo o uso de lipases têm ganhado destaque, devido a estas apresentarem uma alta estabilidade em solventes orgânicos. As lipases podem ser usadas para sintetizar ésteres sob condições com baixa disponibilidade de água. Contudo, solventes orgânicos não-polares, tal como hexano, heptano e ciclohexano, têm sido usados como meio de reação para a síntese de ésteres de diferentes ácidos graxos (KUMAR et al., 2004). A escolha do solvente orgânico para reações catalisadas por lipases é conhecida como sendo o fator mais importante em reações de enantioseletividade (WESCOTT; KLIBANOV, 1993; NAKAMURA et al., 1994).

No entanto, cabe ressaltar que a forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses apresentadas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (COSTA; AMORIM, 1999). Nos estudos científicos sobre a influência do solvente na catálise enzimática é possível observar a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações (LERIN et al., 2010).

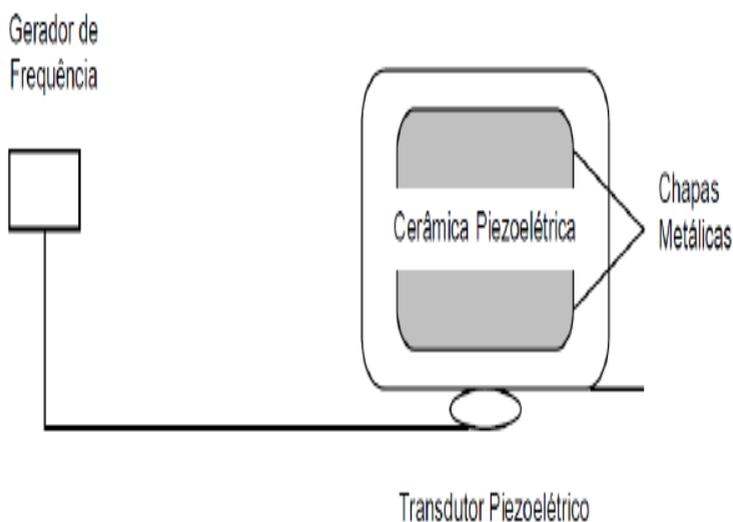
## 2.5 CATÁLISE ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM

Os estudos que abordam o uso do ultrassom relatam que a descoberta deste ocorreu em 1880 enquanto o casal Pierre e Marie Curie estudava o efeito piezoelétrico e, 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, este fenômeno ficou conhecido como cavitação. Já a aplicação das ondas ultrassônicas comercialmente ocorreu em 1912 quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation And Ranging), aparelho capaz de medir a profundidade do mar. Em 1927, os efeitos do ultrassom foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados. Entretanto, foi a partir de 1980 que a sonoquímica teve grande avanço e muitos trabalhos foram publicados em diferentes sistemas (MARTINEZ et al., 2000).

A fonte de energia ultrassonora é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico (Figura 4). O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais; o transdutor

transmite os impulsos ultrassonoros ao meio reacional (BARBOSA e SERRA, 1992).

Figura 4 – Esquema genérico de um banho ultrassom



Fonte: BABICZ (2009).

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassonora é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassonora, e conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais (SINISTERRA, 1992).

A região do ultrassom pode ser dividida em duas áreas principais: alta potência e baixa potência. As ondas sonoras de alta frequência (2-10 MHz) são aplicadas nas áreas da Biologia (homogeneização, rompimento de células), Engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), Geologia (localização do mineral, depósito de óleo), Industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc.), Medicina (esterilização, fisioterapia, inalações), Física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas,

velocidade do som) e Polímeros (polimerização, despolimerização, degradação do peso molecular) (MARTINEZ et al., 2000).

As ondas sonoras de baixa frequência, com frequência maior que 20 kHz, são usadas em campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco (BARBOSA e SERRA, 1992). O ultrassom de alta frequência (1-10 MHz) causa permanente mudança física e química porque produz cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (BOLDYREV, 1995).

A propagação das ondas ultrassônicas é um fenômeno físico e ocorre por meio de um corpo vibrando que transmite seu movimento às moléculas adjacentes e estas transmitem às outras ao seu redor antes de retornarem à sua posição de equilíbrio. Assim, mantendo este movimento, ocorre a criação de ciclos de compressão e expansão (SINISTERRA, 1992).

Quando em meios líquidos, este ciclo gera cavidades que aumentam durante a expansão, pois os gases adsorvidos no líquido e os próximos à cavidade evaporam, promovendo aumento de tamanho. Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode liberando calor e pressão muito elevados em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido, fenômeno conhecido como cavitação (KORN et al., 2003).

No processo de cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis e as transitórias. As primeiras oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido, na fase de descompressão. Estas precisam de vários ciclos de expansão e compressão para atingir o volume crítico e podem tornar-se transitórias, bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo, então, responsáveis pela cavitação (SINISTERRA, 1992).

Existem diversos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999).

Os estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira região corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada “ponto quente”, onde se inicia a implosão

cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (LIU et al., 2008).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (LIU et al., 2008).

Em sistemas com líquidos imiscíveis, este colapso das microbolhas pode promover uma eficiente agitação, aumentando a velocidade de formação de gotículas microscópicas, aumentando a superfície de contato e as forças coesivas, formando micro-emulsões. Espécies reativas e a indução de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas também podem ocorrer (LIU et al., 2008).

A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (BABICZ, 2009).

Entretanto, a temperatura pode agir como o fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas, uma vez que as enzimas podem ser inativadas termicamente. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas. Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40 kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase.

Nas reações em ultrassom também é importante considerar o solvente que será utilizado. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, pois ocorre aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona como um mecanismo de proteção porque as moléculas de água encontram-se em torno da enzima, desta forma não são facilmente movidas pelo ultrassom (MARTINEZ et al., 2000).

A adição de solvente ao meio reacional conduzido em ultrassom também influencia a transferência de massa. Sabendo-se que o ultrassom em baixas intensidades aumenta o movimento do meio, favorecendo o fluxo de reagentes para o sítio ativo da enzima, um solvente mais volátil aumenta o efeito cavitacional, podendo favorecer a reação. Entretanto, a intensidade e/ou o tempo de irradiação pode levar à inativação da enzima via colapso cavitacional.

Diversos estudos relacionados com a síntese enzimática de ésteres assistida por ultrassom, com ou sem a presença de solventes orgânicos, são encontrados na literatura (Tabela 2) (LERIN et al., 2014).

O uso do ultrassom tem sido descrito na literatura em catálise enzimática para avaliar o comportamento da atividade da enzima, a estabilidade e otimização de variáveis operacionais. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre o efeito do ultrassom nas mudanças conformacionais da estrutura e do sítio ativo das enzimas. Assim, os resultados encontrados na literatura sobre reações enzimáticas assistidas por ultrassom tornam esta uma tecnologia promissora para trabalhos futuros que visam um melhor rendimento reacional e um menor tempo reacional, por meio de uma tecnologia limpa (ROKHINA et al., 2009; LERIN et al., 2014).

Tabela 2 – Estudos sobre esterificação enzimática assistida por ultrassom.

<b>Substrato</b>	<b>Solvente</b>	<b>Enzima</b>	<b>Produto</b>	<b>Produto (%)</b>	<b>Referências</b>
2-azido-1-feniletanol e acetato de vinila	Sistema livre de solvente	Lipase Amano OS	Vicinal azido acetato	45	BRENELLI e FERNANDES, 2003
Glicose e divinil butanodiato	Terc-butanol	Novozym 435	Ésteres de açúcar	85	XIAO et al., 2005
Konjac	Terc-butanol	Novozym 435	6-O-acetato-KGM	96,1	CHEN et al., 2008
Glucomanano e ésteres de vinil			6-O-n-butirato-KGM	94,5	
			6-O-n-octanoato-KGM		
			6-O-laurato-KGM	90,0	

---

		6-O-estearato-KGM			
				87,3	
				82,5	
Xilitol e ácido oleico	Terc-butanol	Lipase <i>P. camembertii</i>	Ésteres de xilitol	78	RUFINO et al., 2010
		Lipase <i>B. cepacia</i>		62	
		Lipase <i>P. fluorescens</i>			
		Lipase Porcine		41	
		Pâncreas			
				27	
Glicose e laurato de vinil	Líquidos iônicos	Novozym 435	Ésteres de açúcar	90	LEE et al., 2008

---

---

Frutose e ácido palmítico	Líquidos iônicos	Novozym 435	Palmitato de frutose	78	HA, HIEP, KOO, 2010
Frutose e ácido palmítico	Butanona	Novozym 435	Palmitato de frutose	62	ZHU et al., 2003
Benzoato de metila e glicerol	2-propanol	Novozym 435	Benzoato de 1-glicerila	16	CENI et al., 2011
Ácido caféico e 2-fenil etanol	Iso-octano	Novozym 435	Éster fenetílico do ácido caféico	96,08	CHEN et al., 2011a
Ácido caféico e 2-fenil etanol	Iso-octano	Novozym 435	Éster fenetílico do ácido caféico	92,11	CHEN et al., 2011b
Ácido L-ascórbico e ácido palmítico	Terc-butanol	Novozym 435	Ascorbil palmitato	27	LERIN et al., 2011

---

Fitosteróis e óleo de colza	Iso-octano	Novozym 435	Ésteres de fitoesterol	93,5	ZHENG et al., 2012
(R / S) -1-cloro-3- (1-naftiloxi) -2-propanol e propionato de vinil	n-Hexano	Lipase <i>Pseudomonas</i> sp.	(S)-propranolol	52,5	WANG et al., 2012
Aminas aromáticas e brometo de propila	Etanol	Lipase <i>Pseudomonas</i> sp.	Aminas aromáticas de mono-N-alquila	85	LOBO et al., 2013
Resveratrol e acetato de vinil	2-Metil-2-Butanol	Novozym 435	4-acetóxi-resveratrol	77	KUO et al., 2013
4MCA e glicerol	Iso-octano	Novozym 435	4-Metóxi cinamoil glicerol (4MCG)	66	GUO et al., 2013
Rutina e ácido $\alpha$ -linolênico	Acetona e 2-metil-2-butanol	Novozym 435	Ésteres de flavonoides	92,5	ZHENG et al., 2013
Naringina e ácido $\alpha$ -linolênico				90,1	

---

Ácido acético e butanol	n-Hexano	Novozym 435	Acetato de butila	99,3	AWADALLAK et al., 2013
----------------------------	----------	-------------	-------------------	------	------------------------

---

Fonte: LERIN et al. (2014).

## 2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crescente busca por processos alternativos para a obtenção de antioxidantes naturais, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, vem despertando grande interesse no âmbito acadêmico e tecnológico, a leitura do estado da arte revelou que a síntese de ascorbil ésteres em banho de ultrassom ainda é um assunto insipiente.

Os antioxidantes são amplamente utilizados na indústria de alimentos e cosméticos para evitar as reações oxidativas. O ácido L-ascórbico destaca-se como o antioxidante natural mais utilizado na estabilização dos produtos à base de água, porém este antioxidante é altamente hidrofílico, limitando sua aplicação em produtos lipofílicos. Assim, uma alternativa é a conversão da vitamina C hidrofílica em ésteres hidrofóbicos, ésteres de ascorbil, formando uma estrutura anfifílica, que melhora a sua solubilidade em ambientes lipofílicos, bem como, aumenta a capacidade de eliminação de radicais. De fato, cabe ressaltar que se verificou a existência de poucos trabalhos voltados à síntese enzimática de ascorbil ésteres, conferindo assim relevância a presente investigação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionados à produção de ascorbil oleato. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), na Central de Análises, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), e no Laboratório de Farmacognosia do Centro de Ciências da Saúde (CCS), todos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade.

Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, investigou a síntese enzimática de ascorbil palmitato em banho de ultrassom, utilizando técnicas de planejamento experimental (Lerin, 2010). Neste estudo, as variáveis estudadas foram a razão molar ácido L-ascórbico e ácido palmítico, temperatura e concentração de enzima. Os resultados demonstraram que a melhor conversão foi obtida com razão molar de 1:9, concentração de enzima de 5%, potência do ultrassom de 100% e temperatura de 70 °C, em 3 horas de reação.

A partir destes resultados foi dada continuidade aos estudos desta dissertação utilizando como substratos o ácido L-ascórbico e ácido oleico.

O fluxograma da Figura 5 apresenta a sequência dos ensaios realizados. Ensaios preliminares foram realizados para selecionar o solvente capaz de solubilizar os substratos da reação de síntese de ascorbil oleato. Posteriormente, utilizou-se o solvente selecionado (terc-butanol), e avaliou-se o efeito da temperatura (50 °C e 70 °C) e da razão molar dos substratos (1:3, 1:6 e 1:9), ácido L-ascórbico e ácido oleico, na cinética reacional (Etapa II). Nestas mesmas condições, realizou-se uma cinética sem adição de enzima para verificar se o sistema reacional seria autocatalítico sob sonicação. Também se investigou o efeito do ultrassom na conversão de ascorbil oleato, neste ensaio, apenas a solubilização dos substratos foi assistida pelo ultrassom.

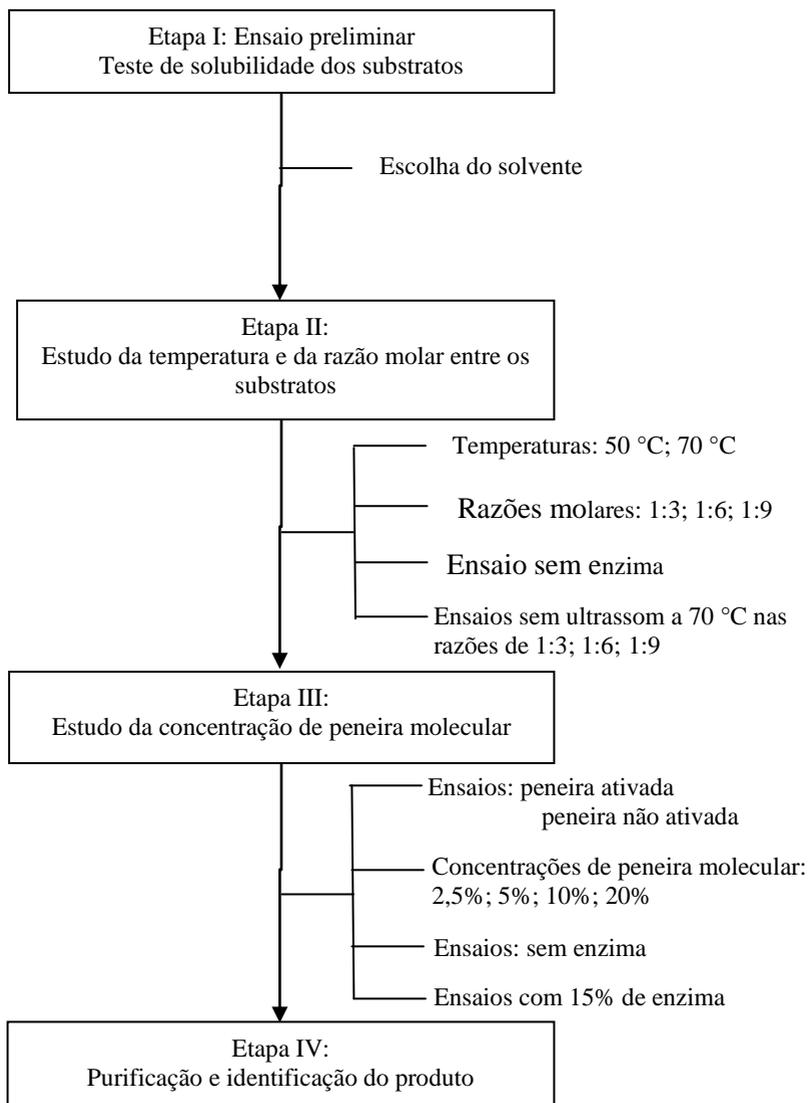
Na terceira etapa dos ensaios utilizou-se a peneira molecular de 4 Å, como adsorvente para retirada de água da reação. Nesta etapa, realizou-se as cinéticas reacionais com a melhor condição observada na etapa II, temperatura de 70 °C e razão molar de 1:9, variando-se apenas a concentração de peneira molecular, pré-ativadas ou não (2,5%; 5%; 10% e 20%). Para investigar o efeito da peneira molecular na conversão

de ascorbil oleato, uma cinética somente com substratos e peneira molecular, sem adição de enzima também foi estudada.

Posteriormente, com a finalidade de verificar o efeito do aumento da concentração de enzima na produção em ascorbil oleato, realizou-se uma cinética da reação com razão ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:9, temperatura de 70 °C, 20% de peneira molecular e 15% de enzima.

A quarta etapa, envolveu a purificação e caracterização do produto obtido na reação enzimática.

Figura 5 - Etapas desenvolvidas no projeto de síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.



Fonte: O autor.

## 3.1 MATERIAIS

### 3.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese enzimática de ascorbil oleato em ultrassom:

- a) Ácido oleico P.A. (99%, Vetec);
- b) Ácido L-ascórbico P.A. (99%, Vetec);
- c) terc-Butanol P.A. (99,5%, Vetec);
- d) Peneira molecular 4 Å (4-32 Mesh, Sigma-Aldrich).

Para o teste de solubilidade dos substratos, foram utilizados os solventes:

- a) isopropanol, hexano, etanol, ácido acético, dimetilsulfóxido, ciclohexano, isoctano, n-heptano, tolueno, xileno, acetona, terc-butanol e terc-pentanol ( $\geq 90\%$ , Vetec).

Para a quantificação do produto, ascorbil oleato, foram utilizados:

- a) Metanol grau HPLC (UV/HPLC – grau espectroscópico, Vetec);
- b) Água (*Milli-Q*);
- c) Ácido acético P.A. (99%, Vetec).

Para purificação do produto, ascorbil oleato, foram utilizados:

- a) Sílica gel 60, cromatofolha alumínio para TLC (Merck);
- b) Sílica gel para cromatografia 60 Å (220-440 mesh, tamanho de partícula 35-75  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich);
- c) Acetato de etila P.A. ( $\geq 90\%$ , Quemis);
- d) Hexano P.A. ( $\geq 90\%$ , Vetec).

### 3.1.2 Enzima

A lipase comercial de origem microbiana Novozym 435 foi utilizada neste trabalho. Esta lipase é produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária - PR. A enzima atua aleatoriamente nas posições 3 do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm e densidade de aproximadamente 430  $\text{kg/m}^3$ . Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 - 2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40 a 70 °C (NOVO NORDISK, 1992; WANG et al., 2014).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Teste de solubilidade dos substratos

Como etapa preliminar à reação de síntese de ascorbil oleato foi avaliada a solubilidade dos substratos: ácido L-ascórbico e ácido oleico.

A avaliação da solubilidade dos substratos, ácido L-ascórbico e ácido oleico foi realizada mantendo fixa a temperatura (70 °C), razão molar entre os substratos (1:9), concentração enzimática (5% (m/m)) (HUMEAU et al., 1995; LERIN et al., 2010). Como solventes foram testados: isopropanol, hexano, etanol, ácido acético, dimetilsulfóxido, ciclo hexano, isooctano, n-heptano, tolueno, xileno, acetona, terc-butanol e terc-pentanol.

Os ensaios foram realizados em banho de ultrassom (modelo USC 1800A, UNIQUE – com controle de temperatura, frequência de 40 kHz e potência máxima de 132 W), no qual diferentes volumes de solventes foram avaliados (5 a 20 mL).

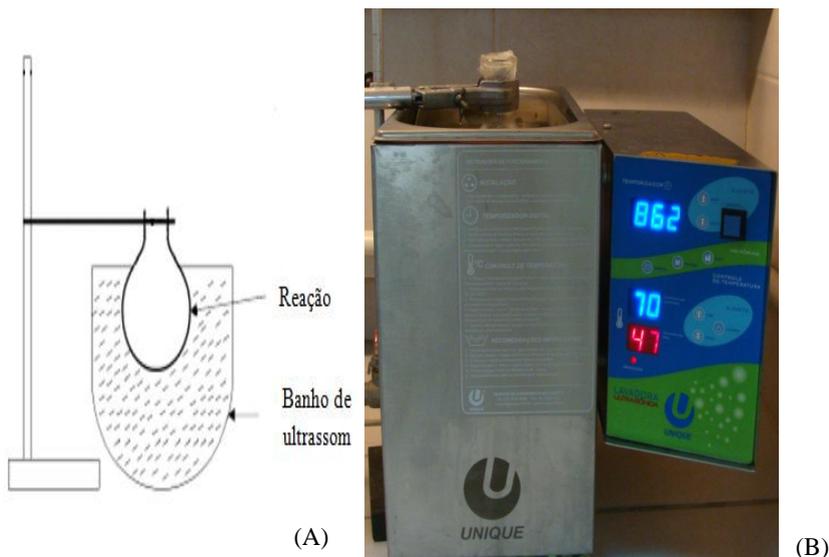
### 3.2.2 Procedimento experimental para síntese enzimática de ascorbil oleato

As reações de síntese enzimática de ascorbil oleato assistidas por ultrassom foram conduzidas em um balão de 50 mL. Para cada experimento, eram medidos 0,23 g de ácido L-ascórbico e a quantidade de ácido oleico correspondente à razão molar em estudo (aproximadamente 1,15 g (1:3), 2,30 g (1:6) e 3,46 g (1:9)) e a reação somente era iniciada pela adição da enzima (5% (m/m)), com base na massa de substratos (ácido L-ascórbico + ácido oleico), após a dissolução completa dos substratos em solvente pré-selecionado (item 3.2.1). O tempo reacional foi contado a partir da adição desta.

A Figura 5 apresenta o aparato experimental utilizado nos experimentos de síntese enzimática de ascorbil oleato.

Após o término do tempo de reação, a enzima e a peneira molecular (caso utilizada) foram filtradas e as amostras foram secas em estufa a vácuo (Quimis) a 40 °C até massa constante, para remoção do solvente. Todas as amostras foram mantidas em refrigerador a 4 °C, para posterior análise.

Figura 6 – Aparato experimental da síntese enzimática de ascorbil oleato em ultrassom.



(A) Esquema da síntese enzimática de ascorbil oleato em ultrassom.

(B) Equipamento utilizado.

Fonte: Adaptado de BABICZ (2009).

### 3.2.3 Estudo cinético da síntese enzimática de ascorbil oleato

Com o solvente pré-selecionado, cinéticas não destrutivas foram realizadas, fixando volume de solvente (20 mL de terc-butanol), potência do ultrassom (100%) e a concentração de enzima (5% m/m). As cinéticas realizadas foram de até 12 horas e alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos 0; 0,5; 1; 3; 6; 9 e 12 horas.

As tabelas 3, 4, 5, 6 apresentam as condições estudadas para verificar o efeito combinado da razão molar e da temperatura; do ultrassom, da concentração de peneira molecular, pré-ativadas ou não e da concentração de enzima, utilizadas na síntese de ascorbil oleato, respectivamente. Quando estudada a adição de peneira molecular ativada, esta foi pré-ativada em estufa (Odontobras) a 100 °C por 24 horas.

Tabela 3 – Efeito combinado da razão molar entre os substratos e da temperatura na síntese enzimática de ascorbil oleato.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão molar (mol/mol)*</b>
50	1:3; 1:6; 1:9
70	1:3; 1:6; 1:9

\* Razão molar entre os substratos: ácido L-ascórbico/ácido oleico.

Tabela 4 – Efeito do ultrassom na síntese enzimática de ascorbil oleato.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão molar (mol/mol)*</b>
70	1:3; 1:6; 1:9

\* Razão molar entre os substratos: ácido L-ascórbico/ácido oleico.

Tabela 5 – Efeito da concentração de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato.

<b>Razão molar (mol/mol)*</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentração de peneira molecular (%)**</b>
1:9	70	20; 10; 5; 2,5 (1,10; 0,55; 0,27; 0,13 g)

\* Razão molar entre os substratos: ácido L-ascórbico/ácido oleico.

\*\* %, com base na capacidade adsortiva da peneira molecular.

Tabela 6 – Efeito da concentração de enzima na síntese enzimática de ascorbil oleato.

<b>Razão molar (mol/mol)*</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentração de peneira molecular (%)**</b>	<b>Concentração de enzima (%)</b>
1:9	70	20 (1,10 g)	5; 15 (0,18; 0,54 g)

\* Razão molar entre os substratos: ácido L-ascórbico/ácido oleico.

\*\* %, com base na capacidade adsortiva da peneira molecular.

A fim de investigar se o sistema reacional seria autocatalítico sob sonicação, ou seja, uma cinética sem adição de enzima também foi realizada. Também verificou-se um possível efeito da peneira molecular na conversão de ascorbil oleato, assim, uma cinética somente com

substratos e peneira molecular, sem adição de enzima também foi estudada.

### 3.3.4 Quantificação do produto

A análise de quantificação do produto foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC system - Perkin-Elmer Series 200), acoplado a detector UV-VIS. Os seguintes instrumentos e condições foram usados: coluna C-18 Phenomenex (300 x 4 mm, 5 $\mu$ m), vazão de 1,0 mL/min, detector a 254 nm, a fase móvel metanol:H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético (95:5, v/v). A fase móvel foi utilizada como uma amostra de dissolução do solvente, e o volume de injeção foi 1  $\mu$ L. A determinação da conversão das reações foi efetuada acompanhando a redução da área do agente limitante, ácido L-ascórbico.

### 3.3.5 Cálculo da velocidade inicial de reação

A velocidade inicial de reação corresponde à velocidade inicial constante de produção de ascorbil oleato, em que a concentração do produto varia linearmente com o tempo. A velocidade inicial de reação ( $r$ ) é determinada dividindo-se a variação de conversão num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética.

A velocidade inicial de reação ( $r$ ) foi calculada da seguinte forma:

$$r = \frac{dC}{dt}_{t=0}$$

Onde:

$r$  = taxa inicial de reação (min<sup>-1</sup> ou h<sup>-1</sup>);

$C$  = conversão de ascorbil oleato no tempo  $t$  (%);

$C_0$  = conversão de ascorbil oleato no tempo 0 (%);

$t$  = tempo de reação (min ou h);

$t_0$  = tempo inicial de reação (min ou h).

### 3.3.6 Purificação do produto

Para as análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H foi necessária a purificação do produto obtido. Primeiramente, realizou-se cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar os compostos presentes na amostra obtida via síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico. Foram utilizadas como fase estacionária placas de sílica

gel (TLC) e na fase móvel uma mistura de acetato de etila e n-hexano, na proporção volumétrica de 50:50, respectivamente. Após a corrida, as cromatoplacas foram reveladas com iodo.

A purificação da amostra foi realizada utilizando-se a cromatografia em coluna. A extremidade inferior da coluna foi fechada com algodão e empacotou-se com uma mistura, formada por sílica gel 60 e solvente [acetato de etila:n-hexano, 50:50 (v/v)]. A amostra foi diluída em 5 mL de acetato de etila:n-hexano [50:50 (v/v)], introduzida na coluna e, em seguida acrescentada a fase móvel, composta de acetato de etila e n-hexano [50:50 (v/v)]. As frações coletadas foram avaliadas por cromatografia de camada delgada (CCD), para confirmação da purificação da amostra.

### **3.3.7 Identificação do produto**

Os espectros da Ressonância Magnética Nuclear RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos no Laboratório da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, no equipamento de ressonância magnética nuclear, modelo Varian Mercury Plus AS - 400 MHz, em 100 MHz, usando clorofórmio-d1 ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo tem por objetivo apresentar os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados à seleção do solvente orgânico, à produção de ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom, aos estudos cinéticos realizados, à purificação do produto obtido e às análises de ressonância magnética nuclear – RMN realizadas para verificar a estrutura do produto da reação.

### 4.1 SELEÇÃO DO SOLVENTE

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de solubilidade dos substratos, ácido L-ascórbico e ácido oleico, em diferentes solventes, realizados seguindo o método apresentado no item 3.2.1.

Como observado na Tabela 6, o ácido L-ascórbico e o ácido oleico apresentaram uma relativa dificuldade de solubilização na grande maioria dos solventes testados, sendo solúveis apenas nos solventes terc-butanol, etanol e DMSO. Ainda pode-se perceber que a solubilidade depende do volume de solvente aplicado nos testes.

A influência da natureza do solvente tem sido descrita na literatura em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente. Porém, não existe um consenso claro com relação à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. O parâmetro mais frequentemente utilizado é o  $\log P$ , definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água ( $\log P$ ) (DALLA-VECHIA et al., 2004).

Tabela 7 – Teste de solubilidade do ácido L-ascórbico e ácido oleico em diferentes solventes.

Solvente	Log P	Volume de solvente (mL)		
		5	10	20
DMSO	-1,30	S	S	-
Etanol	-0,30	I	S	-
Acetona	-0,23	I	I	-
ácido acético	-0,17	I	I	-
isopropanol	0,05	I	I	-
terc-butanol	0,58	I	I	S
Butanol	0,88	I	I	-
terc-pentanol	1,09	I	I	-
Tolueno	2,72	I	I	-
Xileno	3,15	I	I	-
ciclo-hexano	3,2	I	I	-
Hexano	3,5	I	I	-
n-heptano	4,0	I	I	-
Isooctano	4,3	I	I	-

\* Razão molar ácido L-ascórbico:ácido oleico: 1:9 (0,23:3,46 g).

S-Solúvel

I-Insolúvel

- Não foi testado

Os solventes que possuem  $\log P \leq 2$  são denominados hidrofílicos e não são considerados adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem  $\log P \geq 4$  são denominados hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, mantendo o biocatalisador no seu estado ativo (DALLA-VECHIA et al., 2004). Entretanto, os resultados obtidos para o sistema reacional (ácido L-ascórbico e ácido oleico) mostram que este não foi solúvel nos solventes n-heptano e isooctano, que possuem  $\log P \geq 4$ .

Apesar dos substratos ácido L-ascórbico e ácido oleico serem solúveis em etanol, este não é considerado um bom solvente em reações de esterificação, uma vez que compete com os substratos (SUTILI et al., 2013). Já o solvente DMSO pode causar efeitos de inibição ou até mesmo inativar o biocatalisador, não sendo adequado para catálise enzimática (PLOU et al., 2002). Pelo fato de o solvente terc-butanol apresentar temperatura normal de ebulição de 82,2 °C, facilitando desta forma, a execução de experimentos a temperaturas mais elevadas, este

foi escolhido para ser utilizado nos experimentos na presença de solventes orgânicos, além de já serem descritas na literatura algumas reações de esterificação utilizando o terc-butanol como solvente (LERIN et al., 2012).

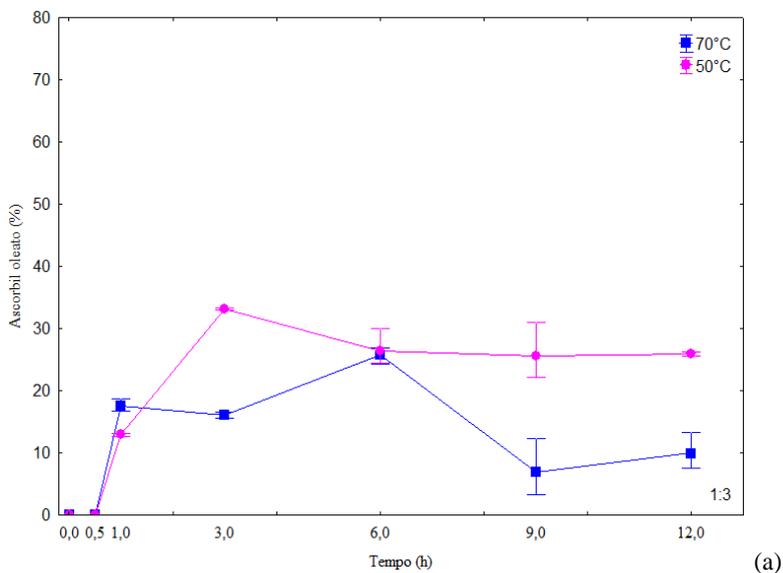
## 4.2 CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO EM BANHO DE ULTRASSOM

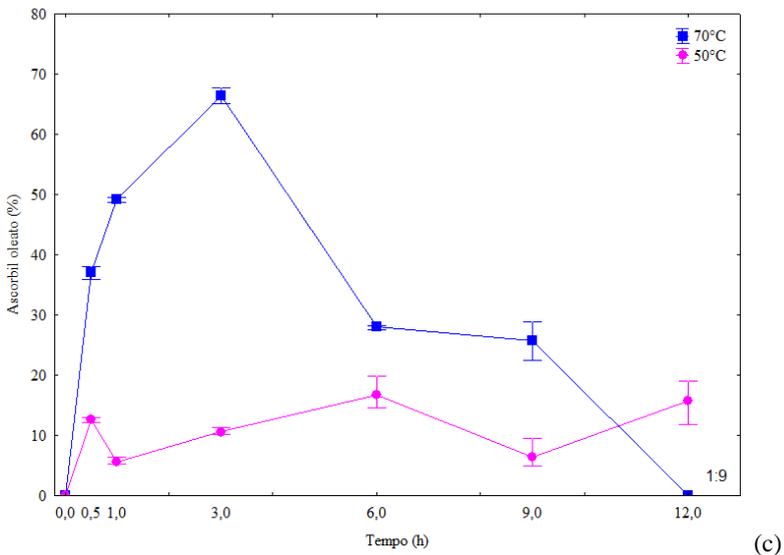
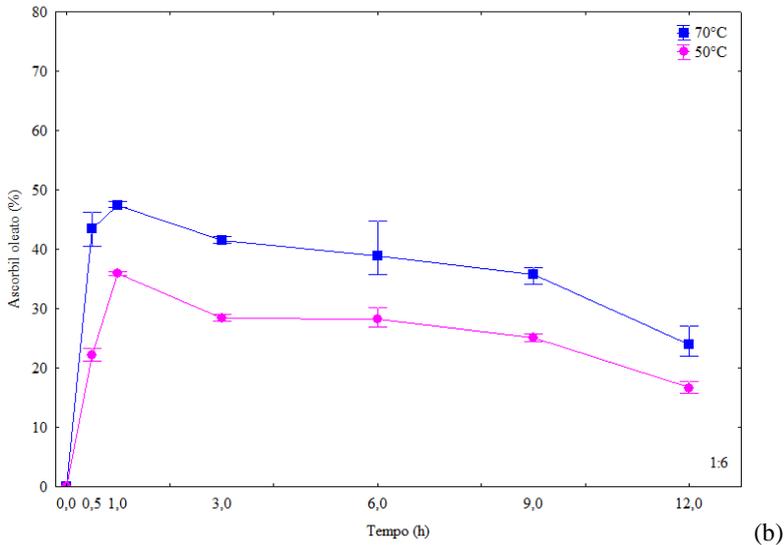
Os efeitos da razão molar ácido L-ascórbico e ácido oleico, temperatura, emprego do ultrassom, concentração da peneira molecular e concentração de enzima foram investigados sobre a cinética de produção enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.

### 4.2.1 Efeito da temperatura e da razão molar entre os substratos

A Figura 7 apresenta o efeito da variação da temperatura (50 °C, 60 °C e 70 °C) nas diferentes razões molares dos substratos 1:3, 1:6 e 1:9. A concentração de enzima foi fixada em 5% (m/m), a potência do ultrassom em 100% e o volume de solvente em 20 mL de terc-butanol. As linhas apenas ligam os pontos experimentais e não representam qualquer ajuste, sendo utilizadas apenas para facilitar a visualização do andamento da reação.

Figura 7 - Cinética do efeito da temperatura (50 °C e 70 °C) nas três diferentes razões molares de ácido L-ascórbico:ácido oleico, 1:3 (a), 1:6 (b) e 1:9 (c), na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais da reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 10,95; 4,48 (a), 37,55; 55,35 (b) e 3,00; 54,12 (c), nas temperaturas de 50 °C e 70 °C, respectivamente.





\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de análise e não de experimento.

Os resultados observados na Figura 7 mostram que a conversão em ascorbil oleato é dependente do efeito combinado da razão molar

ácido L-ascórbico:ácido oleico e temperatura. O efeito da temperatura torna-se mais evidente com o aumento da razão molar, a associação da maior razão molar (1:9) com a maior temperatura (70 °C) promoveu a maior conversão em ascorbil oleato em um menor tempo, 66% em 3 horas.

Este mesmo comportamento foi observado por Lerin (2010), que realizou estudo cinético da produção de ascorbil palmitato em banho de ultrassom, no qual avaliou a influência da temperatura (50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C) e razão molar ácido L-ascórbico:ácido palmítico (1:1, 1:3, 1:6 e 1:9). Os experimentos foram conduzidos em ultrassom com 100% de potência, 5% (m/m) de enzima e 20 mL de terc-butanol. As maiores conversões em ascorbil palmitato (27% e 35%) foram obtidas quando em temperaturas elevadas (70 °C e 80 °C) e na maior razão molar testada (1:9), em 3 horas de reação.

Entretanto, cabe ressaltar que este resultado pode estar relacionado com solvente selecionado (terc-butanol), bem como o volume deste (20 mL), uma vez que o ensaio de solubilidade dos substratos foi realizado fixando-se a razão molar entre os substratos em 1:9 e a temperatura em 70 °C. Ao variar a razão molar dos substratos ácido L-ascórbico:ácido oleico pode ocorrer uma mudança na solubilidade do sistema, sendo possível assim, que o volume de solvente, tal como solvente escolhido difiram para cada razão molar estudada.

Song e Wei (2002), ao estudar a síntese enzimática de éster de vitamina C, verificaram que o solvente orgânico influencia na solubilidade dos substratos, podendo afetar a síntese de ascorbil éster, comprovando que a polaridade do ácido L-ascórbico é muito diferente da do ácido oleico e do ascorbil oleato, devido a essa diferença significativa na polaridade, tal necessidade da escolha do solvente apropriado.

A menor razão molar estudada, Figura 7 (a), apresentou um menor efeito da temperatura, uma vez que as máximas conversões apresentadas foram similares, porém nesta condição a máxima conversão em ascorbil oleato (33%) foi obtida na temperatura de 50 °C. Na Figura 7 (b) observa-se que o aumento da temperatura contribui para um maior percentual de conversão, a 70 °C atingiu-se conversão máxima de 47%, em um menor tempo de reação, 1 hora.

O efeito da temperatura foi mais significativo na maior razão molar estudada, Figura 7 (c), onde a temperatura de 70 °C, em 3 horas de reação, apresentou uma máxima conversão em ascorbil oleato de

66%, um valor elevado em comparação com a outra temperatura estudada neste tempo. A temperatura de 50 °C apresentou comportamento semelhante durante o decorrer do estudo cinético, com um máximo de conversão de 16% em 6 horas de reação. Pode-se ainda observar que a temperatura de 70 °C apresenta um decréscimo em termos de conversão em ascorbil oleato após o período de 3 horas de reação.

O decréscimo na conversão em ascorbil oleato, apresentado por algumas cinéticas do efeito comparativo da razão molar e temperatura, pode estar associado à presença do subproduto formado (água). A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro a ser controlado. Durante o curso da reação, 1 mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. A remoção da água por diversos métodos pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para a sua conclusão com altas conversões (IRIMESCU et al., 2004).

Ao analisar as taxas iniciais de reação, verifica-se que a 70 °C apresentou efeito positivo sobre a velocidade, com exceção para a razão molar de 1:3. Nesta condição a velocidade inicial de reação foi superior para a temperatura de 50 °C. As maiores taxas obtidas foram 55,35 h<sup>-1</sup> e 54,12 h<sup>-1</sup>, a 70 °C nas razões molares de 1:6 e 1:9, respectivamente.

O estudo dos parâmetros temperatura e razão molar dos substratos apresentam importantes papéis em um sistema reacional. Visto que, a razão molar dos substratos pode influenciar a transferência de massa do sistema reacional, já que altas razões molares permitem a formação mais rápida do complexo acil enzimático e em baixas razões molares há uma limitação na transferência de massa, que geralmente ocorre em reações que apresentam uma maior viscosidade. Já a temperatura apresenta duas funções fundamentais, a primeira é promover uma melhor difusão dos substratos em altas temperaturas e a segunda, refere-se à temperatura ótima de atuação das enzimas, que no caso da Novozym 435 está em torno de 40 °C a 70 °C.

A razão molar ácido:álcool é um parâmetro importante em esterificações enzimáticas. Uma vez que a reação é reversível, um aumento na quantidade de um dos reagentes poderá resultar em mais altas conversões deslocando o equilíbrio químico na direção do produto. Contudo, alta concentração de álcool poderá reduzir a velocidade da reação devido à inibição. Dörmo et al. (2004) analisaram o efeito da razão molar de ácido:álcool na esterificação de isoamil oleato (1:1, 1:2, 1:5 e 2:1) na temperatura de 40 °C, 0,5% de enzima (Novozym 435),

agitação de 150 rpm e 7 horas de reação, sem a utilização de solvente. As mais altas conversões (70-80%) foram obtidas para as razões molares de 1:2 e 1:5, respectivamente, em 4 horas de reação.

Richetti (2009) estudou o efeito da temperatura (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C) na cinética reacional de produção de palmitato de 2-etilexila, fixando-se a razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol em 1:6, concentração de enzima (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em 10% e agitação em 150 rpm. No estudo citado, verificou-se que a temperatura de 70 °C destacou-se em relação às demais, uma vez que nesta temperatura foram obtidas as máximas conversões para as duas enzimas estudadas, 96% para a Novozym 435 em 30 minutos e 95% para a Lipozyme RM IM em 1 hora.

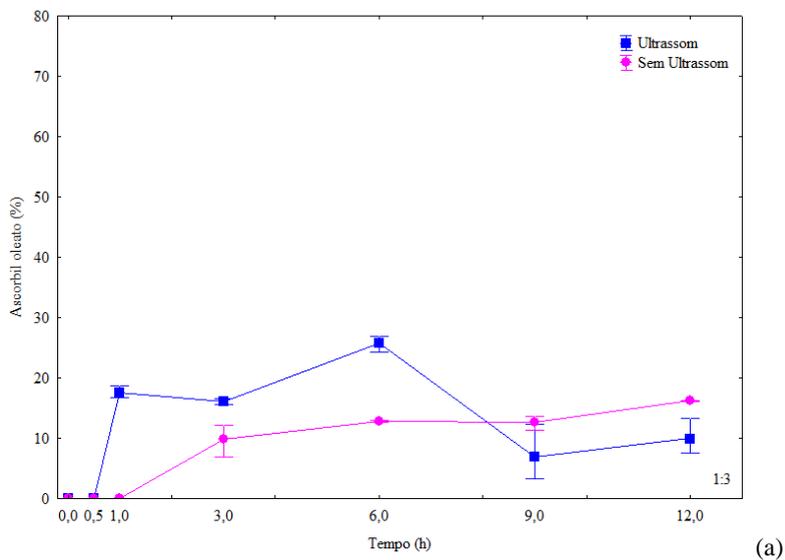
Stojanovic et al. (2013) realizaram um estudo cinético da reação de produção de ascorbil oleato em shaker a 250 rpm, variando as condições de análise: razão molar ácido L-ascórbico:ácido oleico (1:3, 1:6, 1:9, 1:12 e 1:15), teor de água (0%; 0,05%; 0,1%; 0,15% e 0,2%), temperatura (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C) e concentração de ácido L-ascórbico (0,02 M; 0,07 M; 0,12 M; 0,17 M e 0,2 M). O estudo constatou que as cinéticas conduzidas em baixas temperaturas e menores razões molares, a taxa de transferência e difusão dos substratos são significativamente mais lentos, de modo que as conversões são relativamente inferiores em baixas.

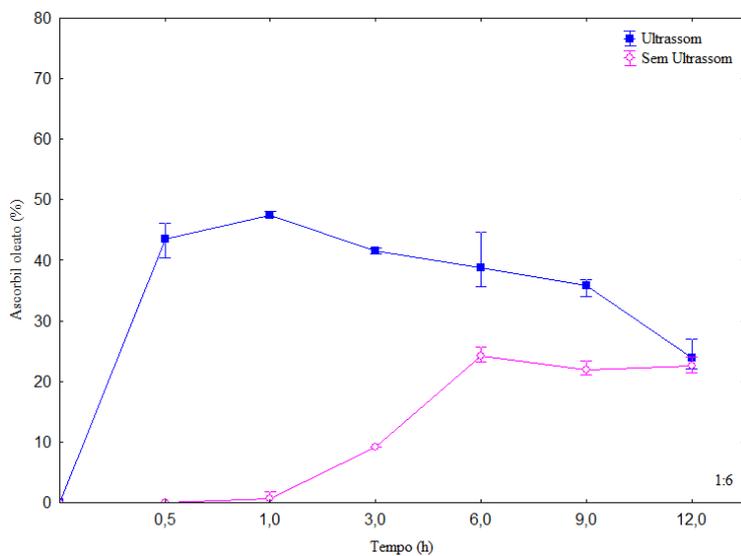
#### **4.2.2 Efeito do emprego do ultrassom**

A fim de investigar o efeito do ultrassom sobre a catálise enzimática de produção de ascorbil oleato reproduziram-se novamente as cinéticas na condição de 70 °C, variando-se a razão molar entre os substratos ácido L-ascórbico:ácido oleico em 1:3, 1:6 e 1:9, sendo que apenas a solubilização dos substratos foi realizada em ultrassom e, a partir da adição da enzima, a reação foi conduzida sem a influência do ultrassom.

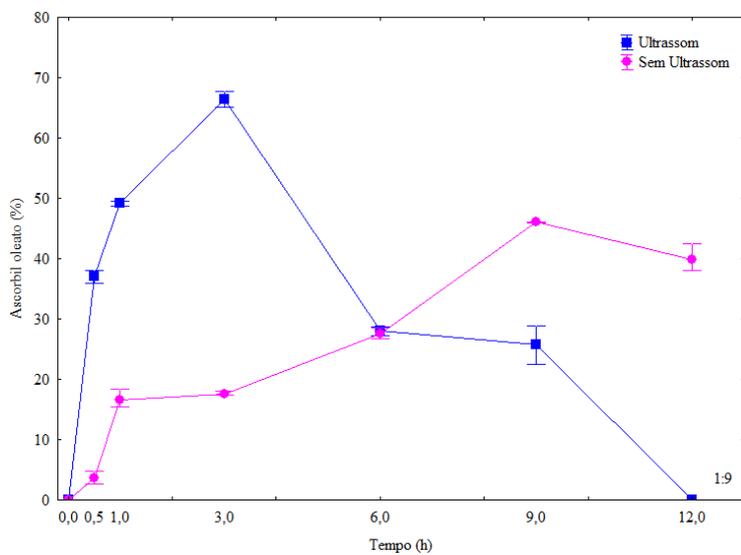
A Figura 8 apresenta um comparativo entre as cinéticas das reações conduzidas na presença e ausência de ultrassom, para as três diferentes razões molares, 1:3, 1:6 e 1:9, com concentração de enzima de 5%, potência do ultrassom de 100%, volume de solvente (terc-butanol) de 20 mL e temperatura de 70 °C.

Figura 8 - Cinética do efeito do ultrassom na produção de ascorbil oleato, para as três diferentes razões molares: 1:3 (a), 1:6 (b) e 1:9 (c). Velocidades iniciais da reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 4,48; 2,36 (a), 55,35; 2,37 (b) e 54,12; 4,16 (c), na presença e ausência do ultrassom, respectivamente.





(b)



(c)

\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de análise e não de experimento.

Os resultados observados na Figura 8 demonstram que o emprego do ultrassom possui um efeito positivo na cinética de produção de ascorbil oleato, uma vez que o seu uso promove uma conversão superior à apresentada pela reação na ausência do ultrassom em um tempo reacional inferior. Pode ser observado na Figura 8 (a), que a máxima conversão obtida de 26% foi alcançada após 6 horas de reação com o emprego do ultrassom. Na Figura 8 (b) observa-se que na presença do ultrassom uma conversão máxima (47%) foi obtida em 1 hora de reação, já a reação na ausência do ultrassom alcançou uma máxima conversão de 24% em 6 horas de reação. Esse mesmo comportamento foi encontrado para a razão molar de 1:9, Figura 8 (c), no qual foi alcançada uma máxima conversão de 66% em 3 horas de reação na presença do ultrassom, já em sua ausência a máxima conversão obtida foi de 46% em 9 horas de reação, porém a reação assistida por ultrassom após a conversão máxima apresentou um decréscimo significativo em sua conversão.

Ao analisar as velocidades iniciais da reação nas cinéticas comparativas da presença e ausência do ultrassom, os resultados apresentados mostram que na presença do ultrassom observa-se maiores velocidades iniciais de reação. Assim, pode-se concluir que a reação sem ultrassom é mais lenta, mostrando que o ultrassom reduz as limitações de transferência de massa, melhorando a mistura e, conseqüentemente, aumentando a área interfacial para a ação da enzima.

Diversos trabalhos desenvolvidos pelo grupo vêm demonstrando resultados promissores relativos ao uso do ultrassom em reações enzimáticas. Entre estes pode-se destacar o trabalho desenvolvido por Lerin (2010), que estudou a produção enzimática de ascorbil palmitato a partir de ácido L-ascórbico e ácido palmítico em solvente orgânico, fluido pressurizado e ultrassom. Neste estudo, verificou-se que com o uso do banho de ultrassom, a esterificação de ácido L-ascórbico e ácido palmítico conduziu a conversões de 27% de ascorbil palmitato após 3 horas de reação.

Assim como o uso de ultrassom, outras técnicas têm sido desenvolvidas visando uma redução no tempo de reação e até mesmo em um aumento na conversão em ascorbil ésteres. O uso destas técnicas vem mostrando resultados promissores, como na pesquisa desenvolvida por Costa et al. (2014), que mostrou os efeitos benéficos do uso da irradiação de micro-ondas na otimização da síntese enzimática de ascorbil palmitato, nas seguintes condições, temperatura (55 °C, 62,5 °C

e 70 °C), concentração enzimática (5%, 10% e 15% (m/m)) e razão molar (1:2, 1:3,5 e 1:5). Neste estudo, o máximo rendimento em ascorbil palmitato (71%) foi obtido com uso de terc-pentanol como solvente, 15% (m/m) de enzima, temperatura de 70 °C, razão molar de 1:5 e tempo de reação de 1 hora.

Entretanto, há poucos estudos sobre o efeito do ultrassom sobre as enzimas e têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com  $\alpha$ -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (OZBEK; ULGEN, 2000; BASTO et al., 2007; TAUBER et al., 2008).

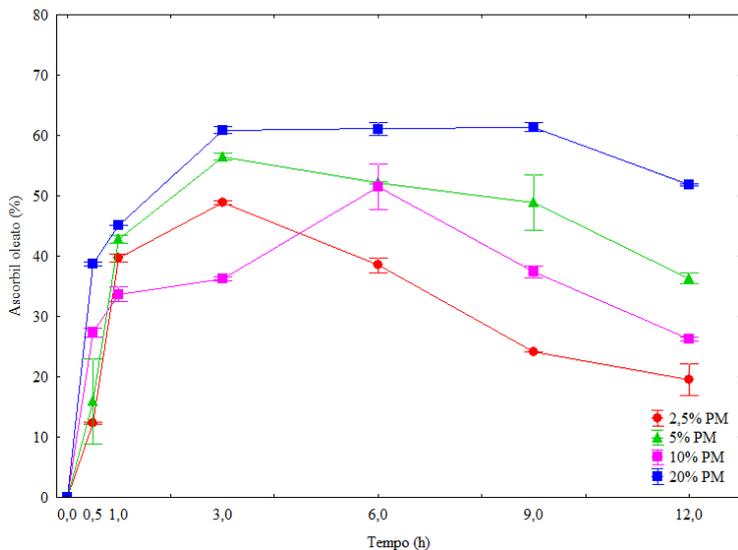
#### **4.2.3 Efeito da concentração da peneira molecular**

Com a finalidade de promover um aumento na conversão de ascorbil oleato e também para reduzir o decréscimo apresentado nas cinéticas anteriormente realizadas, as cinéticas foram repetidas em banho de ultrassom, agora com adição de peneira molecular. O estudo do efeito da concentração de peneira molecular foi realizado nas condições: 5% (m/m) de enzima (calculada sobre a massa dos substratos), 70 °C de temperatura, 100% de potência do ultrassom e razão molar dos substratos ácido L-ascórbico:ácido de 1:9. As concentrações de peneira molecular testadas foram de 2,5%; 5%; 10% e 20% (calculada sobre a capacidade adsorptiva da peneira).

Antes de iniciar a avaliação da cinética de produção enzimática de ascorbil oleato sob efeito do ultrassom, adicionada de peneira molecular, foi investigado se a peneira molecular teria atividade catalítica. Os experimentos foram de até 12 horas em que a mistura ácido L-ascórbico:ácido oleico foi submetida ao ultrassom e adicionada de peneira molecular, sem adição de qualquer quantidade de enzima. Não houve conversão em ascorbil oleato em nenhuma dessas reações, comprovando a hipótese que a peneira molecular não apresenta atividade catalítica para esse sistema reacional.

A Figura 9 apresenta os resultados para a reação conduzida na razão molar de ácido L-ascórbico:ácido oleico (1:9), 70 °C, 100% de potência do ultrassom, 20 mL de solvente (terc-butanol), 5% (m/m) de enzima e variando a concentração de peneira molecular ativada em 2,5%; 5%; 10% e 20%.

Figura 9 - Cinética do efeito da concentração de peneira molecular ativa na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais de reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 16,50; 22,76; 37,87 e 51,54, respectivamente.



\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de experimento.

Observa-se na Figura 9 que as curvas cinéticas para as concentrações de 2,5% e 5% de peneira molecular demonstram comportamento semelhante, estas apresentaram uma conversão máxima em ascorbil oleato de 48% e 56%, respectivamente, em 3 horas de reação. Após esse tempo as conversões apresentaram um declínio. Ao analisar a concentração de 10% de peneira molecular verifica-se que a curva cinética apresentou uma conversão máxima de 51% em 6 horas de reação, após este tempo a curva cinética apresentou um declínio. Quando analisada a concentração de 20% de peneira molecular é possível observar que esta apresenta uma conversão máxima, 61% em 9 horas de reação, conversão relativamente semelhante às conversões máximas encontradas para as outras concentrações de peneira molecular testadas. Porém, a curva cinética obtida para esta concentração apresentou uma estabilidade superior às demais, uma vez que o declínio

da conversão em ascorbil oleato foi inferior e somente ocorreu após 9 horas de reação.

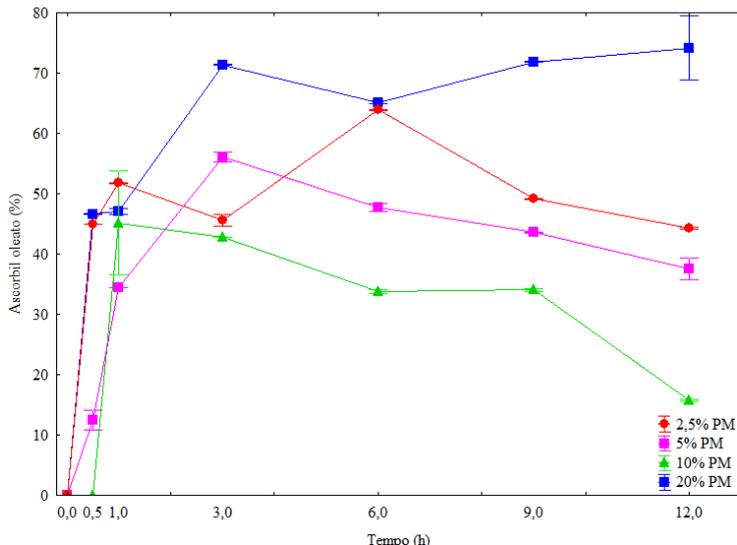
As velocidades iniciais de reação das cinéticas com o uso de peneira molecular apresentam-se elevadas, porém a maior velocidade é observada na cinética com 20% de peneira molecular.

Em uma busca na literatura foi possível perceber que os estudos recentes sobre a produção enzimática de ascorbil oleato vêm propondo alternativas para eliminar ou reduzir o teor de água presente nesta reação. Moreno-Perez et al. (2013) realizaram estudo sobre a síntese de ascorbil oleato por transesterificação enzimática de azeite de oliva com ácido L-ascórbico em meios orgânicos polares, no qual foi avaliada a influência da concentração de água. O estudo foi conduzido a 45 °C, por meio da adição de 0,2 g de lipase à uma solução contendo de ácido L-ascórbico e azeite de oliva na razão molar de 1:1, 5 mL de álcool terc-amílico (terc-pentanol) e 200 mg de peneira molecular. No trabalho citado, os melhores rendimentos foram obtidos na ausência total de água e/ou baixa concentração de água. Na ausência de água o rendimento em ascorbil oleato obtido foi de 70%, já na concentração de água de 0,025% não se obteve conversão em ascorbil oleato.

Em outro estudo, Stojanovic et al. (2013) pesquisaram a reação de produção de ascorbil oleato em shaker a 250 rpm, variando as condições de análise: razão molar ácido L-ascórbico:ácido oleico (1:3, 1:6, 1:9, 1:12 e 1:15), teor de água (0%; 0,05%; 0,1%; 0,15% e 0,2 %), temperatura (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C) e concentração de ácido L-ascórbico (0,02 M; 0,07 M; 0,12 M; 0,17 M e 0,2 M). Constatou-se que em baixas concentrações de água, a velocidade inicial da reação apresentou valores superiores, quando comparada com a velocidade apresentada pela reação em maior concentração de água.

No presente estudo, foram ainda realizados testes com a peneira molecular sem ativação em estufa, a fim de verificar a capacidade adsorviva que esta apresentaria. Os testes foram conduzidos nas mesmas condições utilizadas nos experimentos anteriores, razão molar de 1:9, temperatura de 70 °C, 100% de potência do ultrassom, 20 mL de solvente (terc-butanol), 5% (m/m) de enzima e apenas variando a concentração de peneira molecular não ativada em 2,5%; 5%; 10% e 20%, Figura 10.

Figura 10 - Cinética do efeito da concentração de peneira molecular não ativada na produção de ascorbil oleato. Velocidades iniciais de reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 20,58; 32,49; 36,12 e 56,24, respectivamente.



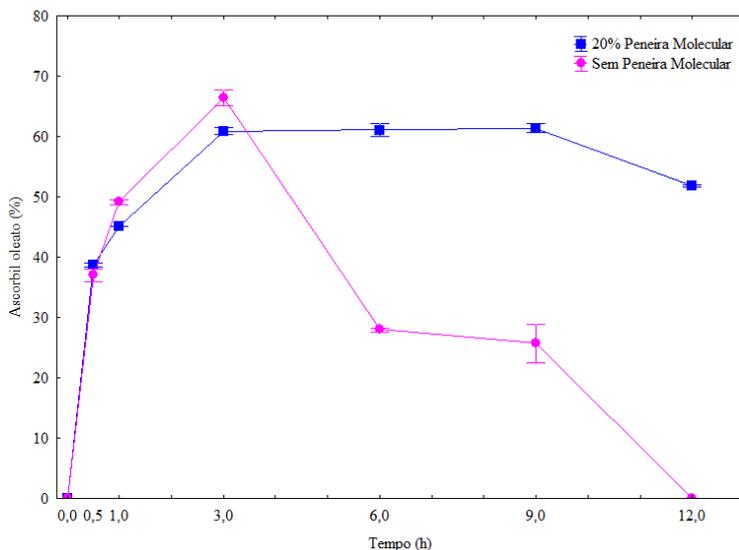
\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de experimento.

Pode ser observado que a concentração de 20% de peneira molecular não ativada apresentou uma máxima conversão em ascorbil oleato, 74% em 12 horas de reação, semelhante à conversão obtida no tempo de 3 horas, 71%, nesta mesma condição. Esta conversão foi superior às conversões apresentadas anteriormente para as diferentes concentrações de peneira molecular ativada testadas. As cinéticas com uso de peneira molecular não ativada apresentam velocidades iniciais elevadas, semelhante às velocidades encontradas para o uso de peneira molecular ativada. Ainda, cabe ressaltar que as cinéticas obtidas nestas condições demonstraram comportamento semelhante ao apresentado nas cinéticas na presença de peneira molecular ativada, apenas diferindo-se quanto aos valores de conversão em ascorbil oleato. Com exceção para a cinética com 2,5% de peneira molecular não ativada que se mostrou instável durante o período de reação analisado, 12 horas, uma vez que apresentou uma queda na conversão e após há certo aumento nesta conversão.

Para efeito comparativo reproduziu-se em um mesmo gráfico as cinéticas obtidas na presença e ausência de peneira molecular, que pode ser observada na Figura 11. Comparativo entre a cinética da produção de ascorbil oleato na ausência e presença de peneira molecular (20%), razão molar de ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:9, concentração de enzima de 5% (m/m), 20 mL de solvente (terc-butanol), 100% da potência do ultrassom e 70 °C.

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que as duas cinéticas reacionais apresentam velocidade inicial e comportamento semelhantes, pois estas apresentam conversão máxima de 66% (ausência de peneira molecular) e 61% (20% de peneira molecular) até o tempo de 3 horas. Pode-se perceber que a reação acrescida de peneira molecular (20%) possui um efeito positivo na cinética de produção de ascorbil oleato quando comparada com reação na ausência de peneira molecular, uma vez que esta apresenta um comportamento estável após o tempo de 3 horas, diferentemente do apresentado pela cinética em ausência de peneira molecular, que demonstra um declínio em sua conversão após este tempo (ou o mesmo tempo).

Figura 11 - Comparativo entre a cinética da produção de ascorbil oleato na ausência e presença de peneira molecular (20%). Velocidades iniciais de reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 54,12 e 51,54, respectivamente.



\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de experimento.

Este comportamento pode estar relacionado à quantidade de água formada na reação de produção de ascorbil oleato. A manutenção da conversão após 3 horas na presença da peneira molecular pode ser justificada pela adsorção da água formada pela peneira, evitando a reversão da reação, mantendo a conversão em produto em nível elevado.

Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Adamczak et al. (2005), que verificou o efeito positivo da adição de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato sem ultrassom. No estudo de Adamczak, os ensaios foram conduzidos sob agitação magnética (500 rpm) a 45 °C, em frascos de 10 mL hermeticamente fechados, contendo ácido L-ascórbico e ácido oleico na razão molar de 1:25, com 1,15% de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em 5 mL de solvente orgânico e adicionados ou não de 0,15 g de peneira molecular (4 Å). Os resultados desta pesquisa mostram que a adição de peneira molecular promoveu um aumento na conversão em ascorbil oleato (46%) em 24 horas de reação quando comparada a

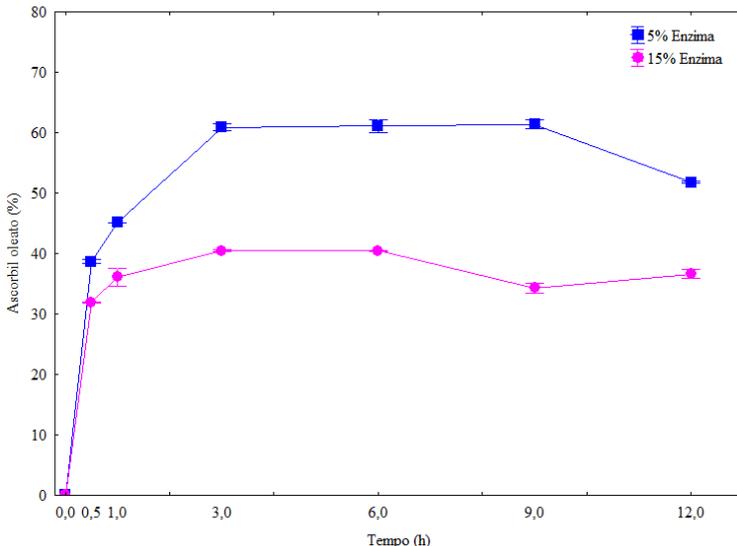
conversão obtida na ausência da peneira (15%). Após este período os resultados na ausência de peneira molecular apresentam uma redução em seu percentual de conversão, já na presença deste adsorvente a conversão manteve-se contante até 48 horas de reação.

Goderis et al. (1987) descreveu a influência da atividade de água sobre o equilíbrio termodinâmico de reações de esterificação, no qual a atividade de água foi relacionada à redução na atividade catalítica das lipases e por afetar o equilíbrio da reação de produção de ascorbil palmitato. Neste estudo, elencou-se hipóteses para o declínio observado na taxa inicial de reação quando se aumenta o nível de atividade de água inicial ( $A_w$ ). A primeira hipótese foi relacionada a uma possível competição entre hidrólise e alcoólise devido à atuação de água como substrato. Uma segunda hipótese seria associada ao acúmulo de água na superfície de suporte da Novozym levando a uma agregação física das partículas de catalisador. Outra hipótese foi atribuída à uma limitação na transferência dos substratos para a enzima, em virtude do acúmulo de água em torno das partículas de catalisador. À medida que o tamanho da camada de água resultante aumenta, torna-se mais difícil para os substratos aderirem às moléculas de enzima.

#### **4.2.4 Efeito da concentração de enzima**

O efeito da concentração de enzima (5% e 15%) foi estudado na condição de razão molar entre os substratos (ácido L-ascórbico: ácido oleico) de 1:9, temperatura de 70 °C, 20 mL de solvente (terc-butanol), 100% de potência do ultrassom, 20% de peneira molecular. Os resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Efeito da quantidade de enzima na cinética da produção de ascorbil oleato em ultrassom. Velocidade inicial reação,  $r$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de 51,54 e 43,64, respectivamente.



\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de análise e não de experimento.

Observa-se na Figura 12, que o aumento da concentração de enzima de 5% para 15% (m/m) não promoveu um aumento na conversão em ascorbil oleato. A máxima conversão obtida com 15% (m/m) de enzima foi de 40% em 3 horas de reação, inferior aos 61% obtidos com 5% (m/m) de enzima a 70 °C nas mesmas condições e mesmo tempo de reação. A velocidade inicial de reação apresentada nesta cinética ( $13,96 \text{ h}^{-1}$ ) foi inferior à apresentada nas outras cinéticas com a adição de peneira molecular.

Uma possível hipótese para explicar este resultado seria relacionada ao fato que o excesso de enzima no meio poderia causar agregação das partículas de enzima imobilizada, diminuindo a exposição do sítio ativo aos substratos. As moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substratos

no interior da partícula. Menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador e não aumenta a conversão (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

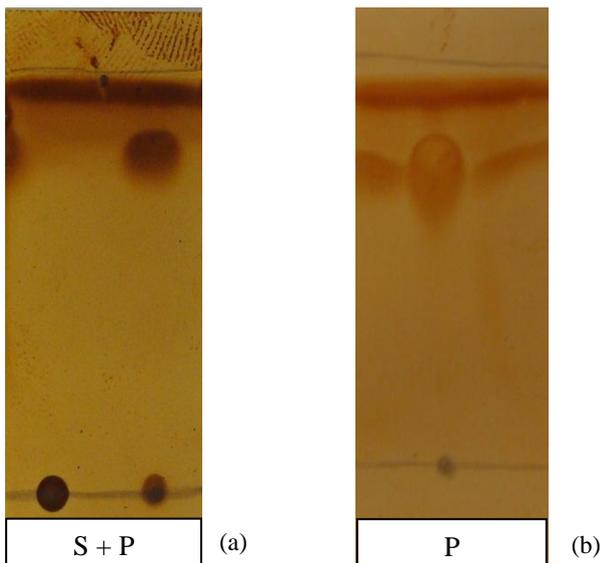
Outros trabalhos relataram resultados semelhantes, como o estudo de Babicz et al. (2010), que avaliaram o efeito da concentração de enzima (1% e 2% m/m) na hidrólise de óleo de soja em ultrassom (frequência de 47 kHz e potência de 125 W) e observaram uma queda na conversão com o aumento da quantidade de enzima adicionada ao meio reacional, tanto para a enzima imobilizada Lipozyme RM IM, quanto para a Novozym 435.

Lerin (2010) avaliou o efeito da concentração de enzima (1%, 5%, 10% e 20% (m/m)) na produção de ascorbil palmitato em banho de ultrassom, fixando a razão molar ácido L-ascórbico:ácido palmítico em 1:9, 5% , temperatura em 70 °C , 5 mL de terc-butanol e potência do ultrassom em 100%. Lerin verificou que o aumento da concentração da enzima imobilizada não levou a um aumento esperado nas taxas iniciais da reação. O uso de 5%, 10% e 20% m/m de Novozym 435 não apresentou diferença significativa na produção de ascorbil palmitato.

#### 4.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO E IDENTIFICAÇÃO POR RMN H1

A confirmação do produto obtido foi realizada por RMN H1. Para a análise foi necessária à purificação do produto da reação em coluna de sílica gel. Para acompanhamento da purificação em coluna utilizou-se cromatografia de camada delgada, também em sílica-gel. A amostra utilizada para a confirmação foi obtida no tempo reacional de 3 horas, razão molar de 1:9, 5% (m/m) enzima, 70 °C, 20 mL de terc-butanol e 100% de potência do ultrassom. Os cromatogramas obtidos antes e após a purificação podem ser observados na Figura 13 (a) e (b), respectivamente.

Figura 13 - Cromatograma da amostra de produto da reação enzimática antes (a) e após (b) purificação por cromatografia em coluna.



\*\* S + P – substratos e produto.

\*\* P – produto.

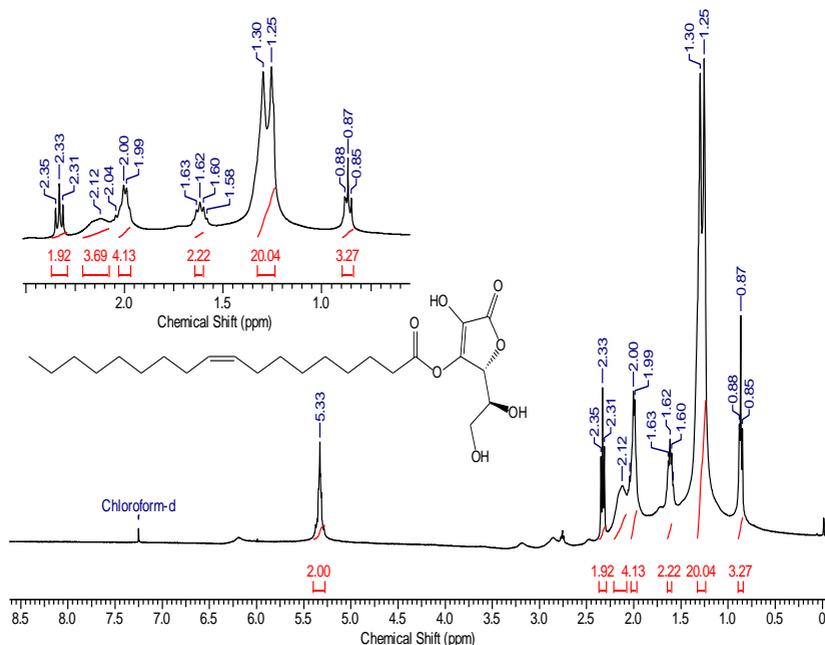
Na Figura 13 (a) pode-se verificar que o cromatograma apresenta duas bandas (zonas), uma corresponde aos substratos ácido L-ascórbico e ácido oleico (S) e a outra se refere ao produto da reação (P). É possível observar duas bandas (Figura 13 a) com intensa coloração, indicando alta concentração tanto do reagente quanto do produto. Na Figura 13 (b) é possível perceber que após cromatografia em coluna, houve diminuição da banda de reagente e intensificação da banda do produto.

A Figura 14 mostra o espectro RMN de  $^1\text{H}$  com seus respectivos deslocamentos dos átomos da molécula de produto da amostra obtida via esterificação enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico. A partir do espectro obtido pode-se verificar, os seguintes deslocamentos, para análise de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 5,33 (*m*, 2H), 2,35 (*t*, 2H), 2,12 (*m*, 4H), 2,04 (*m*, 4H), 1,63 (*m*, 2H), 1,30 (*d*, 20H), 0,88 (*t*, 3H), para a molécula.

Viklund et al. (2003), ao estudar a síntese enzimática e as propriedades antioxidantes de ascorbil ésteres, apresentou os seguintes deslocamentos para a molécula de ascorbil oleato na análise de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 5.35 (*m*, 2H), 4.8 (*s*, 1H), 4.45 (*s*, 1H), 4.25 (*d*, 2H), 2.35 (*m*, 2H), 2.05 (*m*, 4H), 1.65 (*m*, 2H); 1.3 (*br*, 20H), 0.9 (*t*, 3H).

Ao comparar os deslocamentos obtidos com os dados encontrados na literatura para a molécula de ascorbil oleato percebe-se que o espectro reportado neste estudo, bem como o seu respectivo deslocamento está de acordo com os dados encontrados na literatura para a molécula de ascorbil oleato, o que comprova que o produto da reação esperado foi realmente obtido.

Figura 14 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a amostra obtida via esterificação enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico, através da análise de RMN de  $^1\text{H}$ .



#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Tabela 8 mostra uma compilação dos trabalhos de síntese enzimática de ascorbil oleato, empregando diferentes lipases, em diferentes sistemas de agitação encontrados até o momento na literatura especializada.

Tabela 8 - Resumo dos trabalhos de síntese enzimática de ascorbil oleato reportados na literatura.

Condições experimentais							Conversão (%)	Referências
Razão molar (mol:mol)	Temp. (°C)	Lipase	Solvente	Peneira molecular (g)	Agit. (rpm)	Tempo reacional (h)		
1:9	70	Novozym 435 (0,18 g)	terc-butanol	-	-	3	66	Este trabalho
1:9	70	Novozym 435 (0,18 g)	terc-butanol	1,10	-	3	71	Este trabalho
1:1	45	Novozym 435 (0,2 g)	terc-pentanol (5 mL)	0,2	**	48	70	MORENO-PEREZ et al. (2013)
1:25	45	CALB (0,05 g)	acetona (5 mL)	0,15	500	48	57	ADAMCZAK, BORNSCHEUER, BEDNARSKI (2005)
1:12	60	CALB (0,02 g)	Líquido iônico ((BMIM)(BF <sub>4</sub> ) com NaI 2/0) (0,5 mL)	0,15	300	14	85	ADAMCZAK e BORNSCHEUER (2009)

1:1	**	Novozym 435 (0,3 g)	terc-pentanol (10 mL)	0,5	200	12	35	SONG et al. (2004)
2:1	65	Novozym 435 (0,6 g)	terc-pentanol (184 mL)	2,5	**	100	87	VIKLUND, ALANDER, HULT (2003)
1:1	40	Lipozyme TL IM (0,025	terc-pentanol seco (5 mL)	-	250	168	27	REYES-DUARTE et al. (2011)
1:1	40	Novozym 435 (0,025 g)	terc-pentanol seco(5 mL)	-	250	168	33	REYES-DUARTE et al. (2011)
1:12	55	Novozym 435 (0,02 g)	acetona (10 mL)	-	250	72	57	STOJANOVIĆ et al. (2013)

\* ácido L-ascórbico:ácido oleico

\*\* Dados não apresentados.

Frente ao que foi exposto na revisão bibliográfica em relação ao estado da arte e avaliando os resultados alcançados neste trabalho em comparação com os trabalhos encontrados na literatura, resumidamente apresentados na Tabela 8, percebe-se que resultados obtidos no presente estudo podem ser comparados ao obtido por Moreno-Perez et al. (2013), que apresentou 70% de conversão em ascorbil oleato, porém em um tempo reacional superior, 48 horas de reação. Cabe ainda ressaltar que outros dois estudos obtiveram conversões em ascorbil oleato superiores as alcançadas neste estudo, mas em um tempo de reação superior. Adamczak e Bornscheuer (2009) conseguiram uma conversão de 85% em 15 horas de reação, já Viklund et al.(2003) atingiu 87% de conversão em 100 horas de reação.

Assim, mostra-se evidente a relevância do presente estudo, que apresenta grande potencial para estudos mais aprofundados. Visto os bons resultados obtidos em conversões de ascorbil oleato em apenas 3 horas de reação, 66% (sem peneira molecular) e 71% (com peneira molecular), quando empregada a lipase comercial Novozym 435 (5% (m/m)), a 70 °C, 100% de potência do ultrassom, 20 mL de terc-butanol, razão molar de 1:9.



## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudada a síntese enzimática de ascorbil oleato a partir de ácido L-ascórbico e ácido oleico em banho de ultrassom. A consecução do mesmo permitiu, de forma geral, concluir que:

- a) O solvente orgânico terc-butanol mostrou-se apropriado para a síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.
- b) O ultrassom mostrou-se eficiente para acelerar a reação de síntese enzimática de ascorbil oleato a partir de ácido L-ascórbico e ácido oleico.
- c) A melhor conversão de ascorbil oleato foi obtida na temperatura de 70 °C, razão molar dos substratos de 1:9 (ácido L-ascórbico e ácido palmítico), adição de 20 mL de solvente (terc-butanol) e adição de 5% (m/m) de enzima Novozym 435.
- d) O uso de peneira molecular permitiu a obtenção de maiores conversões e comportamento cinético mais estável, principalmente com a adição de 20% (m/m).
- e) A análise de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu confirmar a estrutura do ascorbil oleato produzido por via enzimática na presença de ultrassom.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom, processo estudado neste trabalho, mostrou ser bastante promissor, mas por ser um estudo ainda em fase inicial, pode-se delinear algumas sugestões para próximos trabalhos:

- a) Avaliar outras lipases para a síntese de ascorbil oleato.
- b) Avaliar outros métodos para retirar a água da reação de produção enzimática de ascorbil oleato.
- c) Avaliar a produção enzimática de ascorbil oleato em solvente orgânico com adição de peneira molecular ao longo da reação.
- d) Avaliar a produção enzimática de ascorbil oleato em modo batelada alimentada e contínuo.
- e) Avaliar a capacidade antioxidante do ascorbil oleato *in vitro* e em produtos alimentícios.
- f) Avaliar a estabilidade do ascorbil oleato após o encapsulamento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3177-3180, 2005.

ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a Indústria. **Química Nova**, v. 28, p. 64-75, 2005.

ARCOS, J.A.; BERNABÉ, M.; OTERO, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acyl glucose esters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 505-509, 1998.

ASAKURA, L.; LOTTENBERG, A.M.; NEVES, M.Q.; NUNES, V.S.; ROCHA, J.C.; PASSARELLI, M. et al.. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 701-705, 2000.

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 795-801, 1997.

AWADALLAK, J.A; VOLL, F.; RIBAS, M.C.; DA SILVA C.; CARDOZO, L.F.; DA SILVA, E.A. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: diacylglycerol synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 1002–1007, 2013.

BABICZ, I.; LEITE, S.G.F.; SOUZA, R.O.M.A.; ANTUNES, O.A.C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4–6, 2010.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

BARBOSA, J.C.S. e SERRA, A.A. Ultrassom (I): influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v. 14, n. 4, p. 302-316, 1992.

BARON, A.M. **Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2003.

BASTO, C.; SILVA, C. J.; GÜBITZB, G.; CAVACO-PAULO, A. Stability and decolouration ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 355-362, 2007.

BEZBRADICA, D.; STOJANOVIC, M.; DUSAN, V.; DIMITRIJEVIC, A.; CAREVIC, M.M.; MILOSAVIC., N. Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester. **Biochemical Engineering Journal**, v. 71, p. 89-96, 2013.

BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. Livraria Varela, 2ª ed., São Paulo, 1992.

BOLDYREV, V.V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 2, n. 2, p. 143-145, 1995.

BORNSCHEUER U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.73-81, 2002.

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, p. 1291-1295, 1999.

BREMUS, C.; HERRMANN, U.; BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. Review: The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 196-205, 2006.

BRENELLI, E.C.S.; FERNANDES, J.L.N. Stereoselective acylations of 1,2-azido alcohols with vinyl acetate, catalyzed by lipase Amano PS **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, p. 1255–1259, 2003.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, JR.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase

production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. **Química Nova**, v. 18, p. 544-554, 1995.

CENI, G.C.; SILVA, P.C.; LERIN, L.; OLIVEIRA, J.V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA, D. Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glyceryl benzoate in organic solvent. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 169-174, 2011.

CHEN, Q.; ESPEY, M.G.; KRISHNA, M.C.; MITCHELL, J.B.; CORPE, C.P.; BUETTNER, G.R.; SHACTER, E.; LEVINE, M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13604-13609, 2005.

CHEN, Z.G.; ZONG, M.H.; GU, Z.X.; HAN, Y.B. Effect of ultrasound on enzymatic acylation of konjac glucomannan. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 351-356, 2008.

CHEN, H.C.; KUO, C.H.; TWU, Y.K.; CHEN, J.H.; CHANG, C.J.; LIU, Y.C.; SHIEH, C.J. A continuous ultrasound-assisted packed-bed bioreactor for the lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 1289-1294, 2011a.

CHEN, H.C.; CHEN, J.; CHANG, C.; SHIEH, C. Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 455-459, 2011b.

CIPOLATTI, E.P.; SILVA, M.J.A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M.M.C.; OLIVEIRA, J.V.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56-67, 2014.

COSTA, I. C.R.; SUTILI, F.K.; DA SILVA, G.V.V.; LEITE, S.G.F.; MIRANDA, L.S.M.; DE SOUZA, R.O.M.A. Lipase catalyzed ascorbyl palmitate synthesis under microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 127-131, 2014.

COSTA, V.E.U.; AMORIN, H.L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863-873, 1999.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, Purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolors* A3(2). **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p. 381 – 388, 2008.

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

DE RITTER, E.; COHEN, N.; RUBIN, S.H. Physiologic availability of dehydro-L-ascorbic acid and palmitoyl-L-ascorbic acid. **Science**, v. 113, p. 628-631, 1951.

DE TULLIO, M.C., ARRIGONI, O. Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 209–219, 2004.

DÖRMO, N.; BÉLAFIBAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U. GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, p. 229-234, 2004.

FREIRE D.M.G.; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**, cap. 16, p.369-385, 2008.

GARCÍA-JUNCEDA, E.; GARCÍA-GARCÍA, J.F.; BASTIDA A.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A. Enzymes in the syntheses of bioactive compounds: the prodigious decades. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 17-34, 2004.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of Lipase in Kinetic Resolution of Racemates. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GODERIS, H. L., AMPE, G., FEYTEN, M. P., FOUWÉ, B. L., GUFFENS, W. M., VAN CAUWENBERGH, S. M., TOBBACK, P. P. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 258-266, 1987.

GOTOR-FÉRNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

GUO, P.; ZHENG, C.; HUANG, F.; ZHENG, M.; DENG, Q.; LI, W. Ultrasonic pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of 4-methoxy cinnamoyl glycerol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 73-88, 2013.

GUTH, J.; LENTNER, V. Aqueous enzyme delivery system. **World Intellectual Property Organization**, WO 2006/018048 A1, 2006.

HA S.H.; HIEP N.M.; KOO Y. Enhanced production of fructose palmitate by lipase-catalyzed esterification in ionic liquids. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 126-130, 2010.

HALL, G.F.; BEST, D.J.; TURNER, A.P.F. Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 31-35, 1988.

HASAN, F.; SHAN, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HERBERT, R.W.; HIRST, E.L.; PERCIVAL, E.G.V.; REYNOLDS, R.J.W.; SMITH, F. The constitution of ascorbic acid. **Journal of the Chemical Society**, p. 1270–1290, 1933.

HSIEH, H.-J.; CHEN, J.-W.; GIRIDHAR, R., WU, W.T. Synthesis of mixed esters of ascorbic acid using methyl esters of palm and soybean oils. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 35, p. 113-118, 2005.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; COULON, D.; MICLO, A. Synthesis of 6-O-palmitoyl L-ascorbic acid catalyzed by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 17, p.1091-1094, 1995.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; MICLO, A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 19-23, 1998.

ITABAIANA, I.JR. **Rotas biotecnológicas para a síntese de monoacilgliceróis**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

IRIMESCU, R.; SAITO, T.; KATO, K. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 69-73, 2004.

JACOB, R.A.; SOTOUDEH, G. Vitamin C function and status in chronic disease. **Nutrition in Clinical Care**, v. 5, p. 66–74, 2002.

KARRA-CHAABOUNI M, GHAMGUI H, BEZZINE S, REKIK A, GARGOURI Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1692-1698, 2006.

KARMEE, S.K. Lipase catalyzed synthesis of ester-based surfactants from biomass derivatives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 144-154, 2008.

KARMEE, S.K. Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 1013-1022, 2009.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. **In: A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology**. REHM, H.J.; STADER, P. (eds.), v. 8A, p. 38, 1998.

KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p. 1041–1064, 2004.

KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom. **Revista Analytica**, n. 3, p. 34-39, 2003.

KULDILOKE, J. **Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetables juices**. Ph.D. Thesis at Technische Universität, Berlin, 2002.

KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, p. 1568-1573, 2004.

KUO, C.H.; HSIAO, F.W.; CHEN, J.H.; HSIEH, C.W.; LIU, Y.C.; SHIEH, C.J. Kinetic aspects of ultrasound-accelerated lipase catalyzed acetylation and optimal synthesis of 40-acetoxyresveratrol. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 546–552, 2013.

KUWABARA, K.; WATANABE, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Synthesis of 6-O-unsaturated acyl image-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 17-22, 2003a.

KUWABARA, K.; WATANABE, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Continuous production of acyl L-ascorbates using a packed-bed reactor with immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 895-899, 2003b.

LEE, S.H.; NGUYEN, H.M.; KOO, Y.M.; HA, S.H. Ultrasound enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1009–1012, 2008.

LERIN, L.A. **Síntese enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

LERIN, L.A.; FEITEN, M.C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA D. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: process optimization and kinetic evaluation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 988–996, 2011.

LERIN, L.A.; LOSS, R.A.; REMONATTO, D.; ZENEVICZ, M.C.; BALEN, M.; NETTO, V.O.; NINOW, J.L.; TRENTIN, C.M.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2014, doi:10.1007/s00449-00014-01222-00445.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial Biotransformations**. Wiley, Weinheim, 2006.

LIU, X.Y.; GUO, F.L.; WU, L.M.; LIU, Y.C.; LIU, Z.L. Remarkable enhancement of antioxidant activity of vitamin C in an artificial bilayer by making it lipo-soluble. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 83, p. 39-43, 1996a.

LIU, Z.Q.; MA, L.P.; LIU, Z.L. Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 95, p. 49-57, 1996b.

LIU, Z. Q.; MA, L.P.; LIU, Z.L. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 103, p. 125–135, 1999.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p. 402-407, 2008.

LOBO, H.R.; SINGH, B.S.; PINJARI, D.V.; PANDIT, A.B.; SHANKARLING, G.S. Ultrasound-assisted intensification of biocatalyzed synthesis of mono-N-alkyl aromatic amines. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 29–34, 2013.

MACHADO, C.O.; DA SILVA, A.A.T.; BORGES, C.P.; SIMAS, A.B.C.; FREIRE, D. M.G. Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 42-46, 2011.

MARTINEZ, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI M.J. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, p. 251-256, 2000.

MAUGARD, T.; TUDELLA, J.; LEGOY, M.D. Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 358-362, 2000.

MAY, J.M.; QU, Z.; COBB, C.E. Accessibility and reactivity of ascorbate 6-palmitate bound to erythrocyte membranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, p.471-480, 1996.

MAY, O.; VERSECK, S.; BOMMARIUS, A.; DRAUZ, K. Development of dynamic kinetic resolution processes for biocatalytic of natural and nonnatural L-amino acids. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p.. 253-257, 2002.

MAY, J.M.; QU, Z.C. Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 434, 178–186, 2005.

MORENO-PEREZ, S.; FILICE, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, p. 48-54, 2013.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology** v. 9, 201 – 210, 1998.

NAIDU, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Journal of Nutrition**, p. 2-7, 2003.

NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Effect of solvent on lipase-catalyzed transesterification in organic media. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 50, p. 4681-4690, 1994.

NICOLAU, A. **Polímeros obtidos a partir do ácido oleico: Obtenção e caracterização físico-química no estado sólido e em solução**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2009.

OZBEK, B.; ULGEN, K.O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4450, 2000.

OOSTEROM, M.W.; RANTWIJK, F.V.; SHELDON, R.A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 328-333, 1996.

PALMA, S.; HILARIO, M.R.; ALLEMANDI, D.; FRATONI, L.; NOSTRO, L.P. Solubilization of hydrophobic drugs in octanoyl-6-O-ascorbic acid micellar dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1810-1816, 2002.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.

PASSOS, J.P.R. **Espectroscopia de Lente Térmica aplicada ao sistema Ácido oléico/Beta Caroteno**. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, 2007.

PAQUES F.W.; MACEDO G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PEDERSEN, N.R.; WIMMER, R.; EMMERSEN, J.; DEGN, P.; PEDERSEM, L.H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalyzed esterification of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 13, p. 1179-1184, 2002.

PHILIPS, C.L.; COMBS, S.B.; PINELL, S. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, p. 228-232, 1994.

PLOU, F. J.; CRUCES, M. A.; FERRER, M. et al. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. **Journal of biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 55–66, 2002.

RAO, C.V.; RIVENSON, A.; KELLOFF, G.J.; REDDY, B.S. Chemoprevention of azoxymethane-induced colon cancer by ascorbyl palmitate, carbenoxolone, dimethylfumarate and p-methoxyphenol in male F344 rats. **Anticancer Research**, v. 15, p. 1199-1204, 1995.

RASO, J.; MANAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, p. 157-162, 1999.

REICHSTEIN, T.; GRUSSNER, A. Eine ergiebige synthese der 1-Ascorbinsäure (CVitamin). **Helvetica Chimica Acta**, v. 17, p. 311-315, 1934.

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

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 298-306, 2009.

ROSS, D.; MENDIRATTA, S.; QU, Z.-C.; COBB, C.E.; MAY, J. Ascorbate 6 palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 81-89, 1999.

RUFINO, A.R.; BIAGGIO, F.C.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 5–9, 2010.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purifications strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methodology**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. In: HUDSON, B.J.F. (ed.) **Food Antioxidants**. Elsevier, p. 113–127, 1990.

SHAH, S.; GUPTA, M.N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. **Chemistry Central Journal**, v. 2, p. 1-9, 2008.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 67-75, 1992.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v. 30, p. 180-184, 1992.

SISAK, C.; CSANADI, Z.; RONAY, E.; SZAJANI, B. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, 1002 – 1007, 2006.

SONG, Q.-X.; WEI, D.-Z. Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 261–266, 2002.

SONG, Q.X.; ZHAO, Y.; XU, W.Q.; ZHOU, W.Y.; WEI, D.Z. Enzymatic synthesis of Lascorbyl linoleate in organic media. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, p. 211-215, 2006.

SRINIVAS, D.; SATYARTHI, J. K. Biodiesel production from vegetable oils and animal fat over solid acid double-metal cyanide catalysts. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 15, p. 145–160, 2011.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F.N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, p. 1505-1510, 1999.

STOJANOVIC, M.; VELICKOVIC, D.; DIMITRIJEVIC, A.; MILOSAVIC, N.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.; BEZBRADICA, D. Lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate in acetona: optimization of reaction conditions and lipase reusability. **Journal of Oleo Science**, v. 6, p. 591-603, 2013.

SUTILI, F.K ; LEAL, I. C. R. ; DE SOUZA, R.O.M.A. ; MIRANDA, L. S. M. ; LEITE, S. G. F. ; RUELA, H. S. Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 85-86, p. 37-42, 2013.

SZENT-GYÖRGYI, A. Observations on the function of the peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. **Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 1387–1409, 1928.

TAUBER, M.M.; GÜBITZ, G.M.; REHOREK, A. Degradation of azo dyes by oxidative processes – laccase and ultrasound treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p.4213-4220, 2008.

TORRES DE PINEDO, A. PEÑALVER, P.; PÉREZ-VICTORIA, I.; RONDON, D.; MORALES, J.C. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. **Food Chemistry**, v. 105, p. 657-665, 2007.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VIKLUND, F.; ALANDER, J.; HULT, K. Antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl FA esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 795-799, 2003.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308-317, 2003.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VULFSON, E.N. **In: Lipases: Their structure, biochemistry and Application**: WOOLEY, P.; PETERSEN, S.B. (eds.), Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

WAKABAYASHI, H. **Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors**. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento Geral de Tecnologia de Alimentos, Universidade Técnica de Munique, Munique, 2004.

WANG, F.; ZHANG, H.; WANG, J.; CHEN, G.; FANG, X.; WANG, Z.; WANG, L. Ultrasound irradiation promoted enzymatic transesterification of (R/S)-1-chloro-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol. **Molecules**, v. 17, p. 1-1, 2012.

WANG, Y.; XIN, J.; SHI, J.; WU, W.; XIA, C. A kinetic study of starch palmitate synthesis by immobilized lipase-catalyzed esterification in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.73-79, 2014.

WATANABE, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Condensation of L-ascorbic acid and medium chain fatty acids by immobilized lipase in acetonitrile with low water content. **Food Science and Technology Research**, v. 5, p. 188-192, 1999.

WATANABE, Y.; ADACHI, S.; FUJII, T.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Surface activity of 6-*O*-hexanoyl, octanoyl, decanoyl and dodecanoyl ascorbates. **Japan Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 73–75, 2001a.

WATANABE, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Lipase catalyzed synthesis of unsaturated acyl L-ascorbate and its ability to suppress autoxidation of polyunsaturated fatty acid. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, p. 823-826, 2001b.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.44, p. 99-105, 2007.

WEN, B.; ELI, W.; XUE, Q.; DONG, X.; LIU, W. Ultrasound accelerated esterification of palmitic acid with vitamin C. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 213–218, 2007.

WESCOTT, C.R.; KLIBANOV, A.M. Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p. 1629-1631, 1993.

WORTZMAN, M.S.; GANS, E.H.; PATEL, B.G. Compositions for the treatment of pigmentation disorders and methods for their manufacture. **World Intellectual Property Organization**, US 6998130, 2002.

XIAO, Y.M.; WU, Q.; CAIA, Y.; LIN, X. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2097–2103, 2005.

ZHENG, M.M.; WANG, L.; HUANG, F.; DONG, L.; GUO, P.; DENG, Q.; LI, W.; ZHENG, C. Ultrasonic pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of phytosterol esters with different acyl donors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 1015–1020, 2012.

ZHENG, M.M.; WANG, L.; HUANG, F.H.; GUO, P.M.; WEI, F.; DENG, Q.C.; ZHENG, C.; WAN, C.Y. Ultrasound irradiation promoted

lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 82–88, 2013.

ZHU, K.; LIU, H.; HAN, P.; WEI, P. Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester, Front of using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 89–93, 2003.

YAN, Y.; BORNSCHEURER, U.T.; SCHMID, R.D. Lipase-catalyzed synthesis of vitamin-C fatty acid esters. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 1051-1054, 1999.

## APÊNDICE A – Método de Lowry

O método de Lowry-Tinsley foi testado como um método alternativo ao método cromatográfico para a quantificação de ascorbil ésteres. A metodologia empregada, bem como os resultados obtidos estão apresentados neste apêndice.

### A.1 Estudo do método de Lowry-Tinsley para quantificação de ascorbil oleato

O método de Lowry-Tinsley é um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre e os AGs solúveis em fase orgânica (LOWRY; TINSLEY, 1976). Para o ensaio foram adicionados 50 µL da amostra (concentração máxima de ácido graxo, ácido oleico, de 80 mmol/L) em eppendorfs de 2 mL contendo 150 µL de solvente (n-hexano, n-heptano e benzeno). Após agitação em vórtex por 20 s, foram adicionados 300 µL do reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre (II) (5% m/v), com pH (6,0 a 6,2) ajustado previamente com piridina. A mistura foi agitada por 45 s em vórtex. A absorbância da fase orgânica foi lida a um comprimento de onda de 715 nm.

A concentração dos AGLs no meio foi relacionada à absorbância por meio de curva de calibração preparada com soluções padrão do ácido graxo puro (ácido oleico), com concentração de 0 a 80 mmol/L.

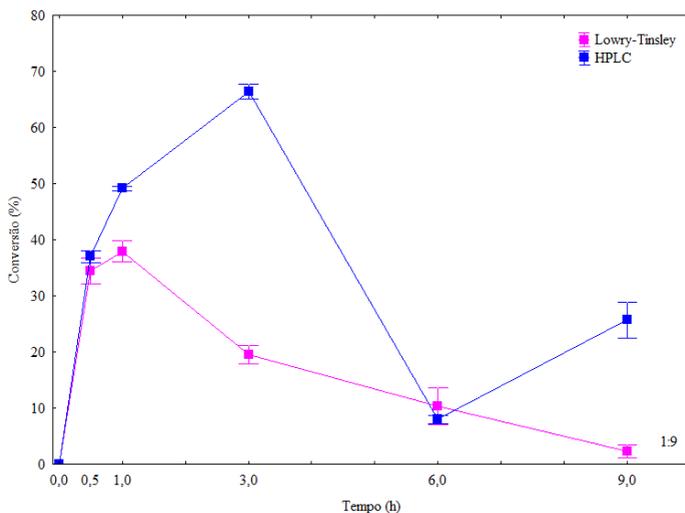
### A.2 Método de Lowry-Tinsley para a quantificação de ascorbil oleato

A Figura 6 apresenta um comparativo entre o método de Lowry-Tinsley e o método cromatográfico, para a cinética realizada na razão molar ácido L-ascórbico:ácido oleico de 1:9, temperatura de 70 °C, volume de solvente (terc-butanol) de 20 mL e potência do ultrassom de 100%.

Como é possível observar na Figura 6, este método não se mostrou eficiente para a quantificação de ascorbil oleato, uma vez que o princípio deste baseia-se no consumo do ácido graxo (ácido oleico). Os resultados obtidos mostram que há um consumo do ácido oleico até 1 hora de reação, o que reverte em uma alta conversão e após este período

a quantidade de ácido oleico no meio reacional apresenta um aumento, assim a conversão apresenta um decréscimo. Este resultado diverge do obtido para a mesma cinética, na qual os produtos foram quantificados pelo método cromatográfico. Uma possível explicação para este comportamento refere-se ao fato de haver uma interação do ácido L-ascórbico presente no meio reacional e/ou até mesmo do próprio produto da reação com a solução de acetato de cobre (II) com piridina, tornando a amostra mais reativa (coloração mais intensa). Assim, uma menor conversão em função teor de ácido graxo residual é obtida como resultado. Estudos relatam que a presença de ácidos carboxílicos insolúveis no meio originam a formação de precipitados durante a leitura do complexo colorimétrico formado por estes e a solução de acetato de cobre (II) (Solução de Lowry-Tinsley), a 715 nm (SUTILI et al., 2013). Como alternativa, foram testados outros solventes no lugar do n-hexano, como o n-heptano e benzeno, visando promover uma melhor solubilidade do ácido L-ascórbico, porém os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados utilizando n-hexano como solvente.

**Figura 15** – Comparativo entre a cinética da produção de ascorbil oleato, obtida pelo método de Lowry-Tinsley e pelo método cromatográfico.



\*Média e desvio padrão correspondem à duplicata de análise e não de experimento.

A Figura 15 demonstra que são discrepantes os resultados obtidos pelas metodologias utilizadas. Como citado anteriormente, o método descrito por Lowry-Tinsley apresenta intensa interferência de ácidos carboxílicos, aumentando a possibilidade de falsos positivos nas análises. Tal fenômeno pode ter ocorrido no ensaio realizado, demonstrando grande diferença no resultado final. Deste modo, optou-se por utilizar o método cromatográfico para quantificação do produto de interesse, na continuidade deste trabalho.