

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

Manuela Balen

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO  
UTILIZANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Coorientadora: Prof. Dra. Débora de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis - SC  
2016

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

Balen, Manuela

Síntese enzimática de ascorbil oleato utilizando tecnologias  
alternativas/ Manuela Balen; orientador,

Jorge Luiz Ninow; coorientadora, Débora de Oliveira; coorientador,  
Marco di Luccio – Florianópolis, SC, 2016.

155 p.

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

Inclui referências

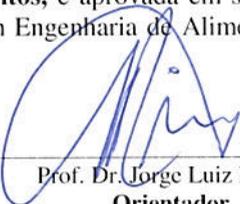
1. Engenharia de Alimentos. 2. Ascorbil oleato. 3. Esterificação.  
4. Ultrassom. 5. Micro-ondas. I. Ninow, Jorge Luiz. II. Oliveira, Débora  
de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

# “SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO UTILIZANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS”

Por

**Manuela Balen**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
**Orientador**



---

Profa. Dra. Débora de Oliveira  
**Coorientadora**



---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
**Coorientador**



---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**



---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



---

Prof. Dr. Léo Serpa



---

Profa. Dra. Helen Treichel



---

Dra. Alessandra Valério



---

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira



---

Dr. Josamaique Gilson Venerab

**Florianópolis, 17 de maio de 2016.**



Às minhas queridas avós pelas orações, aos meus amados pais e irmão, sem o apoio e o incentivo vindo de vocês, nada seria possível.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar os meus caminhos e minhas escolhas e me dar forças para continuar lutando e realizando meus sonhos.

Mãe (Élide) e pai (Irineu), eu não tenho palavras ou gestos para agradecer o quanto sou grata à vocês por tudo o que fizeram e fazem por mim; desde criança e por meio dos anos sempre com conselhos, apoio, amor, compreensão e dedicação. Hoje percebo o quanto todos os conselhos foram importantes em minha trajetória. Não vejo um modo de ser mais feliz se não o simples fato de ser filha de vocês. Ao meu irmão, Mateus, meu orgulho, apesar de afastado geograficamente, quando eu preciso sempre sinto o teu abraço e teu apoio, tu sabes que és meu exemplo. Amo vocês!

Marcelo, homem que por meio da minha vinda à Florianópolis o conheci, durante estes quatro anos do doutorado me conquistou e hoje se tornou meu esposo. Agradeço-te pela compreensão, pela paciência sem limites e pelo encorajamento constante. Obrigada por apoiar minhas decisões, me ouvir, me alegrar nos meus momentos de indecisão. Meu gordinho, meu amor!

Sou grata à professora Débora (Débys), minha comadre linda, pelos ensinamentos, pelos conselhos e experiências trocadas, pela confiança depositada em mim, pelo incentivo, por ser um exemplo a ser seguido e por acreditar no meu trabalho.

Ao professor Marco, meu compadre, sou grata pelas valiosas contribuições, pela paciência, pelos skypes quando estava na Itália, pelas conversas, pela motivação, pela confiança depositada em mim e pela dedicação ao PPGEAL.

Ao professor Jorge, sou grata pelo aceite em ser meu orientador, pelo apoio, pelas risadas e ajuda financeira ao longo do trabalho.

Aos demais professores do PGEAL, agradeço pelos ensinamentos que foram além dos conceitos da engenharia de alimentos.

Professoressa Olga Bortolini e Pier Paolo Giovannini per l'opportunità di eseguire un grande sogno d'infanzia, a studiare in Italia, gli insegnamenti, la fiducia, consentendo il mio soggiorno a Ferrara fornire opportunità per me incontrare un nuovo gruppo di ricerca e di nuove aree. Ringrazio per avete creduto in me.

Agradeço aos meus amigos e colegas da pós-graduação em Engenharia de Alimentos, pela companhia, por ouvirem meus desabafos, pelos momentos de distração. Em especial, Maria José, Mara, Raquel, Viviane (comadre), André (compadre), Camila (parceira de trabalho), Leandro, Alexsandra e minha IC querida Gabriela, são pessoas que mostraram grande valor em momentos importantes. Ao Jadel, grande amigo e pesquisador que ensinou e disponibilizou o uso do HPLC.

Às gurias que dividiram apartamento comigo, Patrícia, Morgana e Isadora, pessoinhas que tornaram não apenas colegas de apartamento, mas sim amigas e verdadeiras companheiras. Obrigada por me permitirem dividir com vocês os meus momentos e meu dia a dia.

Ao Lindomar e ao Fábio muito obrigada pela receptividade e amizade durante o doutorado sanduíche. Aos amigos queridos que a Itália me presenteou Hélen, Lucas e Taís que são para vida toda. A família Cláudio, Alessandra e Helena pessoas espectaculares que reencontrei na Itália bom demais.

Muito obrigada a todos que estiveram presentes na minha vida no período do desenvolvimento deste trabalho, pois contribuíram direta ou indiretamente ao meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

**MUITO OBRIGADA!**



*"La conoscenza rende l' anima giovane e  
riduce l'amarezza della vecchiaia . Raccolti  
pertanto saggezza. Negozi morbidezza per  
domani .*

Leonardo da Vinci



## RESUMO

A produção enzimática de ascorbil oleato utilizando como substratos L-ascórbico e ácido oleico necessita da total solubilização entre substratos a fim de se obter maiores rendimentos. Contudo, o ácido L-ascórbico e ácido oleico não são totalmente miscíveis por possuírem polaridades bastante distintas. Assim, este trabalho objetivou buscar alternativas para o aumento do rendimento da síntese enzimática de ascorbil oleato baseadas no uso de sistemas assistidos por ultrassom, micro-ondas e líquidos iônicos. Para selecionar o melhor solvente reacional, os substratos foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos. O solvente que se mostrou promissor na maximização das condições para a conversão do produto no sistema foi o terc-butanol. A condição ótima para a produção de ascorbil oleato em ultrassom foi obtida na razão molar de ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:9, 20 mL de terc-butanol, 70 °C, concentração de enzima de 5 %, 20 % de peneira molecular em 12 h de reação, resultando em uma conversão de ascorbil oleato de 87 %. A avaliação cinética da reação para produção de ascorbil oleato mostrou conversão de 66 % em 3 h de reação sem o uso da peneira molecular. Os líquidos iônicos têm se apresentado como uma alternativa para solventes orgânicos em função da sua estabilidade térmica, baixa pressão de vapor e química, portanto, para a síntese de ascorbil oleato utilizou-se o 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluorborato obtendo 30 % de conversão em 24 h de reação. A síntese de ascorbil oleato com o uso de terc-butanol em micro-ondas resultou em uma conversão de 90 % em apenas 2 h de reação a 60 °C. A partir do éster de ascorbil oleato obtido, o potencial antioxidante foi avaliado por meio dos métodos do DPPH e ABTS e a atividade antimicrobiana por meio dos métodos de difusão em discos e microdiluição. Estes resultados demonstram a importância da reação de síntese do ascorbil oleato para que possa ser aplicado como antioxidante e antimicrobiano em alimentos, bebidas e cosméticos.

**Palavras-chave:** Ascorbil oleato. Novozym 435<sup>®</sup>. Terc-butanol. Ultrassom. Micro-ondas. Líquidos iônicos. Esterificação.



## ABSTRACT

Enzymatic production of ascorbyl oleate using L-ascorbic acid and oleic acid as substrates requires complete solubilization of the substrates in order to obtain higher yields. However, L-ascorbic acid and oleic acid are not entirely miscible since they have different polarities. Thus, this study aimed to seek alternatives to increase the enzymatic synthesis yield of ascorbyl oleate based on the use of systems assisted by ultrasound, microwave and ionic liquids. To select the best reaction solvent, the substrates were evaluated in terms of solubility in different organic solvents. The optimal condition for ascorbyl oleate production in ultrasound was obtained by using molar ratio of L-ascorbic acid and oleic acid, 1: 9, 20 mL of tert-butanol as solvent, 70 °C, 5 wt% of enzyme concentration, 20 wt% sieve molecular, 12 h reaction, resulting in 87 % of ascorbyl oleate conversion. The kinetic reaction of ascorbyl oleate production showed 66 % of conversion in 3 hours of reaction time without molecular sieve. Ionic liquids have been used as an alternative to organic solvents on the basis of their thermal stability, low vapor pressure and chemical hence for the synthesis of ascorbyl oleate was used 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate with 30 % of conversion in 24 h of reaction. The synthesis of ascorbyl oleate using tert-butanol and microwave system resulted in 90 % of conversion after 2 hours of reaction at 60 °C. From the obtained ascorbyl oleate ester, the antioxidant potential was evaluated by DPPH and ABTS methods and antimicrobial activity through diffusion methods on disks and microdilution. These results demonstrate the importance of ascorbyl oleate synthesis reaction that can be applied as an antioxidant and antimicrobial in food, drinks and cosmetics.

**Keywords:** Ascorbyl oleate. Novozym 435<sup>®</sup>. Tert-butanol. Ultrasound. Microwave. Ionic liquids. Esterification.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido L-ascórbico .....	37
Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido oleico .....	40
Figura 3 - Esquema reacional da produção enzimática de ascorbil oleato .....	42
Figura 4 - Enzima como catalisador na síntese de ésteres por esterificação .....	44
Figura 5 - Mecanismo de transformação de energia, polarização dipolar .....	57
Figura 6 - Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no presente estudo .....	70
Figura 7 - Banho de ultrassom utilizado para produção enzimática de ascorbil oleato .....	75
Figura 8 - Micro-ondas utilizado para a produção enzimática do ascorbil oleato .....	77
Figura 9 - Tela do equipamento do micro-ondas com a devida programação do modelo Biotage-Initiator .....	77
Figura 10 - Estrutura do 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluorborato .....	79
Figura 11 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – HPLC (a) e coluna cromatográfica para HPLC (b) .....	85
Figura 12 - Determinador de umidade Karl Fischer .....	89
Figura 13 - Cinética da produção de ascorbil oleato em função da temperatura. Condições reacionais: Razão molar de ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:6, concentração de enzima de 5 % (m/m), 20 mL de terc-butanol e 100 % da potência do ultrassom .....	95
Figura 14 - Cinética do efeito da razão molar a 70 °C na conversão em ascorbil oleato .....	98
Figura 15 - Cinética do efeito da razão molar a 50 °C da conversão do ascorbil oleato .....	98
Figura 16 - Cinética do efeito da razão molar (1:6) à temperatura de 60 °C da conversão do ascorbil oleato .....	99
Figura 17 - Valores de conversão em ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom com peneira molecular em diferentes concentrações .....	101
Figura 18 - Cinética comparativa do efeito da peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato .....	103
Figura 19 - Cinética da produção de ascorbil oleato em ultrassom em diferentes quantidades de enzima .....	105
Figura 20 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas realizadas na temperatura de 80 °C, 5 % Novozym 435® .....	107
Figura 21 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas realizadas na temperatura de 70 °C, 5 % Novozym 435® .....	107
Figura 22 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas realizadas na temperatura de 60 °C .....	108
Figura 23 - Cinética comparativa da reação em ultrassom e em micro-ondas nas mesmas condições experimentais [70 °C; 5 % Novozym 435®; terc-butanol; ácido ascórbico:ácido oléico (1:9, 1:6 e 1:3)] .....	109

Figura 24 - Cinética comparativa da quantidade de ascorbil oleato produzido por meio do micro-ondas com peneira molecular e sem peneira molecular .....	111
Figura 25 - Comparação entre as reações de produção de ascorbil oleato com e sem peneira molecular (razão molar 1:3 e 1:6).....	112
Figura 26 - Cinética de produção de ascorbil oleato utilizando líquido iônico como solvente nas condições de 60 °C; ácido ascórbico:ácido oleico (0,1 mmol:0,12 mmol), 20 mg de enzima, 150 mg de peneira molecular e 0,5 mL de líquido iônico.....	114
Figura 27 - Placa de sílica com iodo comprovando a presença do produto. Antes da purificação (substratos) (a) e produto purificado (b) .....	116
Figura 28 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ascorbil oleato em $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	117
Figura 29 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do ascorbil oleato em $\text{CDCl}_3$ .....	117
Figura 30 - Imagens ilustrativas da análise de difusão em ágar realizadas para a <i>Enterococcus faecali</i> . a – controle com cloranfenicol; b – DMSO; c – ácido ascórbico; d – ácido oleico; e – ascorbil oleato .....	119
Figura 31 - Imagem da placa de microdiluição com as bactérias <i>Proteus vulgaris</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	121
Figura 32 - Comparação da atividade antioxidante do ascorbil oleato em relação aos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico) .....	123
Figura 33 - Curva de calibração para o ácido ascórbico .....	148
Figura 34 - Representando a curva de calibração para o ascorbil oleato .....	149
Figura 35 - Cromatograma da reação .....	153
Figura 36 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido ascórbico em $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	154
Figura 37 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido oleico em $\text{CDCl}_3$ .....	154
Figura 38 - Espectro IR-FT do poder rotatório do ascorbil oleato.....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura dos ácidos graxos .....	39
Tabela 2 - Dados da literatura referentes as reações de estereificação e transesterificação em sistema assistido por ultrassom - continua .....	54
Tabela 3 - Dados da literatura referentes a algumas pesquisas utilizando a tecnologia de micro-ondas - continua .....	59
Tabela 4 - Dados da literatura de estudos com líquidos iônicos .....	65
Tabela 5 - Condições para reação de síntese de ascorbil oleato.....	78
Tabela 6 - Bactérias selecionadas para análise da atividade antimicrobiana....	80
Tabela 7 - Teste de solubilidade do ácido ascórbico e ácido oléico em volumes variados diferentes solventes .....	92
Tabela 8 - Quantidade de água retida na peneira molecular em diferentes concentrações.....	104
Tabela 9 - Reutilização das enzimas nas reações de 60 e 70 °C .....	113
Tabela 10 - Propriedades dos solventes caracterizadas a partir da reação realizada por irradiação em micro-ondas .....	115
Tabela 11 - Valores da Concentração Mínima Inibitória expressa em diâmetro (mm) .....	118
Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória do ascorbil oleato expressas em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .....	121
Tabela 13 - Resultados da atividade antioxidante analisada pelos métodos DPPH e ABTS do ascorbil oleato .....	123
Tabela 14 - Dados relacionados à curva padrão do ácido ascórbico .....	147
Tabela 15 - Dados relacionados à curva padrão do ascorbil oleato .....	149
Tabela 16 - Valores da conversão em ascorbil oleato e do desvio padrão em função da temperatura.....	150
Tabela 17 - Valores da produção de ascorbil oleato com peneira molecular e o desvio padrão.....	151
Tabela 18 - Valores expressos da cinética da esterificação enzimática de ascorbil oleato com peneira molecular e sem peneira molecular.....	152



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MW – Micro-ondas  
US – Ultrassom  
ILs – Líquidos iônicos  
AA – Atividade Antioxidante  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CCD – Cromatografia de Camada Delgada  
DMSO – Dietilsulfoxido  
°C – graus Celsius  
m/m – massa por massa  
h – horas  
mL – mililitro  
g – gramas  
W – Wats  
mmol – milimol  
Å – ångström  
Min – minutos  
µL – microlitros  
mm – milímetros  
v/v/v – volume/volume/volume  
nm – nanometro  
µg – microgramas  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazina  
ABTS – 2,2' – azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)  
RPM – rotação por minuto  
TSA – Triptona Soja Agar  
NA – Nutrient Ágar  
TSB – Triptona de Soja  
UFC – Unidade Formadora de Colonia  
TTC – Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolio  
PVDF – Fluoreto de Polivinilidene  
D – Deuterado  
MHz – Megahertz  
M – Molar  
CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio Deuterado  
CD<sub>3</sub>OD – Metanol Deuterado  
MIC – Concentração Mínima Inibitória



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
1.1	OBJETIVOS .....	34
1.1.1	Objetivo Geral.....	34
1.1.2	Objetivos Específicos.....	34
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>37</b>
2.1	ÁCIDO ASCÓRBICO .....	37
2.2	ÁCIDOS GRAXOS .....	38
2.2.1	Ácido oleico.....	40
2.3	ASCORBIL ÉSTERES .....	40
2.4	ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA .....	44
2.5	LIPASES.....	45
2.6	CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	47
2.6.1	Solventes orgânicos .....	47
2.6.2	Peneiras moleculares.....	49
2.6.3	Catálise enzimática em ultrassom .....	50
2.6.4	Micro-ondas .....	57
2.6.5	Líquidos iônicos.....	62
2.7	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	66
<b>3</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
3.1	MATERIAIS.....	71
3.1.1	Enzima .....	71
3.1.2	Resina .....	71
3.1.3	Peneira molecular.....	71
3.1.4	Líquido iônico.....	71
3.1.5	Reagentes .....	71
3.1.6	Equipamentos.....	73
3.2	MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	73
3.2.1	Teste de solubilidade dos reagentes .....	73
3.2.2	Produção enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.....	74
3.2.2.1	Síntese enzimática de ascorbil oleato .....	74
3.2.2.2	Esterificação enzimática para produção de ascorbil oleato com peneira molecular.....	75
3.2.3	Produção enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas.....	76
3.2.3.1	Síntese enzimática para produção de ascorbil oleato .....	76
3.2.3.2	Esterificação enzimática para produção de ascorbil oleato com peneira molecular.....	78
3.2.4	Produção enzimática de ascorbil oleato com líquidos iônicos em micro-ondas e agitação magnética .....	78

3.2.5	Atividade antimicrobiana.....	79
3.2.5.1	Teste de difusão em ágar.....	80
3.2.5.2	Teste de microdiluição.....	81
3.2.6	Atividade Antioxidante.....	82
3.2.6.1	Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina).....	82
3.2.6.2	Método do ABTS.....	83
<b>3.3</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>85</b>
3.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....	85
3.3.1.1	Método utilizado para quantificação do éster nas etapas conduzidas na UFSC .....	85
3.3.1.2	Método utilizado para quantificação do éster nas etapas conduzidas na UNIFE.....	86
3.3.2	Purificação do produto.....	86
3.3.3	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	87
3.3.4	Determinação do teor de umidade por Karl Fischer .....	88
3.3.5	Polarimetria .....	89
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>91</b>
4.1	ULTRASSOM E SOLVENTE ORGÂNICO .....	91
4.1.1	Teste de solubilidade dos reagentes .....	91
4.1.2	Avaliação da capacidade catalítica de resinas para a produção de ascorbil oleato em ultrassom com solvente orgânico.....	94
4.1.3	Efeito da temperatura na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom.....	95
4.1.4	Efeito da razão molar dos substratos na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom .....	96
4.1.5	Efeito da utilização de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom .....	100
4.1.5.1	Análise da umidade.....	103
4.1.6	Efeito da quantidade de enzima na síntese de ascorbil oleato utilizando peneira molecular.....	104
4.2	PRODUÇÃO DO ÉSTER EM SISTEMA COM MICRO-ONDAS E LÍQUIDOS IÔNICOS .....	106
4.2.1	Efeito da temperatura, razão molar e tempo na síntese de ascorbil oleato em micro-ondas.....	106
4.2.2	Efeito da peneira molecular na síntese de ascorbil oleato em micro-ondas .....	111
4.2.3	Reuso da enzima utilizada na reação da síntese em micro-ondas 112	
4.2.4	Síntese enzimática com líquido iônico como solvente.....	113
4.3	CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA DO PRODUTO POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) 116	
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	118
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	122

<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>125</b>
5.1	CONCLUSÕES .....	125
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	126
<b>6</b>	<b>PUBLICAÇÕES ADVINDAS DO DESENVOLVIMENTO DA TESE</b> <b>127</b>	
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>147</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>150</b>
	<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>153</b>
	<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>154</b>



## SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO UTILIZANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS

### Por quê?

- \* O ácido ascórbico é um antioxidante pouco solúvel dificultando a sua aplicação em alguns produtos;
- \* Catalisadores enzimáticos são considerados de baixo impacto ambiental e podem ser reutilizados;
- \* Ultrassom e micro-ondas são processos “tecnológicos verdes”.

### Quem já fez?

- \* Poucos são os trabalhos de esterificação do ácido oléico para a produção de ascorbil oleato, e não foi encontrado nenhum trabalho que utiliza as tecnologias empregadas;
- \* Não existem na literatura trabalhos de identificação da atividade antimicrobiana para o ascorbil oleato, somente o trabalho de Reyes-Duarte et al. (2011) que realizou o estudo da atividade antioxidante.

### Hipóteses?

- \* É possível obter elevadas conversões em éster empregando catalisadores de baixos impacto ambiental;
- \* Possibilidade da obtenção do éster em diversos processos.

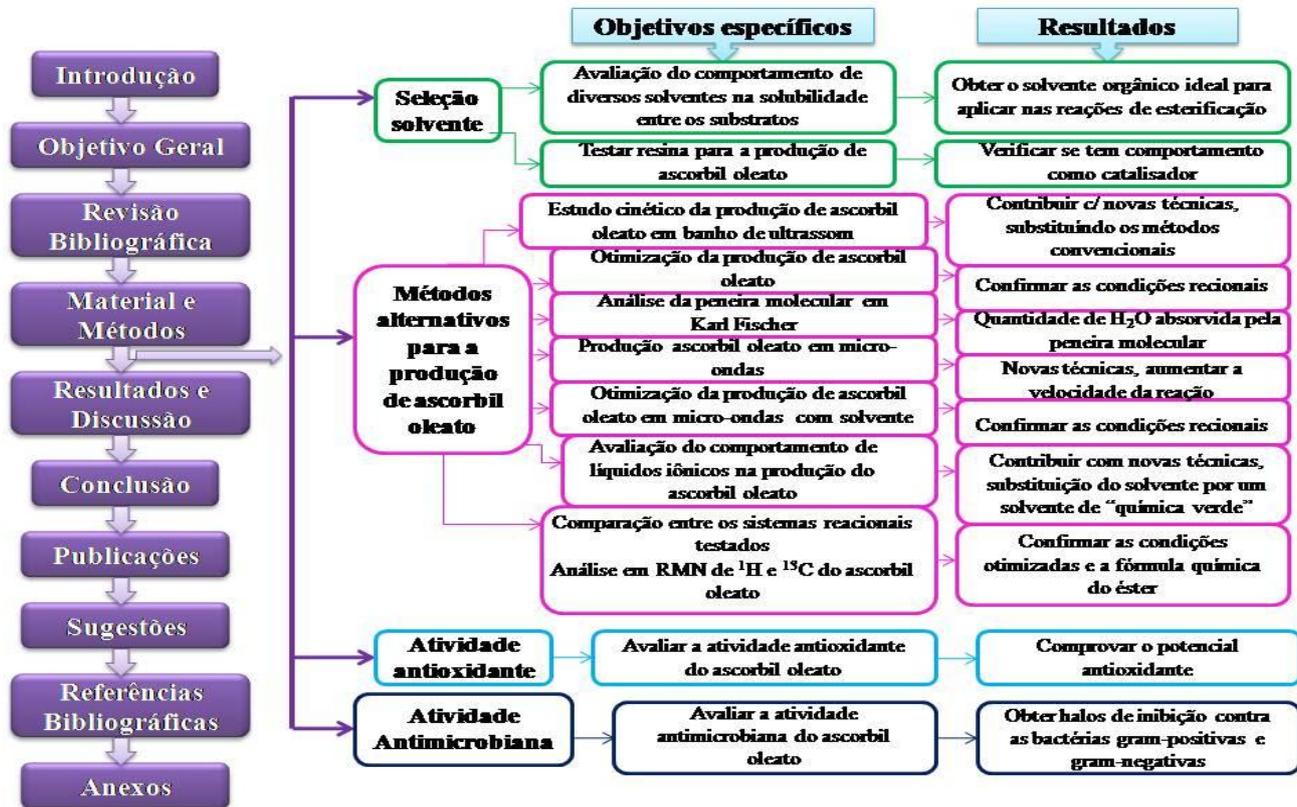
### Métodos experimentais

- \* Quantificação do éster por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- \* Identificação do éster por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono;
- \* Determinação da atividade antioxidante dos substratos e do produto;
- \* Determinação da atividade antimicrobiana dos substratos e do produto;
- \* Caracterização do éster em relação ao poder rotatório.

### Resposta

- \* Determinar o método que permite a maior produção de ascorbil oleato;
- \* Avaliar a viabilidade técnica dos métodos de produção propostos;
- \* Confirmar a produção do éster por RMN;
- \* Determinar a capacidade antioxidante e antimicrobiana do produto.







## 1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados, pois quando adicionados aos alimentos controlam o processo de oxidação, visando o aumento da sua vida útil. O desenvolvimento de novos compostos com maior capacidade antioxidante e menor toxicidade é desejável para a prevenção ou tratamento de uma série de doenças e para uma melhor preservação dos alimentos (TORRES DE PINEDO et al., 2007).

O ácido L-ascórbico ou vitamina C é um antioxidante que tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. No entanto, seu comportamento altamente hidrofílico dificulta sua aplicação na presença de óleos e gorduras (LIU et al., 1996). Para solucionar o problema de baixa lipossolubilidade, derivados de L-ascórbico são sintetizados (WATANABE et al., 2008).

Uma maneira eficaz para alterar a solubilidade é a modificação do L-ascórbico via esterificação (REYES-DUARTE et al., 2011). A esterificação é uma reação que ocorre entre um ácido e um álcool formando éster e água. Portanto, o ascorbil oleato é formado pela esterificação de ácido oleico com ácido L-ascórbico para formar um éster de vitamina C. Essa reação em condições normais é lenta, mas o uso de biocatalisadores como as lipases aumenta a velocidade da reação (RAJENDRAN et al., 2009). A capacidade das enzimas em catalisar reações de síntese tem sido avaliada devido às vantagens que esse método propicia frente aos métodos convencionais, além disso, há uma busca por produtos naturais tornando ainda mais promissor este processo. Segundo Watanabe (2001), ascorbil ésteres são compostos anfifílicos. O ascorbil oleato (6-O-ascorbil oleato) é um éster de vitamina C lipossolúvel. Quando incorporado pelas membranas celulares das hemácias humanas, o ascorbil oleato protege contra os danos oxidativos e protege o  $\alpha$ -tocoferol (um antioxidante solúvel em gordura) da oxidação por radicais livres (ROSS et al., 1999).

Recentemente, reações de síntese de ascorbil ésteres, utilizando lipases como catalisadores em solvente orgânico foram relatadas (CHANG et al., 2009; LERIN et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Para identificar as condições ótimas da esterificação catalisada por lipase, é essencial primeiramente investigar a solubilidade e os mecanismos da reação.

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos próximos aos processos executados pela natureza. Estas enzimas são amplamente utilizadas para catalisar reações de interesse (BATISTELLA et al., 2012). Além disso, os mecanismos cinéticos têm sido propostos para proporcionar reações catalisadas por lipases. Hoje em dia, muitos ascorbil ésteres como ascorbil oleato (REYES-DUARTE et al., 2011), ascorbil palmitato (YAN et al., 1999; VIKLUND et al., 2003; LERIN et al., 2012) e ascorbil linoleato (WATANABE et al., 2008) são sintetizados por esterificação enzimática em solvente orgânico.

A catálise enzimática tradicional limita o estudo de reações em meio aquoso, o que restringe as possibilidades de aplicações industriais. Baron (2003) comprovou que as lipases se desenvolvem em ambientes ricos em lipídeos, assim ambientes com restrição de água também podem ser meios adequados para a catálise enzimática. Pesquisas dedicadas a explorar a biocatálise, nos chamados meios reacionais não convencionais, foram iniciadas, nos quais podem ser incluídos os solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fluidos iônicos, fases gasosas e sólidas.

O sistema de irradiação ultrassônica é uma técnica promissora de processamento químico. Geralmente, o uso de ultrassom de alta intensidade (baixa frequência) é de grande importância para promoção de mistura, dispersão e emulsão. Quando um líquido está sob a influência do ultrassom de alta intensidade, as ondas sonoras se propagam no meio, alternadamente, resultando em intervalos de alta e baixa pressão. Durante um intervalo de baixa pressão, pequenas bolhas de vácuo são criadas no líquido. Quando estas bolhas atingem um volume que não podem mais absorver energia, elas colapsam violentamente. Este fenômeno é chamado de cavitação (HIELSCHEIR, 2005). Em reações enzimáticas o ultrassom contribui para reduzir as limitações de transferência de massa entre o substrato e a enzima, aumentando a velocidade da reação. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada catalisador e dependente dos parâmetros de sonicação (MARTINEZ et al., 2000).

O ascorbil oleato tem comprovadamente maior atividade antioxidante do que o ascorbil palmitato. A reação de síntese de ascorbil oleato utilizando como substratos L-ascórbico e o ácido oleico é de difícil solubilidade, devido ao fato de o ácido L-ascórbico ser hidrofílico e possuir preferência por solventes polares, já o ácido oleico é hidrofóbico e tem solubilidade favorecida em solventes apolares

(MORENO-PEREZ et al., 2013). Então, a adição de quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade dos substratos e de tornar a reação possível (AIRES-BARROS, 2002).

O uso de solventes orgânicos apresenta diversas vantagens tais como: a possibilidade de deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, fácil recuperação do substrato e produtos com alta proporção; é possível o uso de substratos não polares e em muitos casos as lipases são termodinamicamente mais ativas (GOTOR-FÉRNANDEZ et al., 2006). Desta forma, reações como a esterificação e a interesterificação tornam-se viáveis industrialmente (SHARMA et al., 2001).

Uma alternativa para solucionar o problema da solubilidade entre os substratos servindo como substituto aos solventes orgânicos são os líquidos iônicos. A catálise enzimática tem muitas vantagens frente às tecnologias químicas e quando realizada em líquidos iônicos torna-se um método “verde” alternativo para a produção de ascorbil ésteres. A combinação de enzima/líquido iônico geralmente exibe um efeito sinérgico excelente que realça a atividade e a durabilidade do sistema catalítico (LOZANO et al., 2007).

Outro método que tem sido reportado como bastante eficiente na melhoria do rendimento de reações é a irradiação do meio reacional por micro-ondas (MW). Este método já se provou ser uma fonte de energia limpa, rápida e conveniente (YADAV; LATHI, 2004) que tem sido amplamente utilizada em química orgânica, no lugar do aquecimento externo, pela condução de uma fonte externa de calor. A irradiação por meio de micro-ondas produz aquecimento interno eficiente por meio de acoplamento direto da energia de micro-ondas, com as moléculas do solvente, dos substratos e do catalisador na mistura reacional, conduzindo a tempos de reação curtos e permitindo se obter bons rendimentos (LEADBEATER, 2010; COSTA et al., 2014).

Face ao exposto, justifica-se a avaliação da produção de ascorbil oleato a partir da utilização de ácido ascórbico e ácido oleico como substratos e da lipase imobilizada comercial Novozym 435<sup>®</sup> como catalisador de baixo impacto ambiental, em reações assistidas por ultrassom ou micro-ondas e em reações utilizando líquidos iônicos como solventes. As tecnologias acima citadas são de fundamental importância para comparação dos sistemas reacionais e do desempenho destas na produção de ascorbil oleato, como também poderá auxiliar no estudo do comportamento dos solventes orgânicos e dos líquidos iônicos durante o processo de produção e até mesmo na solubilidade dos substratos. Após

a seleção das condições mais apropriadas para a produção do éster, análises da atividade antioxidante e antimicrobiana foram realizadas para avaliar o potencial de aplicação do éster produzido. Este estudo se justifica por apresentar uma tecnologia inovadora na síntese de ésteres com propriedades benéficas com potencial para serem empregados como aditivos na indústria de alimentos, bem como antioxidantes nas indústrias de cosméticos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Investigar alternativas para a produção enzimática de ascorbil oleato catalisada por lipase imobilizada comercial de *Candida antarctica* utilizando diferentes sistemas reacionais, como o uso de solventes orgânicos, líquidos iônicos, ultrassom e micro-ondas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos destacam-se:

#### **Etapa I – Testes de solubilidade dos solventes orgânicos e do comportamento da resina**

- Avaliação do comportamento de diversos solventes orgânicos na solubilidade entre os substratos;
- Análise com resina para a produção de ascorbil oleato;

#### **Etapa II – Produção de ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom**

- Estudo cinético da produção de ascorbil oleato em banho de ultrassom;
- Otimização da produção de ascorbil oleato;
- Avaliação da quantidade de água retida na peneira molecular por meio do método em Karl Fischer;

#### **Etapa III – Produção de ascorbil oleato em micro-ondas**

- Produção de ascorbil oleato em micro-ondas com solvente orgânico;

- Otimização da produção de ascorbil oleato em micro-ondas com solvente orgânico;

#### **Etapa IV – Produção de ascorbil oleato em líquidos iônicos**

- Avaliação do comportamento da produção do ascorbil oleato utilizando líquidos iônicos como solvente;

#### **Etapa V – Caracterização do produto**

- Comparação entre os sistemas reacionais testados;
- Identificar o produto por meio da RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Avaliar a atividade antioxidante do ascorbil oleato e do ácido ascórbico;
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Identificar o poder rotatório específico do ascorbil oleato.



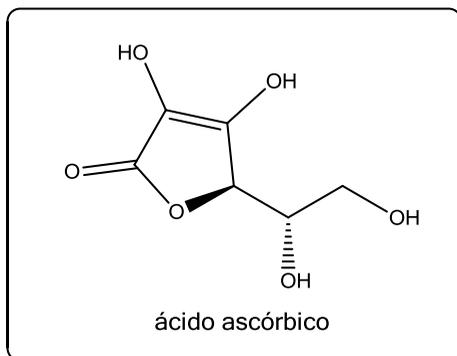
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à síntese enzimática de ésteres. Com base no exposto na introdução, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, será dada ênfase especial nos processos alternativos para a síntese enzimática de ascorbil oleato em solventes orgânicos, sistemas assistidos por ultrassom, irradiação de micro-ondas e líquidos iônicos, todas as etapas envolvidas no contexto desta proposta, sendo que a primeira etapa dos experimentos foi realizada na Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, Brasil, e a segunda etapa realizada na *Università Degli Studi di Ferrara* em Ferrara, Itália.

### 2.1 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico ou vitamina C ( $C_6H_8O_6$ ) é um sólido cristalino de cor branca, inodoro, hidrossolúvel e solúvel em poucos solventes orgânicos. O ácido ascórbico pode ser encontrado em frutas e legumes. É um poderoso antioxidante hidrofílico, além de responsável pela hidroxilação do colágeno e da proteína fibrilar que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Usado também na síntese de algumas moléculas. A Figura 1 ilustra a fórmula estrutural do ácido ascórbico.

Figura 1 - Estrutura do ácido L-ascórbico



Fonte: Autor (2015)

Segundo Keller e Fenske (1998) a vitamina C mostra efeito sinérgico em conjunto com outros antioxidantes como os tocoferóis e o  $\beta$ -caroteno. A vitamina C também melhora a elasticidade da pele e reduz as rugas, estimulando a síntese de colágeno (PHILIPS et al., 1994).

Entre os antioxidantes naturais, 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. Por isso, muitos métodos têm sido desenvolvidos visando à produção de antioxidantes. Assim, pesquisas têm investigado a síntese de antioxidantes naturais e seus derivados (SHAHIDI et al., 1992; KARMEE, 2009). A aplicação de vitamina C como antioxidante em alimentos lipofílicos é rara, devido à sua pouca solubilidade em meios não aquosos. O problema da solubilidade pode ser contornado por meio da conversão de vitamina C hidrofílica em ésteres hidrofóbicos, o que melhora a sua solubilidade em ambientes lipofílicos, bem como aumenta a capacidade de eliminação de radicais (LIU et al., 1996). É importante que ésteres de ácidos graxos derivados de ácido L-ascórbico não adicionem gosto, cheiro e cor indesejáveis aos alimentos e cosméticos.

## 2.2 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos que possuem uma cadeia apresentando grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) ligado a uma cadeia alquílica longa, classificados como saturados ou insaturados. As cadeias dos ácidos saturados são flexíveis e distendidas, podendo associar-se extensamente uma com a outra por meio de interação hidrofóbica. As cadeias dos ácidos insaturados são mais comumente encontradas na gordura vegetal, enquanto os saturados são mais encontrados em gordura animal. A maioria dos ácidos graxos possui uma cadeia de números pares de átomos de carbono (4 a 36). A Tabela 1 mostra a nomenclatura de alguns ácidos graxos naturais. Os ácidos graxos reagem de maneira semelhante aos demais ácidos carboxílicos como, por exemplo, na esterificação reagem com alcoóis, produzindo ésteres (IUPAC, 1997).

Quando os ácidos graxos são saturados, estes possuem apenas ligações simples entre os carbonos e possuem reatividade química. Já os ácidos graxos insaturados contêm uma ou mais ligações duplas na sua cadeia carbônica, sendo mais reativos e mais susceptíveis à termo-oxidação. Os ácidos graxos insaturados são, na maioria, líquidos à

temperatura ambiente, pois a presença de insaturação nas cadeias carboxílicas dificulta a interação intermolecular, enquanto que os ácidos graxos saturados, que têm uma maior facilidade de empacotamento intermolecular, são sólidos.

Os ácidos graxos possuem uma tendência à oxidação e muitas vezes suas propriedades organolépticas (sabor e aroma) são consideradas indesejáveis quando estes são incorporados em alimentos e cosméticos (LIU et al., 2011). Os ácidos graxos poli-insaturados desempenham um importante papel na nutrição humana. No entanto, existe uma procura por produtos naturais ricos em ácidos graxos poli-insaturados e triacilgliceróis que possuam altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados. Estes produtos podem ser produzidos utilizando plantas geneticamente modificadas, bem como métodos enzimáticos. O principal interesse são nos ácidos  $\gamma$ -linoleico, ácido docosaheptaenoico, ácido eicosaenoico e o ácido linoleico conjugado (ADAMCZAK et al., 2005).

Tabela 1 - Nomenclatura dos ácidos graxos

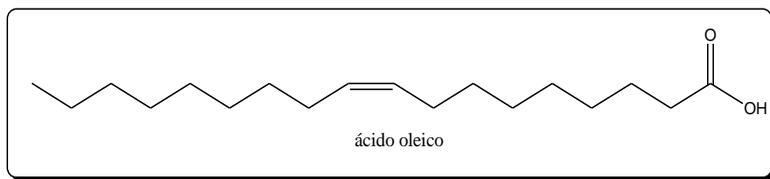
<b>Nomenclatura dos ácidos graxos</b>	<b>Número de carbonos: insaturações</b>
láurico (dodecanoico)	12:0
mirístico (tetradecanoico)	14:0
palmítico (hexadecanoico)	16:0
palmitoleico (9(Z)-hexadecenoico)	16:1
esteárico (octadecanoico)	18:0
oleico (9(Z)-octadecanoico),( $\omega$ -9)	18:1
linoleico (9(Z),12(Z)-octadecanoico),( $\omega$ -6)	18:2
linolênico (9(Z),12(Z),15(Z)-octadecanoico),( $\omega$ -3)	18:3
araquídico (eicosanoico)	20:0
araquidônico (5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)-eicosatetraenoico)	20:4
lignocérico (tetracosanoico)	24:4

Fonte: IUPAC (1997)

### 2.2.1 Ácido oleico

O ácido oleico é um ácido carboxílico (COOH) que possui cadeia longa com 18 carbonos na sua estrutura, composto por dupla ligação entre os carbonos, sendo assim é um ácido graxo insaturado como ilustra a Figura 2. O ácido oleico é um ácido graxo (ômega 9) que participa do metabolismo humano, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios (CAMPOS SALES et al., 2013). Além disso, nos últimos anos o ácido oleico tem atraído atenção especialmente com a "dieta mediterrânea", caracterizado pelo óleo de oliva (rico em ácido oleico). Seu consumo está ligado ao efeito protetor contra o câncer. Estudo recente demonstrou que ácido oleico promove o crescimento de células não malignas, ou seja, tem o efeito oposto das células malignas (PAUWELS, 2011).

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido oleico



Fonte: Autor (2015)

O ácido oleico é também utilizado como aditivo em base de sabonetes e sabões com o intuito de promover lubrificidade e emoliência, sendo empregado em cosméticos (protetor solar e antissinais) recompondo a oleosidade da pele. Pode ser encontrado em alguns alimentos como no azeite de oliva, abacate, castanha de caju, amendoim, óleo de palma, castanha do Pará, óleo de canola, semente de linhaça e nozes (IBRAHIM et al., 2012).

### 2.3 ASCORBIL ÉSTERES

A vitamina C e o ácido oleico têm sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos. A vitamina C, antioxidante natural, é solúvel em água, ou seja, seu caráter é hidrofílico, no entanto reduzindo sua eficácia na estabilização de óleos e gorduras (SONG; WEI, 2002).

Os tocoferóis e o ácido L-ascórbico, antioxidantes naturais, são eficientes em retardar a oxidação lipídica em alimentos. No entanto, métodos têm sido desenvolvidos visando à produção de antioxidantes, pois a quantidade de antioxidantes obtidos a partir de recursos naturais não é suficiente para atender às exigências. Assim, pesquisas como de Karmee (2009) investigaram a síntese de antioxidantes naturais e seus derivados, estudando a síntese de ésteres de vitamina C devido à regioselectividade e ao alto rendimento do produto. Geralmente, para a acilação de vitamina C são utilizados ácidos graxos (saturados ou insaturados), ésteres de ácidos graxos (metil, etil ou vinil) e triglicerídeos como doadores de acila, que são obtidos a partir de recursos renováveis.

Segundo Watanabe et al. (2001), ascorbil ésteres são compostos anfifílicos, ou seja, formam agregados em sistema aquoso com um núcleo lipofílico interior e uma superfície hidrofílica exterior. Estes tipos de sistemas têm sido utilizados para a estabilização e solubilização de moléculas de drogas sensíveis (PALMA et al., 2002). A droga hidrofóbica permanece no núcleo hidrofóbico, portanto, protegida da oxidação. Estudos revelam que os ascorbil ésteres impedem a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LIU et al., 1996). Além disso, ascorbil ésteres podem agir como promotores antimitógenos e antitumorais (RAO et al., 1995).

Os ácidos graxos saturados têm sido amplamente utilizados como doadores acila para produção de ascorbil ésteres de ácidos graxos. O ascorbil palmitato (HUMEAU et al., 1998; VIKLUND et al., 2003; LERIN et al., 2011; JIANG et al., 2013), ascorbil oleato (ROSS et al., 1999, SONG et al., 2002, VIKLUND et al., 2003 ADAMCZAK 2009; REYS-DUARTE et al., 2011; ZHONG et al., 2013; BEZBRADICA et al., 2013; MORENO-PEREZ et al., 2013) e ascorbil linoleato (SONG et al., 2006; WATANABE et al., 2008) têm sido utilizados como antioxidantes. Os óleos são compostos principalmente por triacilgliceróis e estes oferecem uma rota alternativa para a síntese de ascorbil ésteres. A reação de ácido L-ascórbico diretamente com óleos pode produzir uma mistura de ascorbil ésteres de ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia (WATANABE et al., 2001).

A reação de esterificação catalisada por lipase utilizando agitação mecânica é uma das reações mais estudadas (LOZANO et al., 2012; TAN et al. 2010; MARTINS et al., 2011; SHU et al., 2011). No entanto, o ultrassom tem se tornado uma fonte alternativa de energia homogeneizadora com grande potencial de aplicação nas reações enzimáticas. Deshmane (2009) e Zheng (2013) estudaram a influência

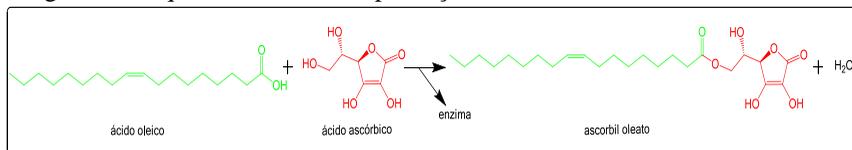
positiva do ultrassom sobre os parâmetros cinéticos das reações de esterificação catalisadas por enzimas, a aplicação do ultrassom para este tipo de reação foi pouco explorada. Martins et al. (2013) utilizaram dois sistemas reacionais diferentes, o ultrassom e agitação mecânica, para a esterificação do ácido acético e butanol e adicionaram como catalisador da reação a lipase imobilizada Novozym 435<sup>®</sup>. Os autores obtiveram como resultado o aumento da produtividade da reação em 7,5 vezes com ultrassom, provando assim a eficiência do seu uso.

Devido às propriedades antioxidantes, o ascorbil palmitato (6-*O*-palmitoil-L-ácido áscórbico) é um éster anfipático do ácido L-ascórbico que é usado amplamente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (VIKLUND et al., 2003). Sua produção ocorre por meio da síntese por catálise ácida de acilação de ácido L-ascórbico. A catálise enzimática diferentemente da catálise química de acilação de ácido L-ascórbico usando ácido palmítico ou seus ésteres como doador de acila foram desenvolvidos como método alternativo para a síntese de ascorbil palmitato (VIKLUND et al., 2003). A síntese enzimática possui como vantagens as condições moderadas de reação, os altos rendimentos e produtos mais puros (HSIEH et al., 2005).

Song e Wei (2002) obtiveram o éster a partir de ácido oleico e ácido ascórbico sintetizado utilizando lipases imobilizadas, reação realizada em shaker com o solvente álcool *t*-amílico e temperatura de 55 °C. Peneiras moleculares (4 Å) foram adicionadas. A partir do objetivo de otimizar a reação de produção do ascorbil oleato foram encontradas as condições ótimas da reação cinética de acordo com o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi. Para obter baixo impacto ambiental o estudo desta tese sugere à utilização do ultrassom, micro-ondas e líquidos iônicos em substituição as condições encontradas na literatura.

A Figura 3 ilustra a reação de esterificação enzimática realizada no estudo que será apresentado nesta tese.

Figura 3 - Esquema reacional da produção enzimática de ascorbil oleato



Viklund et al. (2003) realizaram um estudo de comparação das propriedades antioxidantes de ascorbil palmitato e ascorbil oleato pela adição de 600 mg de cada antioxidante para 1 kg de óleo de canola. Em seguida, os valores de peróxidos foram medidos ao longo de semanas a 30 e 40 °C. Os dados apresentados mostram que o desenvolvimento de peróxido foi alto após 4 semanas a 40 °C em óleo, 9 semanas a 30 °C para ascorbil oleato e 3 semanas a 30 °C e 2 semanas a 40 °C para o ascorbil palmitato. O conteúdo de tocoferol nas amostras de óleo foi analisado após 10 semanas a 40 °C. Observou-se que no óleo sem ascorbil éster não havia tocoferol, enquanto 3 % de  $\gamma$ -tocoferol foi encontrado na amostra com ascorbil palmitato e 57 % de  $\gamma$ -tocoferol e 86 %  $\delta$ -tocoferol foram encontrados na amostra de ascorbil oleato. Os resultados demonstram que o ascorbil oleato apresentou maior atividade antioxidante se comparado com o ascorbil palmitato.

Adamczak e Bornscheuer (2009) determinaram os parâmetros que influenciam a síntese de ascorbil oleato em líquidos iônicos utilizando a lipase comercial imobilizada B e peneira molecular (retirada da água no sistema) em sistema de agitação magnética a 60 °C por 24 h. Observa-se que a síntese enzimática de ascorbil oleato em líquidos iônicos foi afetada pela atividade da água. Os autores obtiveram rendimento de 72 % de ascorbil oleato obtido depois de 14 h. O ascorbil oleato demonstrou alta atividade interfacial e propriedades de um emulsificante. Diferentemente do estudo apresentado nesta tese que utiliza micro-ondas, ultrassom e solvente orgânico.

Bezbradica et al. (2013) estudaram a cinética da síntese de ascorbil oleato catalisada por lipase imobilizada utilizaram como solvente a acetona e a reação foi realizada em shaker (250 rpm). A cinética da reação foi examinada para descrever o mecanismo de reação e estabeleceu-se um modelo que descreve o fluxo da reação. Assim, apresentaram como resultados o mecanismo de síntese catalisada por lipase de ésteres de vitamina C e um novo modelo que prevê a dependência da concentração do produto e tempo de reação, sendo de grande importância para a otimização da reação e para aumentar a produtividade da síntese de ésteres de vitamina C.

Os ésteres de ácidos graxos e de ácido ascórbico ocupam um lugar importante como potencial antioxidante e como surfactante em alimentos e cosméticos de elevado teor de gordura. A otimização da síntese enzimática de ascorbil ésteres com maior produtividade e redução dos custos utilizando condições mais favoráveis, tornando-se atraente para os fabricantes e trazendo benefícios para o consumidor (CHANG et al., 2009).

## 2.4 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A esterificação é uma reação relativamente simples que consiste na condensação do ácido carboxílico livre e o álcool, formando éster e água, como pode ser observado na Figura 4. Contudo, esta reação é lenta por isso se recorre à utilização de enzimas como catalisadores, para que ocorra o aumento da velocidade da reação (RAJENDRAN et al., 2009). Essa reação acontece em sistema com teor de água baixo usando diferentes solventes ou mesmo em meios sem solvente. Além disso, diversos fatores afetam a atividade da lipase como a natureza do substrato e do solvente, temperatura e quantidade de água (SERRA et al., 2005; TORRES et al., 2009, EISENMENGER, 2010).

Figura 4 - Enzima como catalisador na síntese de ésteres por esterificação



Fonte: Autor (2015)

A influência da razão molar do substrato pode ser explicada pela termodinâmica da reação. A fim de melhorar os rendimentos é interessante utilizar excesso de álcool na reação. Um dos produtos da reação de esterificação é a água e um aumento excessivo do teor de água tem efeito negativo no rendimento da conversão (GRAEBIN et al., 2012). Além disso, tem sido relatado que algumas enzimas são menos ativas na presença de excesso de água (OGNJANOVIC et al., 2009). No entanto, uma concentração mínima de água é necessária para que a enzima mantenha ativo seu estado tridimensional. A água também contribui para a integridade estrutural, atividade do sítio de polaridade e estabilidade da proteína (YAHYA et al., 1998).

Uma das mais importantes classes de compostos orgânicos sintetizados por vários mecanismos são conhecidos como ésteres obtidos por meio da reação de esterificação. Os ésteres de ácidos graxos obtidos enzimaticamente possuem aplicações em produtos para cuidado pessoal (HASAN et al., 2006). As lipases podem catalisar a síntese de ésteres de

poliglicerol, ésteres conhecidos como ingredientes multifuncionais, usados como emulsificantes para a solubilização das vitaminas lipossolúveis e assim facilitar a incorporação destas nos sistemas lipofóbicos, também podem ser utilizados como aditivos em margarinas, coberturas, sobremesas, sorvetes e produtos de panificação (CASTRO et al. 2004).

Os ascorbil ésteres de ácidos graxos são geralmente sintetizados por métodos químicos usando catalisadores alcalinos ou ácidos (SCHULER, 1990). A síntese química possui alguns problemas como os subprodutos obtidos por rotas químicas, o baixo rendimento do produto devido à falta de regiosseletividade das reações e a necessidade de processos de purificação. Além destes problemas, a esterificação e transesterificação química, na maioria das vezes, são realizadas a temperaturas elevadas, ocorrendo degradação e oxidação da vitamina C.

## 2.5 LIPASES

Os produtos de interesse comercial possuem algumas limitações para sua obtenção, isso se deve aos tipos de catalisadores químicos empregados, os quais são pouco versáteis, além de exigirem elevadas temperaturas para obter razoáveis velocidades de reação. Podem fornecer subprodutos de decomposição química ou contaminação, devido à reduzida especificidade, assim necessitando de etapas posteriores como a purificação, ocasionando o aumento de custo do processo. Os catalisadores enzimáticos, diferentemente dos catalisadores químicos, não necessitam de elevadas temperaturas para obter resultados satisfatórios, são de natureza proteica ou glicoproteica que atuam em condições brandas de pH, pressão e temperatura entre 30 a 70 °C e possuem grande seletividade (químio, régio e enantio). Portanto, este comportamento das enzimas resulta na redução dos custos do processo, pois elevada especificidade resulta em maior rendimento do processo, por fim obtendo produtos biodegradáveis e reduzindo a quantidade de resíduos (DE CASTRO et al., 2004).

Atualmente, as áreas de enzimologia e engenharia de proteínas ampliaram o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais, entre os quais destacam-se as reações de síntese, hidrólise e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. A alta estabilidade em solventes orgânicos é um dos grandes potenciais biotecnológicos dessas enzimas, que exibem alta enantioseletividade e possuem larga especificidade pelo substrato (DE CASTRO et al., 2004).

As principais fontes de obtenção das lipases são as plantas (sementes oleaginosas, grãos), os animais (órgãos como fígado, pâncreas, estômago) e alguns micro-organismos (leveduras, fungos, bactérias) (PAQUES; MACEDO, 2006). Segundo Villeneuve et al. (2010) as enzimas digestivas são importantes para a mobilização da gordura utilizada como fonte de energia nos seres vivos, assim como para o metabolismo intracelular de lipídeos nas membranas biológicas.

As lipases são classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases - E.C. 3.1.1.3). São biocatalisadores versáteis que são usados nas reações de hidrólise de óleos e gorduras. Entretanto, sob condições reacionais específicas, também são capazes de catalisar as reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (RAJENDRAN et al., 2009). A síntese de triacilglicerol pode ocorrer em condições de baixa concentração de água. As enzimas hidrolíticas atuam na interface orgânico-aquosa e não necessitam de cofatores para sua atividade. Apresentam grande importância na biocatálise atual, devido à imensa capacidade de catalisar diversas reações, além de serem estáveis tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (CARVALHO et al., 2005).

Devido a sua versatilidade de aplicações, essas enzimas são usadas para diversos propósitos biotecnológicos, como catalisadores na produção de biodiesel (FAN et al., 2012), na indústria de alimentos, na indústria de papel, ou seja, em diversas sínteses químicas (SHARMA et al., 2001) e síntese de materiais biopoliméricos (YU et al., 2012). Estima-se que cerca de 50 % dos processos químicos possam ser substituídos por processos biotecnológicos isolados até o ano de 2025, ou mesmo pela integração entre catálise enzimática e reações químicas (ANTUNES, 2005).

Os processos biocatalíticos são mais seguros do que os processos químicos devido às condições ambientais, de segurança e da purificação do produto. Os processos catalisados por enzimas eram considerados mais caros do que os processos químicos devido ao maior custo da enzima livre, mas atualmente utiliza-se a enzima imobilizada, que pode ser reutilizada. Além disso, nos últimos anos, o custo da enzima foi reduzido devido ao aumento na sua produtividade (WAGHMARE et al., 2015).

Segundo Garcia-Galan et al. (2011) as enzimas imobilizadas possuem algumas vantagens frente às enzimas livres, tais como:

- Aumentam o número de moléculas por unidade de área, aumentando a eficiência da reação;
- Reutilização da enzima, permitindo o uso contínuo;

- Aumento das propriedades cinéticas;
- Melhor controle do processo catalítico;
- Aumento da estabilidade;
- Eliminação da contaminação microbiana;
- Produto livre de enzima.

Alguns sistemas reacionais necessitam de agitação para garantir uma boa homogeneização do meio. Neste sentido, os materiais para a imobilização da enzima, apresentando uma elevada resistência mecânica são particularmente desejáveis para estes sistemas. Quando na reação há presença de solvente, exigem-se materiais com elevada resistência química. Outra característica importante é a capacidade do suporte de ser regenerado com enzimas novas e ativas, uma vez que poderá ocorrer a perda de atividade enzimática ao longo do tempo (YAHYA et al., 1998).

## 2.6 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Os processos enzimáticos são específicos para o álcool primário, obtendo-se o correspondente ao 6-O-ascorbil éster. O ascorbil palmitato é um dos tipos de ésteres que é mais solúvel em gorduras do que o ácido ascórbico em si. Já os ascorbil ésteres de ácidos graxos insaturados, como por exemplo, o ascorbil oleato ou linoleato exibem melhor miscibilidade com o  $\alpha$ -tocoferol e óleos ou gorduras, tendo também como vantagem o uso como aditivos em alimentos (REYES DUARTE et al., 2011).

### 2.6.1 Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos são usados em reações de esterificação catalisadas por lipases, pois possuem algumas vantagens como facilidade na recuperação do substrato e produtos em alta proporção, substratos não polares e em alguns casos as lipases são termodinamicamente mais ativas (GOTOR-FERNANDEZ et al., 2006). A maioria dos trabalhos de síntese enzimática utiliza solventes orgânicos, podendo ser citados nos seguintes trabalhos:

- 2-metil 2-butanol (SONG et al., 2006);
- acetona (YAN et al., 1999; ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; BEZBRADICA et al., 2013; STOJANOVIC et al., 2013; JIANG et al., 2013);

- etanol, piridina, tetrahydrofurano, butanol, octanol e hexanol (SONG e WEI, 2002);
- álcool t-amílico (SONG e WEI, 2002; VIKLUND et al., 2003; SONG et al., 2004; MORENO-PEREZ et al., 2013);
- terc-butanol (YAN et al., 1999; LIU et al., 2011);
- acetonitrila (CHANG et al., 2009; JIANG et al., 2013);
- terc-butanol (LERIN et al., 2011);
- terc-pentanol (JIANG et al., 2013);
- hexano (SONG e WEI, 2002; JIANG et al., 2013);
- DMSO (ZHANG et al., 2013; JIANG et al., 2013);

A partir destes estudos, observa-se a necessidade do uso de solventes orgânicos na solubilização dos substratos, os quais são pouco solúveis em água, o que demanda grande volume reacional e procedimentos de separação complexos.

As reações para produção de ésteres utilizam solventes orgânicos, pois necessitam de um solvente que auxilie na solubilização dos substratos. O critério mais importante na seleção de um solvente não aquoso é sua compatibilidade com o catalisador e os substratos da reação. Para tal, o solvente orgânico não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima. As lipases podem ser usadas para sintetizar ésteres sob condições com baixa quantidade 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).

Alguns ésteres vinílicos de ácidos graxos tais como C8, C10, C12 e C16 foram estudados para a produção de ascorbil ésteres utilizando como solvente orgânico a acetona ou terc-butanol, o catalisador foi a lipase comercial Chirazyme L-2. As reações foram conduzidas a 40 °C e agitação com barra magnética. Os autores relatam que com o solvente terc-butanol, os ácidos graxos com cadeias longas e a utilização de excesso de ésteres vinílicos conduziram a conversões de até 91 % (YAN et al., 1999).

Song e Wei (2002) confirmaram em seu estudo que os solventes com elevada polaridade podem formar uma camada de água em torno da enzima, o ácido L-ascórbico tem uma concentração baixa em solventes com alto log P. A diferença entre os solventes está na polaridade, assim afetando a forma de interação entre a água e o solvente.

Segundo Lerin (2010) a adição de solvente ao meio reacional conduzido em ultrassom 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.

### **2.6.2 Peneiras moleculares**

As peneiras moleculares são sólidas, cujas estruturas contêm poros e cavidades com dimensões moleculares que possuem capacidade de difusão seletiva de moléculas em seu espaço intracristalino. Dentre as peneiras moleculares, as zeólitas constituem o grupo mais conhecido, estas por sua vez são aluminossilicatos utilizadas em vários processos industriais como catalisadores e adsorventes. A estrutura das zeólitas é composta pelo encadeamento de unidades  $TO_4$ , onde T é um átomo de silício (Si) ou alumínio (Al), coordenado por quatro átomos de oxigênio (O) em geometria tetraédrica (MEIER, 1968). A presença dos canais e das cavidades nas peneiras moleculares faz com que as peneiras moleculares apresentem alta área superficial e microporosidade, sendo estas algumas das propriedades responsáveis por sua utilização como catalisadores e adsorventes importantes.

A estrutura microporosa faz com que as zeólitas apresentem uma enorme superfície interna em relação à externa, permitindo a transferência de matéria entre os espaços intracristalinos e o meio externo. Segundo Maia (2007), a transferência de matéria é limitada pelo diâmetro dos poros das zeólitas, ou seja, só poderão entrar ou sair deste espaço cristalino aquelas moléculas cujas dimensões são inferiores a certo valor crítico, o qual varia de uma zeólita para outra. Dessa forma, somente as moléculas com dimensões menores ao tamanho crítico podem entrar nas cavidades e alcançar as posições de catálise para por fim reagir.

O tamanho do poro é a abertura bidimensional da zeólita e é determinada pelo número de átomos tetraédricos ligados em sequência. As zeólitas são classificadas de acordo com o tamanho: poros pequenos ( $<4 \text{ \AA}$ ), médios ( $4 \text{ a } 6 \text{ \AA}$ ), grandes ( $6 \text{ a } 8 \text{ \AA}$ ), supergrandes ( $>8 \text{ \AA}$ ) e mesoporos ( $> 20 \text{ \AA}$ ) (GUINNET; RIBEIRO, 2004). Quando as zeólitas são usadas nas reações como catalisadores em meio líquido, o solvente da reação exerce influência sobre o tipo de substrato que terá acesso ao sítio ativo no interior dos canais e cavidades. Neste caso, a zeólita extrai da fase líquida as moléculas de substrato, isso ocorre somente se houver

compatibilidade entre as características físico-químicas da zeólita com o substrato. Portanto, além do tamanho do poro apropriado, as afinidades por água do substrato e da zeólita devem ser semelhantes ou compatíveis (LUNA; SCHUCHARDT, 2001).

Segundo Brown (2009), o tamanho dos poros e cavidades são compatíveis com a maioria das moléculas usadas como matéria-prima dentre os mais variados processos de síntese de compostos de interesse e em diferentes setores industriais. Algumas características para aplicações industriais podem ser citadas (CORMA, 2003) como:

- alto grau de hidratação;
- baixa densidade e grande volume de vazios quando desidratada;
- alta estabilidade da estrutura cristalina;
- área superficial específica elevada;
- capacidade de adsorção elevada;
- propriedades catalíticas;
- propriedades ácidas e básicas;
- adsorção seletiva de gases, vapores e fluidos;
- estabilidade a elevadas temperaturas;
- possuem acidez moderada;
- podem ser reutilizadas;
- não são corrosivas.

Em estudo da literatura, a reação de síntese de ascorbil ésteres de óleo de palma foi fortemente influenciada pelo tipo de lipase imobilizada utilizada, porcentagem de solventes orgânicos, razão molar dos substratos, tempo de reação e utilização de peneira molecular. As conversões obtidas foram de cerca de 70 % após 16 h de reação à temperatura de 40 °C (BURHAM et al., 2009).

### **2.6.3 Catálise enzimática em ultrassom**

O ultrassom é uma onda sonora cuja frequência é maior do que o ouvido humano pode responder. É considerada uma “tecnologia verde”, devido a sua alta eficiência, o desempenho econômico e os baixos requisitos instrumentais. Essas características reduzem significativamente o tempo de processamento em comparação com a agitação mecânica (técnica convencional de agitação) (ROKHINA et al., 2009).

Nos últimos anos têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência. O ultrassom pode ser classificado de acordo com nível de frequência em alta frequência (2 a 10 MHz) e baixa potência ( $< 1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), utilizado em diagnóstico de imagem e análises químicas; baixa frequência (20 a 100 kHz) e alta potência (10 a 1000  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), utilizado para a sonoquímica (MASON, 2007).

Na busca por novas soluções e métodos para melhorar o desempenho de bioprocessos, a energia ultrassônica tem se mostrado uma alternativa interessante, sendo que os estudos apontam o uso desta tecnologia para aplicações biotecnológicas (SINISTERRA, 1992; BATISTELLA et al., 2012). O ultrassom, quando aplicado em soluções aquosas ou em suspensão, proporciona aumento da taxa de cisalhamento, da homogeneização e da transferência de massa (ZHENG et al., 2012). A influência do ultrassom sobre a atividade e a estabilidade de enzimas, depende dos parâmetros de sonicação e da preparação enzimática específica. Neste sentido, Deshmane et al. (2009) relataram a influência de ultrassom nos parâmetros cinéticos e na redução do tempo de reação de esterificação. Entretanto, sua aplicação para reações catalisadas enzimaticamente é ainda pouco explorada e não foi encontrada na literatura qualquer investigação sobre a aplicação do ultrassom na síntese de ésteres de ácido oleico catalisada por lipase.

Os efeitos da frequência ultrassônica na síntese de glicerol cinamoil 4-metoxi catalisada por Novozym 435<sup>®</sup> foram avaliados por Guo et al. (2013), sendo que estes observaram que após 24 h a conversão aumentou com o aumento da frequência ultrassônica (35 kHz). Este efeito físico é conhecido como força de cisalhamento e cavitação, ou seja, ocorreu a diminuição do efeito devido ao aumento da frequência ultrassônica. Em relação ao tempo, os autores observaram que a conversão aumenta com o aumento do tempo de reação no ultrassom, mas quando o tempo foi excedido ocorreu diminuição na conversão.

A produção de ésteres de glicose via esterificação catalisada pela Novozym 435<sup>®</sup> com solvente orgânico terc-butanol e utilizando banho de ultrassom e agitador proporcionaram rendimentos da reação de aproximadamente 85 %, enquanto as reações realizadas em shaker o rendimento foi de apenas 45 % nas mesmas condições de reação (XIAO et al., 2005). Lerin et al. (2011) avaliaram em banho de ultrassom os parâmetros de reação para a síntese enzimática de ascorbil palmitato catalisada por lipase e como solvente utilizaram terc-butanol. A melhor condição foi obtida em 3 h a 70 °C, razão molar de 1:9 (ácido

ascórbico:ácido palmítico), 5 % (m/m) de enzima, obtendo conversão de 27 %.

Lerin et al. (2014) realizaram uma análise da literatura sobre os efeitos dos diferentes parâmetros e estes são:

- Frequência de irradiação. Quanto maior a frequência ou a combinação de frequências menores os efeitos químicos;
- Nível de dissipação de energia: é necessário ser mantido para as transformações físico-químicas. É aconselhável saber o número de transdutores para garantir menor intensidade operacional. Se usar maior irradiação na superfície também melhora o volume cavitacional ativo;
- Maximizar as cavitações (selecionar líquidos com baixa pressão de vapor, baixa viscosidade e alta tensão superficial). A presença de impurezas (sólidos ou gases) também pode influenciar o processo de geração de cavidades;
- Dimensões do reator e localização dos transdutores. Uma configuração do reator otimizado, efeitos da mistura necessários especialmente para sistemas heterogêneos e ajuste dos parâmetros, principalmente, a dissipação dos níveis de energia sendo necessário garantir a presença do comportamento hidrodinâmico e das características de mistura;
- Tempo de mistura, níveis apropriados da energia de dissipação e baixas frequências de irradiação são recomendados para garantir os níveis necessários das taxas de transferência de massa obtidas nas escalas maiores de operação. O trabalho adicional é necessário para quantificar a transferência de massa, bem como as características de mistura de operação múltipla do transdutor de frequência.
- Efeitos de atenuação, estimação dos níveis de dissipação de energia no reator em grande escala e as orientações oferecidas no trabalho são pontos importantes na estimação do coeficiente de atenuação e para a aplicação;
- Desenvolvimento de reatores tubulares contínuos ou geometria hexagonal são peças chave para a operação em grande escala.

O ultrassom de alta potência é o mais usado nas reações químicas, pois produz cavitação em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (BOLDYREV, 1995). A cavitação (efeitos sonoquímicos) é o fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido (RASO et al., 1999).

Quando a bolha atinge o tamanho crítico, a cavidade implode-se liberando calor e pressão em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido (KORN et al., 2003). Na cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis que oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido (fase de descompressão) e as bolhas transitórias que são as bolhas com tempo de vida curto de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo responsável pela cavitação (SINISTERRA, 1992).

A Tabela 2 apresenta trabalhos disponíveis na literatura sobre a produção de ésteres, condições de reação, tais como a frequência ultrassônica, tempo e outros fatores que influenciam a irradiação ultrassônica nas reações de esterificação e transesterificação. Estes estudos reportam também a importância da enzima como biocatalisador e que estes não tem sua atividade afetada pela irradiação do ultrassom, mas que depende da potência e da frequência na sonificação ultrasonica aplicadas nas reações, depende também da enzima a ser estudada, pois estas possuem estrutura e configurações diferentes, consequentemente comportam-se e possuem efeitos diferentemente nas reações.

Tabela 2 - Dados da literatura referentes as reações de estereificação e transesterificação em sistema assistido por ultrassom - continua

Substrato	Solvente	Enzima	Produto	Conversão (%)	Tempo de reação (h)	Referência
2-ácido-1-feniletanol e vinil acetato	sistema livre de solvente	lipase aamano PS	ácido acetatos	45	62	Brenelli and Fernandes (2003)
glucose e divinilbutanedioato	piridina	protease alcalina de <i>Bacillus subtilis</i>	ésteres de açúcares	85	2,5	Xiao et al. (2005)
konjac glucomannan e vinil ésteres	terc-butanol	Novozym 435 <sup>®</sup>	6- <i>O</i> -acetate-KGM	96,1	24	Chen et al. (2008)
			6- <i>O</i> -n-butirato-KGM	94,5		
			6- <i>O</i> -n-octanoato-KGM	90,0		
			6- <i>O</i> -laurato-KGM	87,3		
			6- <i>O</i> -estearato-KGM	82,5		
glicose e vinil laurato	líquidos iônicos	Novozym 435 <sup>®</sup>	ésteres de açúcar	90	6	Lee et al. (2008)

Tabela 2 - Dados da literatura referentes as reações de estereificação e transesterificação em sistema assistido por ultrassom - continua

<b>Substrato</b>	<b>Solvente</b>	<b>Enzima</b>	<b>Produto</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Referência</b>
frutose e ácido palmítico	líquidos iônicos	Novozym 435 <sup>®</sup>	frutose palmitato	78	14	Ha, Hiep e Koo (2010)
frutose e ácido palmítico	butanone	Novozym 435 <sup>®</sup>	frutose palmitato	62	12	Zhu et al. (2010)
metil benzoato e glicerol	2-propanol	Novozym 435 <sup>®</sup>	1-gliceril benzoato	16	4	Ceni et al. (2011)
ácido cafeíco e 2-fenil etanol	isooctano	Novozym 435 <sup>®</sup>	fenetil éster de ácido cafeíco	96,08	9,6	Chen et al.(2011a)
ácido cafeíco e 2-fenil etanol	isooctano	Novozym 435 <sup>®</sup>	fenetil éster de ácido cafeíco	92,11	1,5	Chen et al.(2011b)
ácido ascórbico e ácido palmítico	terc-butanol	Novozym 435 <sup>®</sup>	ascorbil palmitato	27	3	Lerin et al.(2011)
troxerutin e divinil dicarboxilatos	piridina	protease alcalina de <i>Bacillus subtilis</i>	ésteres de troxerutin	87,3	4	Xiao et al. (2005)
fitoesteróis e óleo de canola	isooctano	<i>Canadia</i> sp. 99-125 lipase	ésteres de fitosterol	93,5	10	Zheng et al. (2012)

Tabela 2 - Dados da literatura referentes as reações de estereificação e transesterificação em sistema assistido por ultrassom - continuação

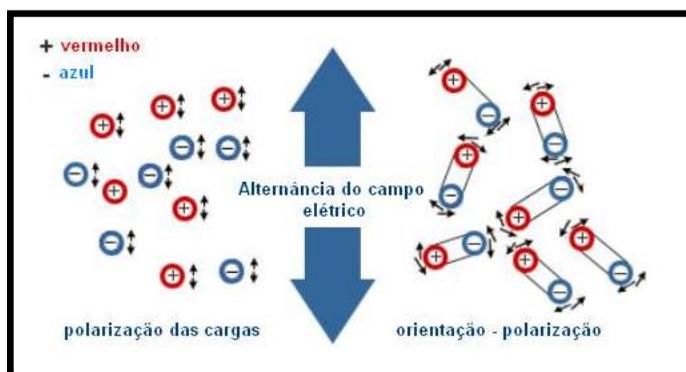
<b>Substrato</b>	<b>Solvente</b>	<b>Enzima</b>	<b>Produto</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Referência</b>
(R/S)-1-cloro-3-(1-naftoxi)-2-propanol e vinil propionato	n-hexano	lipase de <i>Pseudomonas</i> sp.	propranolol	52,5	não reportado	Wang et al. (2012)
aminas aromáticas e brometo de propila	etanol	lipase de <i>Pseudomonas</i> sp.	mono-N-alquil aminas aromáticas	85	0,67	Lobo et al. (2013)
resveratrol e vinil acetato	2-metil-2-butanol	Novozym 435®	4'-acetoxiresveratrol	77	24	Kuo et al. (2013)

## 2.6.4 Micro-ondas

A micro-onda é uma fonte de energia e não de calor, mas pode vir a transmitir calor por sua interação com o meio material, desde que o material seja susceptível à interação com as micro-ondas. Os químicos orgânicos Gedye e Guiguere (1986) na década de 80 começaram a utilizar os aparelhos domésticos de micro-ondas para as reações de esterificação e ciclo-adição. Já na década de 90, desenvolveram-se equipamentos de micro-ondas específicos para a síntese orgânica permitindo o controle da temperatura, pressão, potência, assim obtendo maior reprodutibilidade e segurança nos experimentos.

O princípio da funcionalidade das micro-ondas é fornecer energia diretamente às moléculas, diferentemente de outros métodos de aquecimento como os banhos de óleo, que se baseiam na propagação, convecção e condução da energia em forma de calor. Os dipolos existentes nas moléculas de água em uma reação comportam-se de forma a oscilarem para alinhar-se com o campo elétrico que será gerado pelas micro-ondas. Estes movimentos das moléculas excitadas perturbam as moléculas não excitadas de modo que são aquecidos pelas colisões geradas no meio, essa explicação pode ser observada na Figura 5 que resume esse mecanismo de transformação de energia.

Figura 5 - Mecanismo de transformação de energia, polarização dipolar



Fonte: Püschner – Microwave Power Systems

A irradiação de micro-ondas é um método de aquecimento de energia eficiente para processos em recipientes selados, mas sua

aplicação como fonte de energia para a síntese enzimática ainda é bastante limitada. A maior controvérsia no campo das reações promovidas por micro-ondas é a taxa de aceleração que é causada pelos efeitos não-térmicos das micro-ondas, em partes devido ao fato que muitas reações anteriores foram simplesmente realizadas em fornos de micro-ondas caseiros sem controle da temperatura. Acredita-se que o aumento da taxa de reação em resposta à irradiação de micro-ondas é causado pelo sobreaquecimento dos solventes além de seu ponto normal de ebulição. Outros estudos acreditam que a existência dos efeitos não-térmicos com base nos grupos polares funcionais apresenta maior reatividade em reagentes adjacentes sob micro-ondas (ZHAO et al., 2009).

Segundo Bassyouni et al. (2012), a irradiação das micro-ondas exibiu um desempenho superior para algumas reações químicas orgânicas se comparada aos métodos convencionais de aquecimento; isto está devidamente relacionado com a alta eficiência das micro-ondas em aquecer rapidamente a reação, pois o processo convencional baseia-se na condução/convecção assim sendo mais lento, já a forma de aquecimento do micro-ondas é volumétrico e rápido, devido ao campo magnético aplicado. Tem sido utilizado em algumas reações catalisadas por enzimas (GAI et al., 2013) e está provado ser uma fonte de energia limpa, eficiente e conveniente. Na Tabela 3 estão descritas algumas pesquisas utilizando a tecnologia de micro-ondas

As micro-ondas possuem dois mecanismos de transferência de energia pelo aquecimento dielétrico e pela condução iônica. O aquecimento dielétrico ocorre devido à aplicação de um campo magnético alterado, que interage com os dipolos da molécula ocorrendo o alinhamento dos dipolos dependendo do estado físico das moléculas. Nos gases as moléculas são mais livres e estão mais separadas o que favorece o alinhamento instantâneo, já nos líquidos o alinhamento não é imediato, variando com a viscosidade do meio e a frequência das ondas. (LIDSTROM et al., 2001). No outro mecanismo, condução iônica, o calor é gerado pela fricção que ocorre pela migração de íons dissolvidos quando estão sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, da carga, da condutividade dos íons dissolvidos e a interação destes com o solvente (SANSEVERINO, 2002).

Tabela 3 - Dados da literatura referentes a algumas pesquisas utilizando a tecnologia de micro-ondas - continua

Substratos	Solvente Orgânico	Enzima	Produto	Condições de reação	Conversão	Referência
acetoacetato de metila e n-butanol	tolueno	Novozym 435 <sup>®</sup>	acetato de metilo	micro-ondas; 300 rpm	69 %	Yadav, 2004
ácido láurico e 1,2 – propanodiol	1,4 - dioxano	Novozym 435 <sup>®</sup>	monolaureato de propilenoglicol	micro-ondas 600 – 700 W; 60 °C; 500 rpm	60 %	Yadav, 2006
(R,S) – 2 – octanol e acetato de vinila	n-heptano	Novozym 435 <sup>®</sup>	(S) – 2 – octanol (R) - 2 – octanol acetato	micro-ondas; 2 h; 40 °C; 200 rpm	50,5 %	Yu, 2007
álcoois secundários racêmicos	tolueno	Novozym 435 <sup>®</sup>	acil doadores	micro-ondas 70 W; 60 °C	-	Bachu, 2007
1 – feniletilamina	tolueno	Novozym 435 <sup>®</sup>	amidas	micro-ondas; 100 °C; 15 min	40 % e 99 %	Corbu, 2008
ácido ascórbico, ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico	metanol	<i>Burholderia multivorans</i>	laureato, miristato, palmitato e estearato	micro-ondas 70 W; 35 min	78 %, 75 %, 83 % e 80 %	Kidwai, 2009
ácido oleico e xilitol	terc-butanol	Novozym 435 <sup>®</sup>	monoéster de xilitol	micro-ondas com agitação magnética; 7 h	86 %	Rufino, 2010
(RS) – ketorolac octanol	éter diisopropílico	Novozym 435 <sup>®</sup>	RS – (±) - ketorolac	micro-ondas 30 – 40 W; 50 °C; 3 h	50 %	Shinde, 2014

Tabela 3 - Dados da literatura referentes a algumas pesquisas utilizando a tecnologia de micro-ondas – continua

Substratos	Solvente Orgânico	Enzima	Produto	Condições de reação	Conversão	Referência
amido de milho e ácido oleico	-	<i>Staphylococcus aureus</i> e lípase imobilizada	amido oleato	micro-ondas; 44 °C; 200 rpm	76%	Hoechani, 2010
óleo de palma e água	-	Lipozyme RM IM	diacilglicerol	micro-ondas	40%	Matos, 2011
etil-3-fenilpropanoato e n-butanol	tolueno	Novozym 435®	etil-3-fenilpropanoato	micro-ondas; 60 °C; 15 min.; 300 rpm	96%	Yadav, 2012
1-1-Nafitil etanol e acetato de vinila	n-heptano	Novozym 435®	1-1-nafitil etanol	micro-ondas; 60 °C; 15 min	47,74% e 90,05%	Yadav, 2012
álcool isoamílico e álcool mirístico	-	Novozym 435®	miristate isoamílico	micro-ondas 50 W; 60 °C; 1 h; 400 rpm	96%	
(R,S) – 2 – octanol e acetato de vinila (2:1)	1-etil-3-metilimidazólio e bus (trifluorometanos ulfonil amida)	Novozym 435®	(S) – 2 – octanol (R) - 2 - octanoato	micro-ondas 480 W; 6 h; 73 °C	50%	Yu, 2012
oleico, esteárico, linoléico, linolênico, eicosapentaenóico e DHA	acetona seca ou acetonitrila e testes sem solvente	Novozym 435®	acilação de isoquercitrina e ésteres de floridizina	micro-ondas 300 W; 45 a 65 °C; 75 – 105 segundos; Peneira Molecular (4 Å)	85 – 98%	Ziaullah, 2013

Tabela 3 - Dados da literatura referentes a algumas pesquisas utilizando a tecnologia de micro-ondas – continua

<b>Substratos</b>	<b>Solvente Orgânico</b>	<b>Enzima</b>	<b>Produto</b>	<b>Condições de reação</b>	<b>Conversão</b>	<b>Referência</b>
ácido ascórbico e ácido palmítico (1:5)	tert-amyl	Novozym 435 <sup>®</sup>	ascorbil palmitato	micro-ondas 50 W; 70 °C; 60 min.; Peneira Molecular (3Å)	71%	Costa, 2014
óleo de babaçu e etanol (1:12)	-	<i>B.cepacia</i> livre	biodiesel de babaçu	micro-ondas 80 – 100 W; 10 h; 50 °C	100%	Rós, 2014
ácido oléico e metanol (1:3)	-	Cal B imobilizada pelo grupo de pesquisa (nanopoliestireno)	oleato de metila	micro-ondas 200 W; 45 °C; 45 min.	68%	Bukhor, 2014
4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA) e n-butanol	1,4 - dioxano	Novozym 435 <sup>®</sup>	MCPA éster	micro-ondas 30 - 40 W; 60 °C; 6 h	83%	Shinde, 2014

As reações catalisadas por lipases são geralmente lentas. A aplicação de campos electromagnéticos de alta frequência, no caso o micro-ondas, é uma das estratégias recomendadas para acelerar estas reações, a fim de obter rendimentos elevados em tempo mais curto. As reações biológicas catalisadas por enzimas isoladas utilizando irradiação de micro-ondas foram estudadas, mostrando resultados altamente promissores (DA RÓS et al., 2012). Este tipo de aquecimento acelera a velocidade inicial das reações e mesmo a enantio-seletividade das enzimas (CHEN et al., 2008; LEADBEATER et al., 2007).

Hoje em dia, os reatores de micro-ondas estão equipados com controles de temperatura e pressão encontram-se comercialmente disponíveis para a compra. Alguns pesquisadores relataram elevadas atividades enzimáticas e seletividade em solventes orgânicos sob irradiação de micro-ondas (MAZUMBER et al., 2004). Paradoxalmente, estudos recentes de Leabeater et al. (2007) sugeriram que a irradiação de micro-ondas com aquecimento térmico não faz diferença na atividade da lipase *Candida antarctica* B (CalB) variando as temperaturas (40 a 100 °C). Segundo Leadbeater et al. (2004) é vantajosa a utilização de líquidos iônicos nas reações assistidas por micro-ondas.

Ziaullah (2013) afirma que o micro-ondas proporciona uma energia alternativa para realizar reações enzimáticas. Por conseguinte, a atividade da enzima, seletividade e estabilidade pode ser modificada por aquecimento de micro-ondas. Estudos anteriores prevêm um efeito específico da irradiação de micro-ondas sobre a estrutura e as atividades das enzimas. A energia das micro-ondas ocorre diretamente entre o campo eletromagnético e a estrutura polar, que poderia induzir a flexibilidade na enzima e assim resultando na alteração das propriedades enzimáticas. Além disso, a absorção direta da irradiação de micro-ondas pelos substratos polares da enzima pode conduzir a uma maior reatividade dos grupos funcionais envolvidos na reação enzimática.

### **2.6.5 Líquidos iônicos**

Nos últimos anos, tem-se aumentado a busca por tecnologias mais limpas nas atividades industriais e até mesmo nas pesquisas acadêmicas. O desenvolvimento de tecnologias que não são prejudiciais ao meio ambiente e processos alternativos que minimizem a quantidade de resíduos no final do processo tem sido exaustivamente estudado por pesquisadores e essa nova abordagem tem recebido o nome de “green chemistry”, ou química verde. Todavia, os pesquisadores têm se dedicado à busca de solventes alternativos na substituição aos solventes

convencionais, assim reduzindo a quantidade de resíduos orgânicos e consequentemente diminuindo o impacto ambiental. Os novos meios reacionais desenvolvidos recentemente incluem o uso de água, fluidos supercríticos ( $H_2O$  e  $CO_2$ ), hidrocarbonetos perfluorados e líquidos iônicos à temperatura ambiente. A estrutura dos líquidos iônicos define suas propriedades físico-químicas tornando-os adequados para muitas aplicações industriais (DUPONT et al., 2004).

Os líquidos iônicos são sais compostos por íons que apresentam uma estrutura cristalina iônica-covalente que esteja em um estado líquido e apresentando ponto de fusão abaixo de  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Em temperatura ambiente apresentam baixa viscosidade e podem ser líquidos até mesmo a  $-96\text{ }^\circ\text{C}$  (LE NGOC et al., 2014). O número de líquidos iônicos à temperatura ambiente sintetizados excede a marca de 500. No entanto, os líquidos iônicos de dialquilimidazólio são os mais estudados. A viscosidade dos líquidos iônicos é comparável à dos óleos e é determinada principalmente pela tendência de formação de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. A alta viscosidade dos líquidos iônicos é uma desvantagem na sua utilização, uma vez que atua negativamente na transferência de massa e na energia necessária para misturar sistemas líquidos heterogêneos (MARSH et al., 2004).

Segundo Le Ngoc et al. (2014) os líquidos iônicos são divididos em dois grupos, os apróticos e os próticos. Os líquidos iônicos apróticos são considerados os clássicos ou convencionais, pois suas estruturas são baseadas principalmente em cátions orgânicos como imidazólio ou piridina e possuem grande variedade de ânions. Já os líquidos iônicos próticos são geralmente preparados por reação de neutralização de uma base orgânica e de um ácido ou por meio de transferência de prótons de um ácido de Bronsted para uma base de Bronsted.

Propriedades dos líquidos iônicos (ROUGHTON et al., 2012):

- miscibilidade em água;
- viscosidade;
- forte hidratação;
- estabilidade térmica;
- não inflamável;
- propriedades eletroquímicas (varia conforme a magnitude);
- baixa pressão de vapor.

Quando a cadeia alquílica é menor que seis carbonos, este sal é miscível com a água, mas acima de seis carbonos ele forma uma fase

separada quando misturado a água, ou seja, com o aumento da cadeia apolar do cátion, a solubilidade em solventes polares diminui. Recentemente, um grande número de reações de biotransformação são realizadas em escala industrial, seja utilizando células íntegras ou enzimas isoladas. As dificuldades desses processos são a solubilidade do substrato, rendimento e enantiosseletividade (EARLE; SEDDON, 2000).

A grande vantagem dos líquidos iônicos sobre os solventes normalmente utilizados é a possibilidade de ser modulado, ou seja, pela primeira vez é possível alterar as propriedades físicas e químicas de um solvente, para uma aplicação específica. A possibilidade de dissolver uma grande quantidade de matérias, praticamente não possuem pressão de vapor (não são voláteis) e serem recicláveis são atributos que os tornam atrativos solventes alternativos, tornando os processos químicos “verdes”. Neste contexto, a utilização de sistemas bifásicos líquidos iônicos/dióxido de carbono supercrítico como meio de reação por catálise enzimática está abrindo novas oportunidades para o desenvolvimento de processos verdes em ambientes não-aquosas e para fornecer diretamente produtos puros (LOZANO et al., 2007).

Na Tabela 4 estão apresentados dados da literatura de algumas reações enzimáticas que utilizam líquidos iônicos como solventes. Observa-se que as conversões obtidas foram baixas em tempos de reação mais longos, por isso, é necessário mais estudos a respeito do uso dos líquidos iônicos devido a sua complexa atuação entre os substratos.

Tabela 4 - Dados da literatura de estudos com líquidos iônicos

Substrato	Líquido iônico	Enzima	Produto	Condições de reação	Conversão	Referência
mentol anidrido proprionico hexano NaHCO <sub>3</sub> (10%)	1-butil-3- metil hexafluorofosfato 1-butil-3- metil tetrafluoroborato	<i>Candida rugosa</i> lipase EC 3.1.1.3	(±) mentol	200 rpm; 24 h; temperatura de 20 a 40 °C	47,5 %	Yuan, 2006
mentol anidrido proprionico hexano NaHCO <sub>3</sub> (10%)	1-butil-3- metil tetrafluoroborato	<i>Candida rugosa</i> lipase	mentol	200 rpm; 6-10 h; 25 a 35 °C	53 %	Zhang, 2008
ácido ascórbico ácido oleico	1-butil-3- metilimidazólio tetrafluoroborato [BMIM][BF <sub>4</sub> ]	<i>Candida antarctica</i> lipase B	ascorbil oleato	agitador magnético (300 RPM); 60 °C; 24 h; peneira molecular	72 % em 14 h	Adamczak, 2009
etil butirato 1-butil alcool	testaram vários líquidos iônicos	Novozym 435 <sup>®</sup>	-	micro-ondas; 40 °C	-	Zhao, 2009
ácido benzílico	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]KOH	-	benzaldeído	micro-ondas (180 W); 60 °C; 25 min	74 %	Singh 2011
galactose ácido oleico	1-butil-3- metil tetrafluoroborato DMSO	Lipozyme IM RM	galactose oleato	300 rpm; 60 °C; 2 h; thermomixer de ependorf	87 %	Abdulmalek, 2012
metanol ácido cafeico	[BMIM][Tf <sub>2</sub> n]	Novozym 435 <sup>®</sup>	metil cafeato	ultrassom 150 W e 25 kHz; 75 °C; 9 h	99,79 %	Wang, 2015

Os solventes orgânicos são geralmente voláteis e inflamáveis, o que torna perigosa a sua aplicação em altas temperaturas principalmente nos frascos utilizados nas reações realizadas em micro-ondas. Em contraponto, os líquidos iônicos são solventes ideais para reações com micro-ondas, pois eles têm alto ponto de ebulição, baixas pressões de vapor e elevadas estabilidades térmicas (WASSERCHEID e WELTON, 2003). Além disso, os líquidos iônicos possuem altas constantes dielétricas (na gama de 10 a 15) e relativamente baixa capacidade calorífica (na gama de 1 a 2), assim sendo mais fácil a sua aplicação em substratos diversos (ZHAO et al., 2009).

Os líquidos iônicos têm sido investigados como solventes para alguns tipos de reações que utilizam micro-ondas, isso devido a sua capacidade de absorver com facilidade as irradiações das micro-ondas durante o aquecimento (ZHAO et al., 2009; SINGH et al., 2011; DADHANIA et al., 2014). No entanto, o uso da irradiação de micro-ondas juntamente com os líquidos iônicos para a catálise enzimática torna-se limitada, pois existem poucos estudos relacionados como o uso destas tecnologias ao mesmo tempo.

## 2.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Diante do exposto neste capítulo, infere-se a importância da síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, a qual tem despertado grande interesse dos pesquisadores em todo o mundo. Uma das alternativas é a síntese enzimática que apresenta muitas vantagens em relação à síntese química. No entanto, sugere-se a produção enzimática a ser realizada utilizando como “química verde” o ultrassom que até o presente momento foi utilizado apenas por Lerin et al. (2012) para a produção de ascorbil palmitato. Para o produto escolhido neste trabalho não foi encontrado nenhum estudo utilizando este sistema reacional. Sugere-se também para a produção do ascorbil oleato o uso da tecnologia de irradiação das micro-ondas, pois até o presente momento não há nenhum estudo, somente o estudo de Costa et al. (2014) que utiliza o micro-ondas doméstico, mas para a produção de ascorbil palmitato diferentemente da nossa pesquisa. Outra alternativa é a substituição do solvente orgânico pelos líquidos iônicos que são considerados “química verde”.

O presente trabalho tem por objetivo principal produzir enzimaticamente ascorbil oleato com o intuito de investigar sistemas alternativos sendo estes ultrassom, micro-ondas, solvente orgânico e

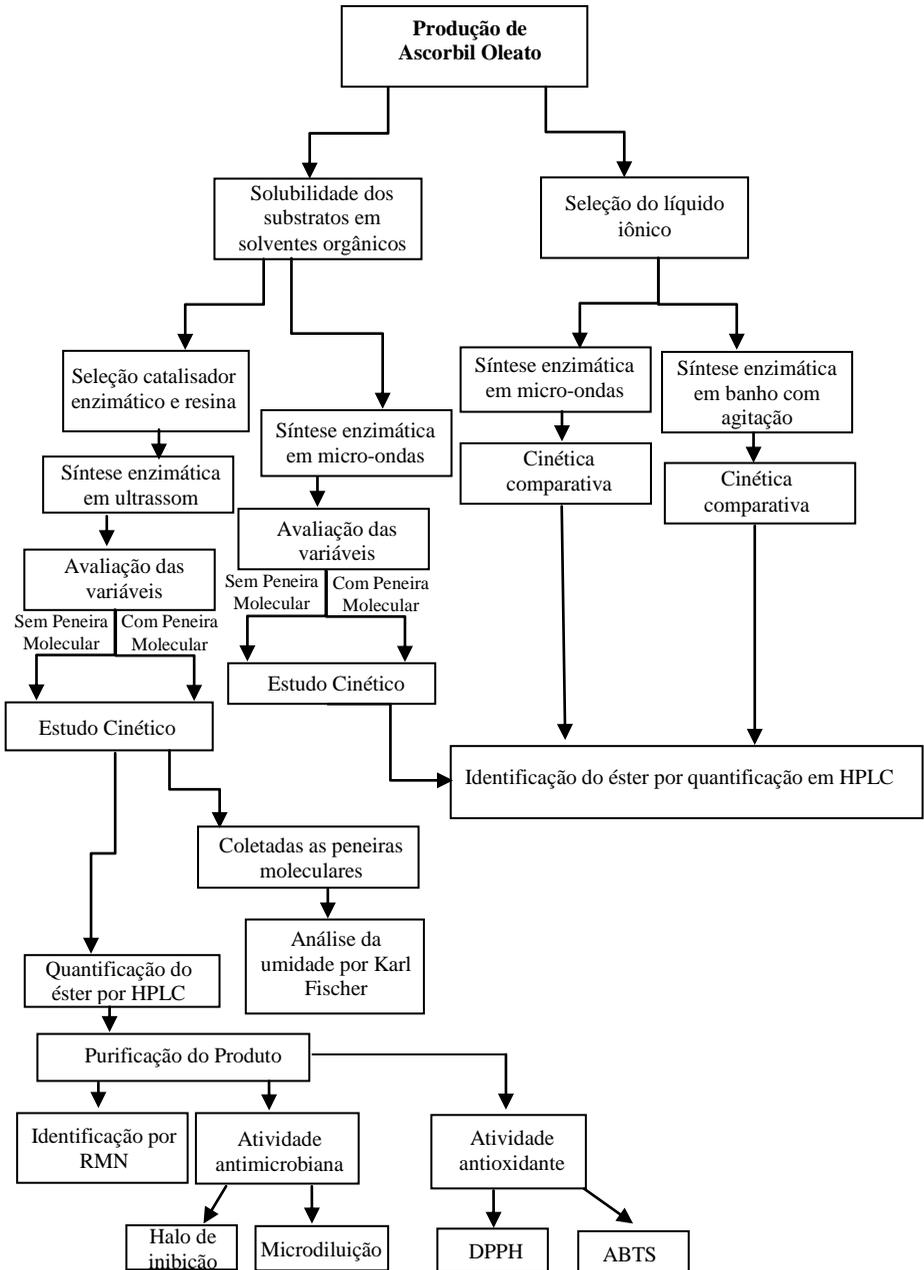
líquidos iônicos, visando verificar o efeito de vários parâmetros na reação (razão molar ácido L-ascórbico/ácido oleico, concentração de enzima e temperatura) bem como a cinética da reação em cada um dos sistemas abordados em termos de conversão em ascorbil oleato, utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435<sup>®</sup>. Para identificação do ascorbil oleato por meio da Ressonância Magnética Nuclear, como etapa final desta proposta, é necessário fazer a caracterização do produto para provar o potencial aditivo, assim realizando análises da atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana do éster produzido.



### 3 MATERIAS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho relacionado aos sistemas reacionais definidos para as reações de esterificação enzimática para obtenção de ascorbil oleato. Para exemplificar o procedimento experimental adotado para essa pesquisa, na Figura 6 está apresentado um fluxograma esquemático. O estudo foi dividido em duas etapas sendo a primeira desenvolvida na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC – EQA/CTC), no Laboratório de Farmacognosia localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas (CCS) e no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO – EQA/CTC) todos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade. A segunda etapa do estudo foi realizada durante o estágio doutoral (PDSE/CAPES n° 99999.008306/2014-01), desenvolvido no *Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche* da *Università degli Studi di Ferrara* (Ferrara - Itália) que foi de grande importância para a complementação desta tese ampliando e solidificando os conhecimentos e também para firmar uma parceria na pesquisa entre as universidades (UFSC – UNIFE).

Figura 6 - Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no presente estudo



### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Enzima

Como catalisador enzimático foi utilizado a lipase comercial Novozym 435<sup>®</sup> com as seguintes especificações:

- Novozym 435<sup>®</sup> - Produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica pela Novozymes Brasil/Araucária/PR. A enzima atua aleatoriamente nas três posições do triglicerídeo. O produto é constituído por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm e densidade de aproximadamente 430 kg·m<sup>-3</sup>. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 a 2 %. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40 a 70 °C (NOVO NORDISK, 1992).

#### 3.1.2 Resina

Para verificar o comportamento da resina na produção de ascorbil oleato foram utilizadas as seguintes resinas: Amberlyst 15; Amberlyst XAD 16; Amberlyst 36, todas da Sigma-Aldrich. Estas resinas foram escolhidas a partir do estudo de Laroque et al. (2015). As resinas foram previamente secas em estufa a 105 °C até massa constante.

#### 3.1.3 Peneira molecular

A peneira molecular utilizada foi de 4 Å (8 a 12 mesh) com capacidade de retenção de água de +/- 20 % (m/m), Sigma-Aldrich, Brasil.

#### 3.1.4 Líquido iônico

O líquido iônico escolhido para o uso nesta pesquisa foi o 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluorborato (99 %, Sigma-Aldrich) a partir de estudos de Adamczak et al. (2009).

#### 3.1.5 Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo:

- a) Para as reações de esterificação como substratos foram utilizados:
- Ácido L-ascórbico PA (99 %, Vetec)
  - Ácido oleico (99 %, Vetec)
- b) Para definição do solvente orgânico:
- Terc-butanol PA (99 %, Vetec)
  - Hexano PA ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Isopropanol ( $\geq 90$  %, Synth)
  - Ciclohexano ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Álcool etílico ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Ácido acético glacial PA (99 %, Vetec)
  - Dimetilsulfóxido ( $\geq 90$  %, Dinâmica)
  - Isooctano ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - n-Heptano ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Touleno ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Xileno ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Acetona PA ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Metanol PA ( $\geq 90$  %, Vetec)
  - Acetato de etila ( $\geq 90$  %, Sigma Aldrich)
  - Cicloexano ( $\geq 90$  %, Sigma Aldrich)
- c) Para análise de RMN:
- Clorofórmio deuterado (99 %, Sigma Aldrich)
  - Metanol deuterado (99 %, Sigma Aldrich)
- d) Para a análise da umidade:
- Karl Fischer (Merck – isento de piridina)
  - Água destilada
- e) Para a atividade antimicrobiana:
- Água destilada
  - Meios de cultura (nutriente de caldo, nutriente de ágar e triptona de soja ágar)
- f) Para a análise no HPLC:
- Água (*Milli-Q*)
  - Metanol (99 %, Vetec)
  - Ácido acético glacial (99 %, Vetec)

g) Para a atividade antioxidante:

- 2,2 – difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)
- ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)
- Metanol PA ( $\geq 90$  %, Vetec)

Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou purificação.

### 3.1.6 Equipamentos

Este trabalho foi realizado com o auxílio dos seguintes equipamentos:

- Balança analítica (Electronic Balance – FA 2104N);
- Ultrassom (UNIQUE);
- Estufa a vácuo (Quimis 40 °C, 3 bar);
- HPLC (PerkinElmer 200 - UV/IR) - UFSC e HPLC (Waters 600E/486 – Difision of Millipore - UV) - UNIFE;
- Coluna cromatográfica HPLC marca Phenomenex (C18, 300 × 4 mm, 5 $\mu$ m) - UFSC e coluna cromatográfica HPLC marca Waters fision of Millipore (C18, 300 × 3,9 mm, 4 $\mu$ m) - UNIFE;
- Espectrofotômetro (VARIAN);
- Rotavaporador (Heidolph – Laborota 4000);
- Karl Fischer (Quimis - modelo Q349-2);
- Polarímetro (Jasco P-2000);
- Micro-ondas (Microwave Reaction Vials - Biotage – Initiator).

## 3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 Teste de solubilidade dos reagentes

Com o intuito de verificar a solubilidade do ácido oleico no ácido L-ascórbico, ensaios de solubilidade foram realizados com vários solventes orgânicos. Para tal, foram adicionados 0,24 g ou 1,36 mmol de ácido L-ascórbico, 3,45 g ou 12,24 mmol de ácido oleico e variações de 5 a 20 mL de solvente orgânico, em balões de vidro de 50 mL com

tampa e colocados no banho de ultrassom. A temperatura testada foi de 70 °C e 132 W de potência do ultrassom. Como solventes foram utilizados: terc-butanol, hexano, isopropanol, ciclohexano, álcool etílico, ácido acético, dimetilsulfóxido, álcool terc-butílico, isooctano, n-heptano, tolueno, xileno, toluol e acetona.

A solubilidade foi avaliada por análise visual após dissolução ou não dos substratos em cada solvente por um tempo médio de 40 min. Para uma melhor visualização dos resultados experimentais, números foram atribuídos em relação à solubilidade dos substratos, onde:

- 1 – totalmente solúvel: solução límpida;
- 2 – parcialmente solúvel: solução turva;
- 3 – insolúvel: solução turva e corpo de fundo.

### **3.2.2 Produção enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom**

#### **3.2.2.1 Síntese enzimática de ascorbil oleato**

Os experimentos de esterificação enzimática para a produção de ascorbil oleato em banho de ultrassom foram realizados em diferentes condições experimentais. As concentrações de substratos adicionadas foram baseadas nos estudos realizados por Humeau et al. (1995) e Lerin et al. (2011). Os experimentos foram realizados em banho de ultrassom com frequência de 37 kHz e 100 % de potência (132 W) utilizando 20 mL do solvente orgânico (terc-butanol), razão molar entre os substratos de 1:9 (1,36 mmol de ácido L-ascórbico:12,24 mmol de ácido oleico), 1:6 (1,36 mmol de ácido L-ascórbico:8,16 mmol de ácido oleico) e 1:3 (1,36 mmol de ácido L-ascórbico:4,08 mmol de ácido oleico) e 0,18 g (5 %, m/m) de enzima (Novozym 435<sup>®</sup>) a 50, 60 e 70 °C. As reações foram conduzidas nos tempos de: 0; 0,5; 1; 3; 6; 9 e 12 h e a amostragem foi não-destrutiva. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a vácuo (40 °C +/- 8 h) para a evaporação total do solvente orgânico presente. Na Figura 7 pode-se observar a imagem do equipamento, ultrassom da marca UNIQUE, utilizado para a condução dos experimentos.

Figura 7 - Banho de ultrassom utilizado para produção enzimática de ascorbil oleato



Fonte: Autor (2014)

A partir do sistema que apresentou maior conversão foi realizado estudo cinético nas mesmas condições, com adição de peneira molecular para verificar o efeito da água formada durante a reação sobre a conversão em ascorbil oleato.

### 3.2.2.2 Esterificação enzimática para produção de ascorbil oleato com peneira molecular

Para maximizar a síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom foi utilizada nesta etapa a peneira molecular para a retirada de água produzida durante a reação. Os ensaios foram realizados nas condições experimentais que conduziram a melhores conversões determinadas na etapa anterior, sendo os experimentos também realizados no banho de ultrassom (37 kHz e 132 W), 70 °C, 20 mL de terc-butanol, razão molar entre os substratos de 1:9 (1,36 mmol de ácido L-ascórbico:12,24 mmol de ácido oléico), 0,18 g (5 %, m/m) de enzima, variando-se a concentração de peneira molecular 4 Å: 20,10, 5 e 2,5 % (m/m)(ativação a 100 °C por 24 h). As reações foram conduzidas nos tempos de 0; 0,5; 1; 3; 6; 9 e 12 h. A amostragem foi não-destrutiva.

### 3.2.3 Produção enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas

#### 3.2.3.1 Síntese enzimática para produção de ascorbil oleato

As reações de síntese enzimática em micro-ondas foram conduzidas em um *vial* (côncavo na parte inferior e com tampa na parte superior com anel de vedação em borracha) especial para análises em micro-ondas. Este possui uma marcação com o limite permitido de solução (mínima de 2 mL e máxima de 5 mL). Para cada ensaio, eram medidos 0,021 g ou 0,12 mmol ácido L-ascórbico e a quantidade de ácido oléico correspondente a razão molar em estudo (0,305 g ou 1,08 mmol (1:9); 0,203 g ou 0,72 mmol (1:6); 0,102 g ou 0,36 mmol (1:3) e 0,034 g ou 0,12 mmol (1:1)) e a enzima Novozym 435<sup>®</sup> (5 % (m/m)), com base na massa dos substratos. Antes de iniciar a reação o micro-ondas aquecia no tempo de 60 s até a temperatura selecionada. O tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima. As cinéticas foram destrutivas e os tempos estabelecidos foram 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min. A pressão da reação e a potência eram condições que não podiam ser estabelecidas e estas estabeleciam-se antes de iniciar a reação, sendo pressão 0 bar e potência 14 W.

Após o término de cada reação, o micro-ondas resfriava-se em 60 segundos e os *vials* com as amostras foram lavados com metanol e colocados em balões de 10 mL para serem rotaevaporados, logo após no vácuo a temperatura ambiente até eliminação total do solvente. As amostras foram armazenadas em refrigerador até o momento da análise de quantificação e esta realizada em duplicata.

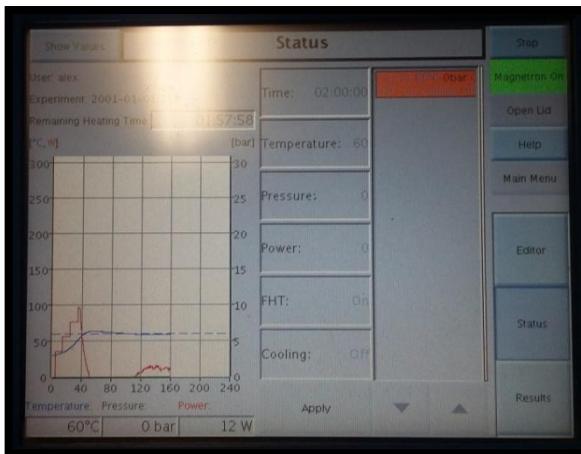
Na Figura 8 está representado o equipamento, micro-ondas modelo *Microwave Reaction Vials* da marca *Biotage – Initiator*, utilizado para realização da síntese enzimática de ascorbil oleato e na Figura 9 a tela de programação utilizada no sistema do micro-ondas.

Figura 8 - Micro-ondas utilizado para a produção enzimática do ascorbil oleato



Fonte: Autor (2015)

Figura 9 - Tela do equipamento do micro-ondas com a devida programação do modelo Biotage-Initiator.



Fonte: Autor (2015)

### 3.2.3.2 Esterificação enzimática para produção de ascorbil oleato com peneira molecular

Já com o método estabelecido para a síntese enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas, cinéticas destrutivas foram realizadas adicionando peneira molecular (4 Å) para a absorção de água do sistema. Os ensaios foram realizados a partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores. Experimentos foram realizados nas condições de 60 °C, 2 h, nas razões molares 1:3 e 1:6 e também nas condições de 70 °C, nos tempos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min e razão molar 1:9.

A Tabela 5 apresenta as condições estudadas para verificar o efeito combinado das razões molares com tempo, temperatura e com peneira molecular (5 %, m/m) e sem peneira molecular na esterificação.

Tabela 5 - Condições para reação de síntese de ascorbil oleato

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Razão molar (ácido ascórbico:ácido oléico)
60	2	1:3 e 1:6
70	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2	1:9

A fim de investigar se a peneira molecular reagiria na conversão do ascorbil oleato foi realizada uma cinética sem enzima, somente com os substratos e a peneira molecular.

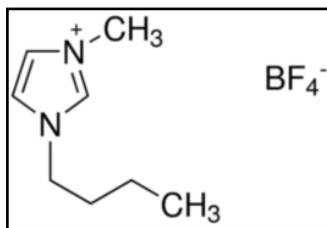
### 3.2.4 Produção enzimática de ascorbil oleato com líquidos iônicos em micro-ondas e agitação magnética

A partir da seleção teórica apresentada na revisão bibliográfica sobre os líquidos iônicos, vários estudos comprovaram que para as condições da reação o líquido iônico com estrutura tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazolio se encaixa nos requisitos para a produção deste éster. Na Figura 10 está representada a estrutura molecular do líquido iônico. Os ensaios para a produção enzimática de ascorbil oleato com agitação magnética utilizando líquido iônico em substituição ao solvente orgânico foram baseados no estudo de Park (2003) adaptado.

Primeiramente, os frascos com a quantidade de 0,02 g de enzima (Novozym 435<sup>®</sup>) e o 0,2 g de iodeto de sódio (NaI) foram dispostos sob vácuo a 50 °C para retirada da água presente devido a forte hidratação que o líquido iônico possui na sua estrutura. Enquanto isso, o restante dos reagentes, ou seja, ácido oléico (38 µL), ácido ascórbico (0,018 g),

peneira molecular 4 Å (0,05 g) e líquido iônico (500 µL) foram dosados. As condições reacionais foram temperatura de 60 °C, tempo de 24 h, 300 rpm e com vácuo para retirada total de ar do sistema. Após as 24 h retirou-se o meio reacional que foi filtrado com 10 mL de metanol e diluído em concentração adequada para análise em HPLC.

Figura 10 - Estrutura do 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluorborato



### 3.2.5 Atividade antimicrobiana

Uma condição reacional foi selecionada baseado-se nos critérios de conversão do éster obtido nas condições otimizadas foi, por fim, purificado. Então, este foi avaliado em relação a sua atividade antimicrobiana de duas formas: uma pelo teste de difusão em ágar e outra por microdiluição. Para a realização do teste foram selecionadas 10 bactérias apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Bactérias selecionadas para análise da atividade antimicrobiana

Bactéria	Sigla	Gram	Temperatura (°C)	Meio de Cultura
<i>Streptococcus mutans</i>	SMU	gram +	37	Medium 92/693/TSA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SE	gram +	37	Medium 92/694/TSA
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	gram +	37	TSA
<i>Listeria grayi</i>	LG	gram +	37	TSA
<i>Micrococcus luteus</i>	ML	gram +	37	TSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	gram +	37	TSA
<i>Escherichia coli</i>	EC	gram -	37	NA
<i>Klebsiella oxytoca</i>	KO	gram -	37	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	gram -	37	NA
<i>Proteus vulgaris</i>	PV	gram -	37	NA

### 3.2.5.1 Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em disco em ágar foi descrito em 1966 por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de susceptibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. É realizado dispensando os discos de papel-filtro, impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas sobre a placa de ágar, após a semeadura do inóculo bacteriano (BRUICE, 1998).

Segundo Sartori (2005), o método mais empregado para realizar ensaios biológicos *in vitro* é a difusão em placas devido a sua facilidade de execução e requerer pequenas quantidades de amostra. A síntese

enzimática que resultou na maior conversão de ascorbil oleato foi selecionada para a realização da atividade antimicrobiana. A condição de reação escolhida foi na razão molar 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico), na temperatura de 70 °C; 3 h; 20 % (m/m) de peneira molecular, solvente orgânico em banho de ultrassom e a amostra foi purificada como descrito anteriormente na etapa da análise em RMN.

Primeiramente foram preparadas as soluções de meio de cultura NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Ágar*) e TSA (*Tryptone Soya Agar*) e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Da cultura onde está a bactéria são retirados 100 µL e adicionados no erlemeyer onde está o meio de cultura que é colocado na incubadora por 24 h a 37 °C e 110 rpm. Logo após o crescimento das bactérias foram realizadas diluições sucessivas (1:10). Destas diluições, alíquotas de 100 µL foram retiradas e inoculadas em placa de petri contendo o meio de cultura sólido e incubadas por 24 h a 37 °C.

Posteriormente, as colônias foram contadas e verificou-se que o crescimento obtido foi uniforme. A aplicação do disco foi feita com o auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação, os discos de papel com 6 mm de diâmetro foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar, em cada placa foram dispostos 3 discos sendo que um com a substância pura e os demais com o composto diluído 10 e 100 vezes. Ácido ascórbico, ácido oleico e ascorbil oleato foram testados. Como controle utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e cloranfenicol (ClF). Após a incubação das placas a 37 °C durante 24 h, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com o auxílio de uma régua. Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores (triplicata), em mm, dos halos obtidos nas três repetições para cada bactéria.

### 3.2.5.2 Teste de microdiluição

O produto (ascorbil oleato purificado) ou os substratos foram solubilizados em dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida a solução foi dispensada em poços de placas de Elisa estéreis com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, para permitir a melhor visualização do crescimento bacteriano. As análises foram realizadas em duplicata e em 8 diluições diferentes de fator de 1:2, começando a partir de uma concentração de 2000 µg·mL<sup>-1</sup> em meio de cultura de triptona de soja (TSB). Como controle negativo foi utilizado DMSO na maior

concentração posta das amostras, enquanto que como controle positivo foi utilizado cloranfenicol em uma concentração de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Uma parte dos poços foi cheio apenas com meio de cultura e uma parte com a bactéria na ausência de outras substâncias para realização dos controles sem crescimento e com 100 % de crescimento. Os inóculos foram preparados com  $100 \mu\text{L}$  de meio contendo as bactérias de modo a obter uma concentração final de  $2\times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Subsequentemente, as microplacas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  com agitação a 110 rpm durante 6 h. Para incubação foram adicionados  $40 \mu\text{L}$  de corante cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC) e as placas foram incubadas durante mais 1 h.

Os poços foram observados conforme a coloração aparente em cada diluição nos poços, as que permaneceram incolores até as que desenvolveram a cor vermelha, indicando o crescimento das bactérias. As cepas bacterianas analisadas foram gram positivas e gram negativas, sendo *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella oxytoca*; *Listeria grayi*; *Micrococcus luteus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Proteus vulgaris*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Sreptomycetes mutans*.

### 3.2.6 Atividade Antioxidante

#### 3.2.6.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

O teste DPPH é um dos métodos mais simples e rápidos de avaliação do poder antioxidante (WANG et al., 2012; MUZZOLI et al., 2003). Ele prevê a redução do radical cromóforo estável DPPH na presença de compostos antioxidantes. A reação que ocorre é a doação de um hidrogênio do antioxidante RH para DPPH. Assim, a formação do respectivo radical reduzido DPPH-H. O radical DPPH é roxo e a adição de um agente antioxidante determina a viragem para amarelo. A atividade redutora das moléculas antioxidantes contra o DPPH é avaliada medindo a diminuição da absorbância a 517 nm da solução radical, após a reação com os produtos a serem testados. Os resultados são expressos como  $\text{IC}_{50}$ , ou seja, a concentração do extrato o que provoca uma redução de 50 % de DPPH radical inicial.

#### ➤ Procedimento para a determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH

Uma vez que esta é uma análise colorimétrica, para cada ascorbil oleato é necessário identificar um intervalo dentro do qual melhor avalia-se o poder antioxidante. A solução alcoólica de DPPH  $1 \times 10^{-4}$  M (correspondente a  $4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ascorbil oleato para diferentes concentrações (variando de 0,002 a  $0,017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As amostras assim obtidas foram colocadas em agitação no escuro a uma velocidade de 200 rpm; após 30 min de incubação à temperatura ambiente as amostras foram medidas num espectrofotômetro a absorvância de cada amostra para o comprimento de onda de 517 nm. Como controle positivo foi usada as mesmas concentrações de amostras, um antioxidante conhecido de síntese, Trolox (Sigma-Aldrich), enquanto para controle negativo foi empregada uma solução alcoólica de  $1 \times 10^{-4}$  M de DPPH em que as amostras eram substituídas pela quantidade correspondente do solvente apropriado (MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$ ).

O timol no intervalo concentração de 0,05 e 0,50 mg/mL foi utilizado como uma referência conhecida de atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi calculada com base no decréscimo de absorvância que se observa após a captura do radical; mais precisamente, como uma percentagem de inibição a formação do radical DPPH de acordo com a equação 4.

$$\text{Teor de Inibição} = 1 - \frac{AA}{AB} \cdot 100 \quad (4)$$

onde:

AA = absorvância de DPPH com ascorbil oleato;

AB = absorvância de DPPH sem ascorbil oleato.

O teor de inibição foi expresso como  $\text{IC}_{50}$ , ou como a concentração, em mg/mL, necessária para inibir 50 % da formação do radical DPPH. Quanto mais baixo for o valor de  $\text{IC}_{50}$  maior é a capacidade antioxidante da amostra examinada.

### 3.2.6.2 Método do ABTS

O teste do ABTS, um cátion radical estável, é outro método amplamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de vários compostos, relatada pela primeira vez por Miller et al. (1993). Ele baseia-se na deterioração de ABTS caracterizado por uma intensa absorção em 700 nm. Este cátion radical é gerado *in situ* por reação de

molécula neutra, com um sistema oxidante, tal como o persulfato de potássio ou mistura metamioglobina e peróxido de hidrogênio e é um método aplicável tanto para compostos hidrofílicos quanto lipofílicos. Após a adição de antioxidante mede-se a absorção. O resultado é expresso em relação à quantidade igual de Trolox necessária para causar a mesma capacidade antioxidante ou TEAC (Trolox capacidade antioxidante equivalente) (MILLER et al., 1993).

### ➤ Procedimento para a determinação da Atividade Antioxidante pelo método com ABTS

O cátion de ABTS é produzido por reação de uma solução de 2 mM de ABTS (0,011g/10 mL água destilada) com 100  $\mu$ L de uma solução a 70 mM de  $K_2S_2O_8$  (0,0946 g em 5 mL de água destilada), mantendo-se a mistura no escuro durante 16 h (SCARTEZZINI et al., 2006). Antes de efetuar análise é necessário zerar o espectrofotômetro a 734 nm, com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), 5 mM a pH 7,4 e dilui-se 1 mL da solução de ABTS com cerca de 24 mL do mesmo tampão, até obter uma absorbância de  $0,70 \pm 0,02$ . Foram preparadas diluições diferentes do ascorbil oleato na gama de concentrações de 0,07 a  $0,50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em metanol. Amostras para análise foram preparadas em um eppendorf. Como controle positivo foram usadas, nas mesmas concentrações das amostras, o antioxidante sintético conhecido como Trolox (Sigma-Aldrich). Como controle negativo, as amostras foram substituídas por uma quantidade correspondente do solvente apropriado (MeOH:H<sub>2</sub>O).

O timol na faixa de concentração de 0,05 e  $2,50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foi utilizado como referência por sua conhecida sua atividade antioxidante. A absorbância de cada amostra foi observada após 1 min da adição do radical. A percentagem de inibição do radical ABTS é calculada a partir da equação 4, sendo que a absorbância AA refere-se ao ascorbil oleato, porém a absorbância AB refere-se ao ácido oléico.

A atividade antioxidante foi expressa como a  $IC_{50}$ , ou como a concentração, em mg/mL, necessária para inibir 50 % da formação do radical ABTS. Quanto mais baixo for o valor de  $IC_{50}$ , maior será a capacidade antioxidante da amostra examinada.

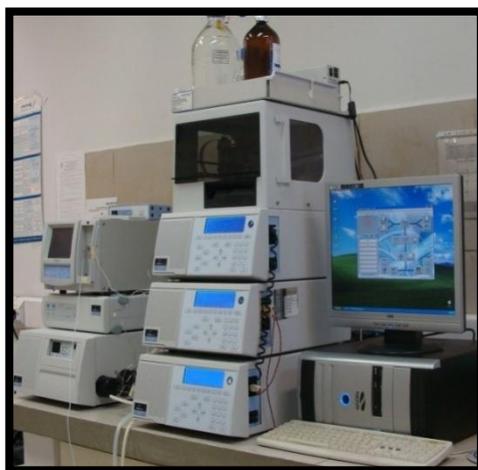
### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

##### 3.3.1.1 Método utilizado para quantificação do éster nas etapas conduzidas na UFSC

A quantificação do produto da reação foi realizada em triplicata em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-PerkinElmer 200), ilustrado na Figura 11, equipado com detector UV-vis, software TotalChrom V6.20.0.1. Os seguintes instrumentos e condições foram usados: coluna de fase reversa (C18,  $300 \times 4$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) (Phenomenex), vazão de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , fase móvel metanol/água/ácido acético (95:5:0,1, v/v/v), o volume de injeção de  $1,0 \mu\text{L}$  e detecção de UV no comprimento de onda de 254 nm. As curvas de calibração foram construídas com as seguintes concentrações variando de 10 a  $1100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A conversão da reação foi calculada com base na amostra analisada e em uma reação estequiométrica. As amostras foram preparadas diluindo-se 0,0015 g do meio reacional para 1,5 mL com metanol grau HPLC. Análises em duplicata.

Figura 11 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – HPLC (a) e coluna cromatográfica para HPLC (b)



(a)



(b)

Fonte: Autor (2014)

### 3.3.1.2 Método utilizado para quantificação do éster nas etapas conduzidas na UNIFE

A quantificação do produto da reação foi realizada em triplicata em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-Waters 600E/486), ilustrado na Figura 11, equipado com detector UV-vis, software Clarity lite. Os seguintes instrumentos e condições foram usados: coluna de fase reversa (C18, 300 × 3,9 mm, 4 μm) (Waters), vazão de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol/água/ácido acético (95:5:0,1, v/v/v), o volume de injeção foi 1,0 μL, e detecção de UV no comprimento de onda de 254 nm. A curva de calibração foi construída com as seguintes concentrações 20, 40, 60, 200, 240, 280, 320, 360 e 400 mg·L<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas por diluição de uma alíquota do produto da reação até 10 mL com metanol grau HPLC, seguida de diluições adequadas para a faixa de concentrações da curva de calibração. As amostras diluídas foram filtradas em membrana de transferência PVDF (fluoreto de polivinilidene) com 0,45 μm de tamanho médio de poros. Análise em duplicata. A conversão da reação foi calculada com base no produto purificado e em uma reação estequiométrica.

### 3.3.2 Purificação do produto

Para a realização da análise as amostras foram purificadas por meio de coluna com sílica gel 60 flash. A purificação foi realizada da

seguinte maneira: preparou-se uma solução de eluente 1:1 (ciclo hexano:acetato de etila) acidificada com 2 % (v/v) de ácido acético e uma segunda solução somente com acetato de etila acidificada com 2 % (v/v) de ácido acético. Passar a primeira solução pela coluna com sílica gel 60 juntamente com a amostra da reação, coletar em tubos de ensaio alíquotas e fazer cromatografia em camada delgada (CCD), fazer o mesmo com a segunda solução. Após identificar o produto, colocar a solução dos tubos identificados como produto em um balão para rotaevaporar os solventes, logo após colocar na bomba de vácuo para eliminação total dos solventes presentes e fazer a análise de RMN.

### 3.3.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear baseia-se na absorção de energia na gama das radiofrequências por parte de núcleos numa molécula, na presença de um campo magnético forte, ou seja, esta estuda a estrutura e as interações moleculares por meio de medidas da interação de campo eletromagnético oscilante com os núcleos presentes em um campo magnético estático. Os núcleos são partes dos átomos, estes são partes das moléculas. Em suma, a Ressonância Magnética Nuclear é uma das mais importantes técnicas para a obtenção de informação física, química, eletrônica e estrutural das moléculas, de um modo não destrutivo, podendo fornecer informação acerca da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas no estado líquido ou sólido (HORE, 1995).

As amostras são normalmente líquidos dissolvidos em solventes apropriados. Para a maioria dos casos, usa-se solventes deuterados (com % D > 99,5 %)  $\text{CDCl}_3$ , acetona- $\text{d}_6$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , etc. O solvente é “transparente” ao equipamento, sendo que o D presente serve também para efetuar e manter a calibração de frequência de campo. A solução é introduzida entre os polos do ímã em um tubo de parede fina, de 5 ou 10 mm de diâmetro e de alta qualidade. O tubo é rodado (por ar ou  $\text{N}_2$ ) em uma certa velocidade para aumentar a homogeneidade local e do campo.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foram realizados no espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus, frequência de 400 MHz, a 25 °C, utilizando como solvente  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ . As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm em relação ao sinal do solvente, assim como as multiplicidades ( $s$  = simpleto,  $d$  =

duplete,  $dd$ = duplo duplete,  $t$  = tripleto,  $m$ = multiplete) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram calculadas em Hz.

### 3.3.4 Determinação do teor de umidade por Karl Fischer

As peneiras moleculares adicionadas ao meio reacional foram submetidas à análise para determinar a quantidade de água retida. As medidas foram realizadas em um determinador de umidade Karl Fischer, Figura 12, baseado na oxidação do  $SO_2$  pelo  $I_2$ , na presença de água.

Primeiramente, uma fatoraçoão com água pura foi realizada para determinar do fator de correção ( $F$ ) e em seguida a concentraçoão de água retida na peneira foi determinada. As amostras (água pura e peneiras) foram tituladas com soluçoão Karl Fischer (soluçoão contendo iodo e dióxido de enxofre) e a determinaçoão do ponto final da reaçoão pode ser observada visivelmente, isto é, quando percebido um excesso de titulante a viragem da cor ocorreu de amarelo para uma coloraçoão parda. As equaçoões 1 e 2 utilizadas para determinaçoão de água retida estão apresentadas a seguir.

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{V \cdot F}{10 \cdot m} \quad (1)$$

sendo:

$V$  = volume de titulante gasto (mL);

$F$  = fator de correção;

$m$  = massa da amostra (g).

$$F = \frac{m \cdot 1000}{V} \quad (2)$$

onde:

$V$  = volume de titulante gasto (mL);

$F$  = fator de correção;

$m$  = massa da amostra (g).

Figura 12 - Determinador de umidade Karl Fischer



Fonte: Autor (2014)

### 3.3.5 Polarimetria

O poder rotatório específico, cujo símbolo é  $[\alpha]$ , pode ser definido como a rotação em graus produzida por uma solução aquosa de uma substância opticamente ativa, cuja composição quantitativa é de  $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , contida num tubo com  $1 \text{ dm}$  de comprimento, a uma dada temperatura e em relação a uma dada luz monocromática. Esta propriedade é específica de cada substância e usa-se quando esta é opticamente ativa, isto é, possui uma estrutura assimétrica capaz de desviar o plano da luz polarizada.

A medida da atividade ótica traduz-se pelo poder rotatório específico. Além desta utilização qualitativa, o poder rotatório específico é também utilizado na análise estrutural e na análise quantitativa de substâncias opticamente ativas (BRUICE, 1998).

A determinação do poder rotatório específico de uma substância é realizada em aparelhos chamados polarímetros, que medem o valor do ângulo de desvio  $\alpha$ .

Inicialmente mediu-se cerca de  $16,4 \text{ mg}$  do produto purificado (ascorbil oleato). Transferiu-se o produto para o balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$ , dissolvendo em  $3 \text{ mL}$  de metanol. Homogeneizou-se. O polarímetro foi zerado e realizou-se a leitura do poder rotatório.

O ângulo do poder rotatório é calculado a partir da equação 3:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{T}} = \frac{\alpha}{L \cdot c} \quad (3)$$

onde:

T = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );

D = comprimento de onda (nm);

$\alpha$  = rotação (medida em graus);

c = concentração ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ );

L = comprimento do percurso (dm).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como existem poucos trabalhos na literatura enfocando a influência do ultrassom na produção de ascorbil ésteres, foi realizado, primeiramente, um estudo visando verificar a influência de alguns tipos de solventes na solubilidade dos substratos em sistema assistido por ultrassom. A partir dos resultados obtidos neste estudo, buscou-se estudar alternativas para a produção de ascorbil éster, sendo realizada a síntese enzimática em solvente orgânico e banho de ultrassom. Em busca de outras alternativas que fossem sustentáveis, tecnologicamente viáveis e de “química verde” para a produção de ascorbil oleato foram realizadas pesquisas utilizando o micro-ondas e os líquidos iônicos para a síntese. Por fim, para a caracterização do éster produzido foram realizadas análises da atividade antioxidante e da atividade microbiana para comprovar o potencial deste composto e por meio da análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e de carbono identificar o produto ascorbil oleato.

### 4.1 ULTRASSOM E SOLVENTE ORGÂNICO

#### 4.1.1 Teste de solubilidade dos reagentes

A fim de obter a melhor concentração inicial dos reagentes de partida, assim como o melhor solvente reacional, o ácido L-ascórbico e o ácido oleico foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos. Neste ensaio, concentrações molares 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico) (1,36 mmol:12,24 mmol) dos substratos foram testadas a 70 °C sob banho ultrassônico, de modo a obter o limite de solubilidade máxima destes.

A baixa solubilidade do ácido ascórbico em solventes apolares é o principal obstáculo para a acilação com ácidos graxos. Os diferentes solventes, tais como 2-metil-2-butanol (álcool terc-amílico), t-butanol e acetona, têm sido selecionados para a síntese enzimática de ascorbil ésteres de ácidos graxos (KARMEE, 2009). Nos estudos que utilizaram o álcool tert-amílico na reação, o ácido ascórbico tornou-se suficientemente solúvel neste solvente e as lipases estáveis e ativas. Em comparação com outros compostos poli-hidroxilados, tais como hidrato de carbono mesmo com a hidrofobicidade menor do ácido ascórbico não torna necessário acrescentar co-solventes como o dimetilsulfóxido (REYS-DUARTE et al., 2011). Para uma melhor visualização dos

resultados experimentais na Tabela 7, foram atribuídos números em relação à solubilidade dos substratos, sendo:

Tabela 7 - Teste de solubilidade do ácido ascórbico e ácido oléico em volumes variados diferentes solventes

Solventes	Log P	Constante dielétrica	Volume de solvente (mL)			
			5	10	15	20
terc-butanol	0,80	17,1	3	3	2	1
Isopropanol	0,05	18	3	3	nr	nr
Hexano	3,50	1,88	3	3	nr	nr
álcool etílico	-0,24	30	3	1	nr	nr
ácido acético	-0,17	6,2	3	3	nr	nr
dimetilsulfóxido (DMSO)	-2,03	46,7	1	1	nr	nr
Ciclohexano	3,20	2,02	3	3	nr	nr
Isooctano	4,50	1,94	3	3	nr	nr
n-heptano	4,00	1,92	3	3	nr	nr
Tolueno	2,50	2,38	3	3	nr	nr
Xileno	3,15	2,4	3	3	nr	nr
Acetona	-0,23	21	3	3	nr	nr
2-metil 2-butanol	1,15	5,8	3	3	nr	nr

1 – Totalmente solúvel: solução límpida; 2 – Parcialmente solúvel: solução turva; 3 – Insolúvel: solução turva e corpo de fundo; nr – não realizado.

A constante dielétrica geralmente fornece uma medida aproximada da polaridade do solvente. Se a constante dielétrica dos solventes for menor que 15 são considerados apolares enquanto que solventes polares possuem constantes dielétricas maiores que 15 (REICHARDT, 1994). Assim, partindo do princípio que semelhante dissolve semelhante, ou seja, solvente polar dissolve substâncias polares, pode-se observar na Tabela 7 que o ácido ascórbico foi solúvel em solventes polares como o dimetilsulfóxido (DMSO), álcool etílico e terc-butanol.

O ácido oleico não apresentou problemas quanto à solubilidade nos solventes orgânicos testados, podendo ser aplicado nas reações de

esterificação com solventes em maiores concentrações. Tal dado é importante, pois comumente aplicam-se razões molares superiores de álcoois a ácidos em reações de esterificação catalisadas por lipases, no intuito de se acelerar a velocidade inicial do processo (LAFUENTE et al., 2011).

Já o ácido L-ascórbico apresentou uma solubilidade dependente da concentração molar aplicada. Pelo fato do solvente terc-butanol apresentar temperatura normal de ebulição de 82,2 °C, desta forma facilitando 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 usando o terc-butanol como solvente (LERIN et al., 2012).

O terc-butanol é um álcool terciário, sendo um álcool menos reativo que os outros solventes testados, assim sendo mais solúvel na reação. Na presença de bases fortes, os alcoóis atuam como doadores de prótons, geralmente são ácidos mais fracos do que a água, são versáteis e podem ser usados na preparação de uma variedade de compostos. Quanto maior o número de grupos OH, mais intensas serão as interações intermoleculares e maiores serão os pontos de fusão e ebulição dos alcoóis (SOLOMONS, 1996).

Song e Wei (2002) comprovaram que o solvente orgânico influencia na solubilidade dos substratos, podendo afetar a síntese de ascorbil éster. A polaridade do ácido L-ascórbico é muito diferente do ácido oleico e do ascorbil oleato e devido a essa diferença significativa na polaridade, vem a importância da escolha do solvente apropriado.

A hidrofobicidade do solvente orgânico também influencia os substratos e a atividade enzimática. Os solventes com elevada polaridade (alta constante dielétrica e baixo log P) podem retirar facilmente a água das moléculas de enzima, podendo levar à sua inativação (SONG; WEI, 2002).

Em relação aos solventes utilizados, pode-se concluir que o uso DMSO possui algumas vantagens como a pouca quantidade de solvente adicionada e o poder de solubilizar com maior rapidez os substratos da reação, mas a desvantagem é a dificuldade de separação do produto do solvente, outra desvantagem é sua temperatura de ebulição de 189 °C. Várias tentativas foram averiguadas, sem sucesso, como a rotavaporação e o uso de estufa a vácuo. Outra desvantagem da utilização deste solvente é alta hidrofiliabilidade, que leva a um aumento da quantidade de água no sistema, não desejável para a síntese de ésteres.

O etanol também foi o solvente ideal para os substratos da reação, porém este álcool pode participar da reação, levando à formação de etil oleato, devido à sua maior reatividade quando comparado com álcoois secundários e terciários.

Assim, concluiu-se que o terc-butanol ( $\log P = 0,80$ ) foi o solvente orgânico mais adequado para essa síntese, pois solubiliza os substratos e não reage com o ácido oleico. Este é uma molécula que apresenta uma cadeia ramificada e um menor  $\log P$  comparando-se com o hexano e o heptano, isso aumenta a sua polaridade, consequentemente isso irá afetar a forma de interação entre a água e esses alcoóis. Assim, tendo uma cadeia menor e ramificada, diminuirá a área de contato entre suas moléculas, favorecendo as interações entre estas moléculas e a água. O terc-butanol e a água são miscíveis, pois suas moléculas conseguem estabelecer fortes interações intermoleculares.

#### **4.1.2 Avaliação da capacidade catalítica de resinas para a produção de ascorbil oleato em ultrassom com solvente orgânico**

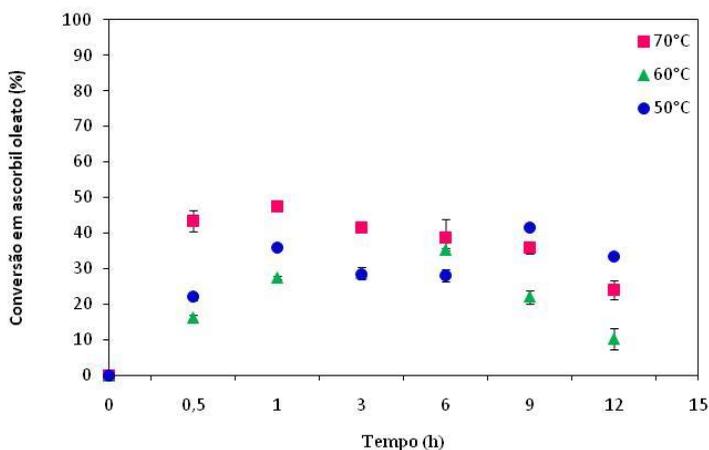
Para a realização do teste das resinas utilizou-se como condições fixas de razão molar 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico); 3 h de reação; 100 % de potência do ultrassom, 70 °C; 20 mL de solvente terc-butanol e 0,7938 g de Amberlyst 15; 0,74 g de Amberlyst XAD 16 e 0,74 g de Amberlyst 36. Os experimentos e quantificação do éster foram realizados em duplicata.

Apesar de relatos na literatura mostrarem que estas resinas apresentam atividade catalítica em outras reações (LAROQUE et al., 2015; SIGMA ALDRICH, 2007), os resultados não foram satisfatórios para a reação de esterificação do ácido L-ascórbico para o produto de interesse nesta pesquisa, não conduzindo à formação do produto de interesse com nenhuma das resinas testadas. Segundo Sigma Aldrich (2007), as resinas podem atuar como catalisadores em um processo quando os reagentes são capazes de penetrar nos poros do adsorvente. Neste contexto, as resinas podem não ter apresentado atividade catalítica em função do maior tamanho molecular dos substratos, quando comparados àqueles utilizados por Laroque et al. (2015) – ácido acético e eugenol.

### 4.1.3 Efeito da temperatura na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom

A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a conversão em ascorbil oleato, pois esta variável possui um importante papel no equilíbrio da reação, manteve-se fixa a razão molar ácido ascórbico:ácido oleico (1:6), concentração da enzima em 5 % (m/m substratos), 20 mL de terc-butanol e 100 % de frequência no ultrassom, o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 50, 60 e 70 °C, conforme apresentado na Figura 13. A potência não foi variada devido a estudos anteriores de Lerin et al. (2011).

Figura 13 - Cinética da produção de ascorbil oleato em função da temperatura. Condições reacionais: Razão molar de ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:6, concentração de enzima de 5 % (m/m), 20 mL de terc-butanol e 100 % da potência do ultrassom



A partir da Figura 13 pode-se verificar que o comportamento nas três temperaturas (50, 60 e 70 °C) até 1 h de reação foram semelhantes. Deve-se levar em consideração que a 70 °C em 1 h de reação obteve-se um rendimento de 47,5 % e 3 h de 41,6 %, ou seja, em maior temperatura e menor tempo ocorre alta produção. Em temperaturas de 60 e 70 °C, comportamentos semelhantes foram observados. Pode-se ainda observar que com o aumento da temperatura ocorreu o aumento da velocidade inicial da reação e conversão em ascorbil oleato.

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem melhorar a difusão dos substratos ou sua solubilidade. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, no caso a Novozym 435<sup>®</sup> está na faixa de 40 a 70 °C (KRISTENSEN et al., 2005).

Na literatura podem ser encontrados vários exemplos do efeito da temperatura na síntese enzimática de ésteres. Em geral, todos os trabalhos reportam uma temperatura ótima. Esse ótimo ocorre, pois o aumento da temperatura leva à maior solubilização dos substratos, aumenta o coeficiente de difusão e a velocidade das reações. Por outro lado, um aumento excessivo pode levar à inativação da enzima. Os rendimentos reportados para a síntese enzimática de ésteres pela enzima Novozym 435<sup>®</sup> variam muito em função do sistema estudado. São encontrados rendimentos variando de 35 % para ascorbil palmitato (LERIN et al., 2011) até 96 % para o caso da produção de palmitato de 2-etilexila (RICHETTI, 2009).

Como é possível observar neste estudo constatou-se que as cinéticas realizadas em baixas temperaturas conduzem uma lenta transferência. O mesmo foi comprovado no estudo de Stojanovic et al. (2013) de modo que as conversões são relativamente inferiores em baixas temperaturas. Também se pode observar o mesmo comportamento no estudo realizado por Richetti (2009) onde analisou-se o efeito da temperatura (30 a 70 °C) no sistema reacional de produção de palmitato de 2-etilexila, fixando-se a razão molar em 1:6, 10 % de enzima (Novozym 435<sup>®</sup> e Lipozyme RM IM) e 150 rpm de agitação em shaker, verificando 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<sup>®</sup> em 30 min e 95 % para a Lipozyme RM IM em 1 h de reação.

A temperatura é um dos fatores importantes para síntese de ascorbil éster, o seu controle é fundamental para não desnaturar o biocatalisador enzimático utilizado, no caso deste estudo a enzima Novozym 435<sup>®</sup> possui temperatura ótima de atuação entre 40 e 70 °C, possuindo efeito significativo no equilíbrio da reação, atividade e estabilidade da enzima.

#### **4.1.4 Efeito da razão molar dos substratos na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom**

A razão molar dos substratos apresenta papel importante, visto que 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. Com a adição do excesso de um dos substratos o equilíbrio da reação se deslocará para formação do produto.

Para avaliação do efeito da razão molar do ácido ascórbico e ácido oleico na conversão de ascorbil oleato, a temperatura foi mantida fixa em 50 e 70 °C, concentração de enzima de 5 % (m/m) em relação à quantidade dos substratos, 20 mL de terc-butanol e 100 % de frequência ultrassônica, tornando possível a construção de curvas experimentais de conversão versus tempo de reação, conforme apresenta a Figura 14. Pode-se verificar que um aumento na razão molar conduziu às maiores conversões. Utilizando a razão molar de 1:9 obteve-se a maior conversão, de 66,4 %, no tempo de reação de 3 h. Observou-se uma queda da conversão após 3 h de reação na maioria dos ensaios. Acredita-se que esse comportamento deve-se à água formada na reação, cujo acúmulo no meio causa o deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de formação dos reagentes com a consequente queda na conversão.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Lerin et al. (2011) que utilizaram temperatura de 80 °C e obtiveram conversão de 27,2 % em ascorbil palmitato. Já no estudo de Humeau et al. (1998), os autores obtiveram 56 % de ascorbil palmitato (produto) em 8 h de reação usando a razão molar de 1:9 (ácido L-ascórbico:ácido palmítico), enzima Novozym 435<sup>®</sup>, 20 mL de álcool t-amílico, 55 °C e agitação em shaker a 400 rpm. No estudo de Song et al. (2004), os autores avaliaram a produção de ascorbil linoleato e ascorbil oleato por esterificação enzimática usando Novozym 435<sup>®</sup>, a reação ocorreu em shaker e rendimentos de 38 e 44 % foram obtidos para ambos os produtos após 12 h de reação.

Figura 14 - Cinética do efeito da razão molar a 70 °C na conversão em ascorbil oleato

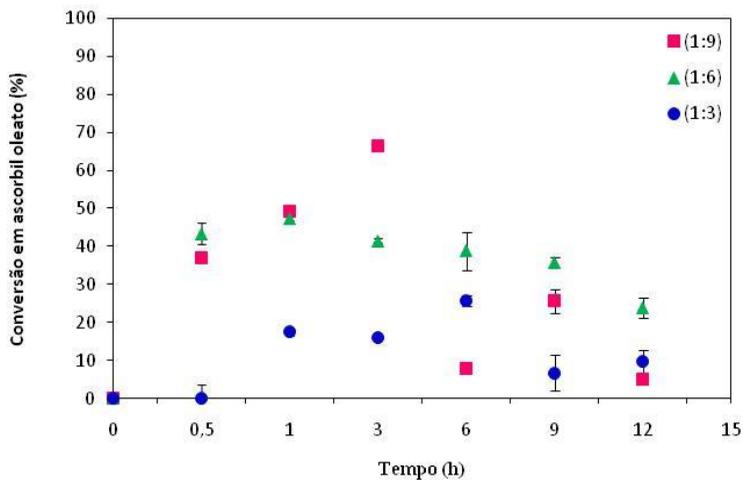
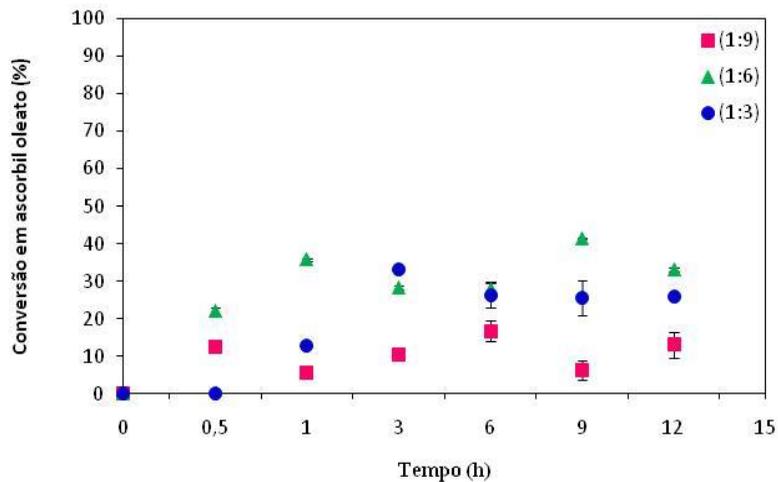
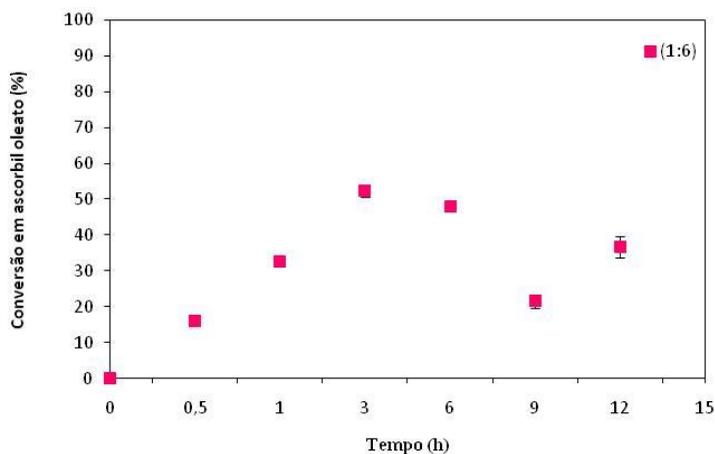


Figura 15 - Cinética do efeito da razão molar a 50 °C da conversão do ascorbil oleato



Outras análises da razão molar dos substratos foram realizadas utilizando as mesmas condições, estas são concentração de enzima de 5 % (m/m) em relação à quantidade dos substratos, 20 mL de solvente e 100 % de frequência ultrassônica, somente alterando a temperatura para 70 e 50 °C tornando possível a construção de curvas experimentais de conversão versus tempo de reação, conforme apresenta a Figura 16. Observa-se que melhores resultados foram obtidos na razão molar 1:6 em 12 h de reação, conduzindo a conversões de 33,31 %, só que cabe salientar quem em 3 h de reação (60 °C) obteve-se 54 %, assim obtendo menor gasto energético, outro caso que pode ser citado também é de 47,5 % em 1 h de reação (70 °C).

Figura 16 - Cinética do efeito da razão molar (1:6) à temperatura de 60 °C da conversão do ascorbil oleato



Se a reação for reversível, um aumento na concentração do ácido oleico pode deslocar o equilíbrio, resultando em maiores conversões. Neste caso, a razão molar dos substratos normalmente é um dos parâmetros mais importantes nas reações de esterificação enzimática. Pode ser citado o estudo de Chang et al. (2009) que realizaram experimentos de esterificação enzimática de ascorbil laurato e observaram que um aumento na concentração da razão molar dos substratos conduziu a uma conversão de cerca de 80% em 6 h de reação no skaker (180 rpm) a 45 °C.

O decréscimo da conversão do ascorbil oleato pode ser explicado por meio do estudo de Irimescu et al. (2004), os resultados nas cinéticas do efeito comparativo da razão molar e da temperatura pode estar associado à presença do subproduto formado, que no caso é a água. Esta água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro a ser controlado, pois durante o curso da reação, um 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 um produto com altas conversões.

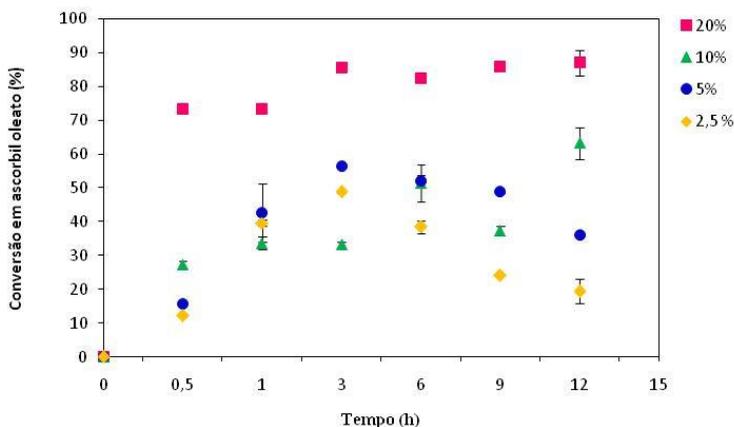
#### **4.1.5 Efeito da utilização de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom**

A reação de esterificação gera uma quantidade de água no meio, o que pode afetar a velocidade de reação e também a posição do equilíbrio. Se o teor de água formado for adequado, pode manter a configuração ativa da enzima. Mas se houver muita água, irá inibir o produto e o equilíbrio da reação. Assim, é essencial ter um método para controlar o teor de água ou a atividade termodinâmica da água durante o processo da reação. Para remover a água e aumentar a concentração do produto de reação existem alguns estudos que utilizam peneiras moleculares que retiram a água da reação, deslocando o equilíbrio químico no sentido de síntese (SONG; WEI, 2002).

Primeiramente, uma avaliação da cinética de produção enzimática de ascorbil oleato sob ultrassom foi realizada sem a adição de enzima, com adição da peneira molecular para investigar se a peneira molecular teria atividade catalítica. Os experimentos foram realizados de forma não destrutiva e com tempo de 12 h. Contudo, não observou-se conversão em ascorbil oleato em nenhum dos ensaios, comprovando a hipótese que a peneira molecular não apresenta atividade catalítica para esse sistema reacional.

A Figura 17 representa os valores de conversão em ascorbil oleato com utilização de peneira molecular (4 Å) em diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 %), previamente secas a 100 °C por 24 h. As condições da reação foram 1:9 (ácido L- ascórbico:ácido oleico), 70 °C, 5 % de Novozym 435®, 20 mL de terc-butanol, escolhidas a partir das melhores conversões obtidas nos experimentos anteriores.

Figura 17 - Valores de conversão em ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom com peneira molecular em diferentes concentrações



Pode-se verificar que o maior valor de conversão (87,1 %) das cinéticas da peneira molecular foi encontrado nas seguintes condições: 1:9 (ácido L-ascórbico:ácido oleico), 70 °C; 20 % de peneira molecular, 5 % de Novozym 435<sup>®</sup>, 20 mL de terc-butanol, 12 h de reação e 100 % de frequência ultrassônica. Ao contrário dos sistemas nos quais não se utilizou peneira molecular, após 3 h de reação a conversão da reação não caiu para concentrações de peneira acima de 5 %. Isso mostra que há uma concentração mínima necessária para a remoção da quantidade de água gerada na reação.

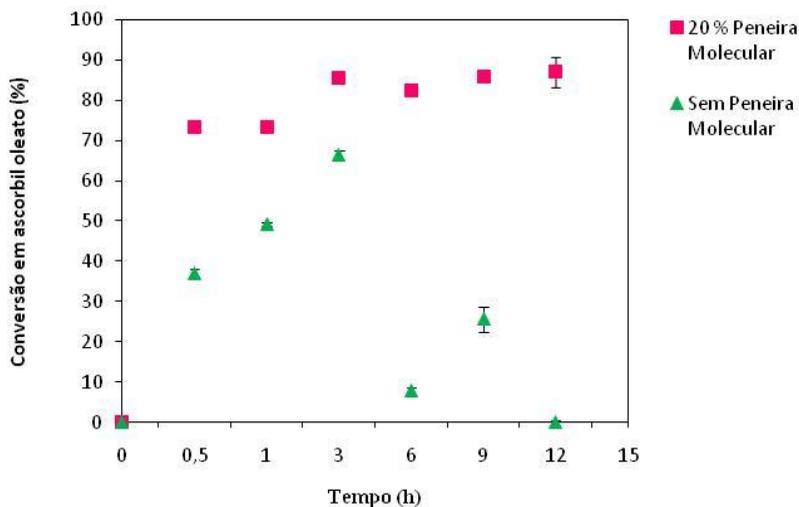
Na reação de esterificação, o teor de água do meio não só afeta a taxa de reação como também o equilíbrio, pois o teor de água adequado mantém a configuração da enzima ativa, se tiver mais água do que o necessário inibe equilíbrio para movimentar-se e produzir o produto. Por isso, a necessidade do uso da peneira molecular ajudará a manter e melhorar a concentração do produto da reação.

O estudo de Viklund et al. (2003) relata em seu estudo da síntese enzimática de ascorbil palmitato nas condições de 10 mL de álcool t-amílico, temperatura de 60 °C, 50 h de reação, agitação mecânica, 50 mg da enzima Novozym 435<sup>®</sup> e 400 mg de peneira molecular obtiveram rendimento de 71 % (1:1), que quando adicionada a peneira molecular aumentou significativamente a conversão do produto final, podendo ser comparado ao resultado da nossa pesquisa.

A influência do teor de água em reações de esterificação tem sido investigada por alguns autores. Em geral, todos mostram que há uma concentração ótima de água nos sistemas, que varia em função da natureza dos substratos e produtos. Por exemplo, concentrações tão baixas quanto 0,025 % de água na reação já podem inviabilizar a conversão em ascorbil oleato na transesterificação de óleo de oliva com ácido ascórbico em álcool terc-amílico (MORENO-PEREZ et al., 2013). Os mesmos autores mostraram que o uso de uma razão de 5 % (200 mg) de peneira molecular para substrato de ácido ascórbico/azeite de oliva (1:1) já é suficiente para elevar a conversão a 70 %. Estudos recentes sobre a produção enzimática de ascorbil oleato vêm propondo alternativas para eliminar ou reduzir o teor de água presente na reação. Moreno-Perez et al. (2013) estudaram a síntese de ascorbil oleato por transesterificação enzimática de azeite de oliva em meio orgânico polar, ao 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 com uma solução contendo ácido ascórbico e azeite de oliva (1:1), 5 mL de álcool terc-amílico e 200 mg de peneira molecular. Os melhores rendimentos foram obtidos na ausência de água e/ou baixa concentração de água, o rendimento em ascorbil oleato obtido foi de 70 %, já na concentração de água de 0,025 % não se obteve nenhuma conversão em ascorbil oleato.

Um dos produtos da esterificação é a água mediada pela lipase e o seu acúmulo pode deslocar o equilíbrio no sentido da hidrólise do éster. Se formar uma fase de água deve-se controlar o pH, ou seja, um valor de pH muito baixo e a concentração de ácido resultam em alguns efeitos sobre a estabilidade da atividade da enzima. Se ocorrer estes inconvenientes é necessário fazer a remoção da água formada. A fim de comparar o comportamento das sínteses enzimáticas foram realizadas cinéticas com as condições maximizadas encontradas nas cinéticas anteriores, no caso as cinéticas na temperatura de 70 °C, 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico), 20 mL de terc-butanol, 100 % de frequência ultrassônica, 5 % de Novozym 435<sup>®</sup>, uma das cinéticas com 20 % de peneira molecular (4 Å) e outra somente com a enzima. Observa-se por meio da Figura 18 que o uso da peneira molecular é essencial na produção de ascorbil oleato auxiliando na retirada da água do sistema, facilitando a formação do composto desejado com menos tempo de reação, sendo vantajosa e de grande importância sua aplicação na esterificação.

Figura 18 - Cinética comparativa do efeito da peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato



Paludo et al. (2015) testaram a adição de peneiras moleculares (3 Å) variando de 0 a 120 mg·mmol<sup>-1</sup> de ácido butírico. Os autores observaram que nos estágios iniciais das reações não ocorreram efeitos significativos causados pelas peneiras moleculares, isso devido à maior parte da água estar saindo de dentro do suporte. Após 6 h de reação, o rendimento final foi por volta de 60 % para a reação sem peneiras moleculares, em comparação com 90 % para as reações com a presença de peneiras moleculares.

#### 4.1.5.1 Análise da umidade

A fim de analisar se a peneira molecular reteve água do meio reacional, as peneiras após as reações foram recuperadas e submetidas à determinação de umidade segundo Karl Fischer. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 8, que comprova a eficiência da peneira calculada a partir da água teórica que seria liberada pela reação com base na conversão obtida. A condição experimental de 1:9, 70 °C, 5 % de Novozym 435<sup>®</sup>, 12 h de reação foi escolhida para a realização deste teste, tendo sido escolhida por apresentar o melhor resultado em termos de conversão em ascorbil oleato.

Tabela 8 - Quantidade de água retida na peneira molecular em diferentes concentrações

<b>Quantidade de peneira molecular (4 Å) na reação</b>	<b>Quantidade de água retida (%)</b>
20 % ( $\pm 1,1043\text{g}$ )	100
10 % ( $\pm 0,5542\text{g}$ )	99,98
5 % ( $\pm 0,2812\text{g}$ )	99,94
2,5 % ( $\pm 0,1417\text{g}$ )	88,88

OBS: Análise realizada em duplicata

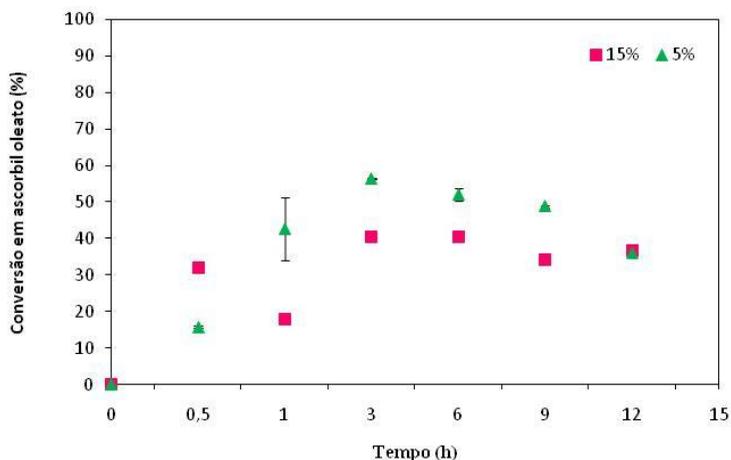
Analisando os resultados é possível verificar que quanto maior a remoção de água do meio reacional maiores as conversões, no entanto a maior remoção é realizada pela maior concentração de peneira. Como visto anteriormente, a adição de uma concentração de 20 % de peneira molecular conduz a maiores rendimentos e neste caso a quantidade de água retida também é maior, 100 % de absorção de água. Para uma concentração de 10 % de peneira, a quantidade de água retida foi de 99,98 %, para 5 % de peneira molecular 99,94 % e em 2,5 % obtendo 88,88 % de água retida, com isso, em maiores concentrações de peneira molecular maiores retenções de água foram observadas, assim condizendo com os maiores valores de conversão das sínteses e também tornando o sistema com um comportamento mais estável.

Embora o uso do ultrassom tenha alcançado resultados satisfatórios, melhores foram os resultados com a combinação de ultrassom com a adição da peneira molecular. Ao longo do trabalho estes resultados foram reproduzidos. Ao final do tempo reacional, a mistura apresentava um aspecto semi-sólido e de cor amarelo claro, sendo aceitável caso a realização de pesquisas envolvendo o encapsulamento do composto produzido (ascorbil oleato).

#### **4.1.6 Efeito da quantidade de enzima na síntese de ascorbil oleato utilizando peneira molecular**

O efeito da concentração da enzima na conversão em ascorbil oleato foi avaliado a 70 °C, razão molar de ácido L-ascórbico e ácido oleico de 1:9, 20 mL de terc-butanol e potência do ultrassom de 100 %, variando a concentração de enzima de 5 e 15 % (m/m). A Figura 19 ilustra os dados experimentais e os resultados obtidos na avaliação cinética.

Figura 19 - Cinética da produção de ascorbil oleato em ultrassom em diferentes quantidades de enzima



O aumento da quantidade de enzima pode afetar positivamente a velocidade de reação. Contudo, a uma concentração muito elevada de enzima, a conversão da reação não aumenta de modo claro. Isto pode ser relacionado com: (1) a dificuldade em manter a suspensão uniforme dos biocatalisadores, (2) captura da água livre pelo suporte, conduzindo à inativação da enzima (WEI et al., 2003), ou (3) o rendimento da reação é tão elevado que um novo aumento no teor de biocatalisador não proporciona um aumento significativo no rendimento de conversão final. Em reações enzimáticas um dos maiores problemas é o custo da enzima, por isso é importante atingir altas taxas de conversão usando a menor quantidade de enzima possível.

Uma hipótese para explicar o resultado obtido neste trabalho está relacionada ao excesso de enzima no meio causando uma agregação das partículas das enzimas imobilizadas, assim 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 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, não ocorrendo o aumento da conversão, esta é uma afirmação dos estudos de Karra-châabouni et al. (2006).

O efeito adverso do aumento da quantidade de enzima já foi relatado também em outros estudos. Por exemplo, no estudo de Babicz et al. (2010) que avaliaram o efeito da concentração de enzima na hidrólise de óleo de soja em ultrassom (47 kHz de frequência e 125 W de potência) e observaram uma queda na conversão com o aumento da quantidade de enzima adicionada ao meio reacional, este resultado foi observado tanto para a enzima imobilizada Lipozyme RM IM quanto para a Novozym 435<sup>®</sup>.

#### 4.2 PRODUÇÃO DO ÉSTER EM SISTEMA COM MICRO-ONDAS E LÍQUIDOS IÔNICOS

Esta etapa, realizada na UNIFE-Itália, apresenta a avaliação da produção de ascorbil oleato via síntese enzimática em sistema com solvente orgânico e micro-ondas por meio do estudo das variáveis que exercem influência no processo, com o intuito de aumentar a conversão em condições melhores que encontradas em ultrassom. Também serão apresentados os resultados obtidos substituindo o solvente orgânico por líquidos iônicos.

##### 4.2.1 Efeito da temperatura, razão molar e tempo na síntese de ascorbil oleato em micro-ondas

Os resultados obtidos seguindo a metodologia descrita no item 3.2.3, com diferentes razões molares, com as respectivas temperaturas utilizadas e quantidade de solvente definida para solubilização total dos substratos são apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22. Pode-se observar que a máxima conversão em ascorbil oleato atingida em sistema reacional em micro-ondas a 80 °C foi de 43 % em 1 h de reação. A 70 °C a maior conversão foi de 61 %, também em 1 h, e a 60 °C a máxima conversão foi de 90 % em 2 h de reação. Esses resultados podem ser observados nas Figura 20, Figura 21 e Figura 22 das cinéticas de produção do ascorbil oleato em razões molares diferentes (1:1, 1:3, 1:6 e 1:9).

Figura 20 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em microondas realizadas na temperatura de 80 °C, 5 % Novozym 435®

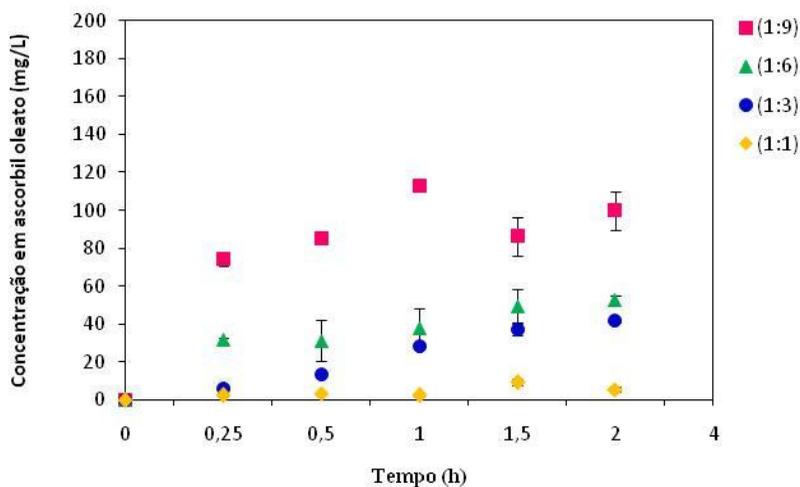


Figura 21 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em microondas realizadas na temperatura de 70 °C, 5 % Novozym 435®

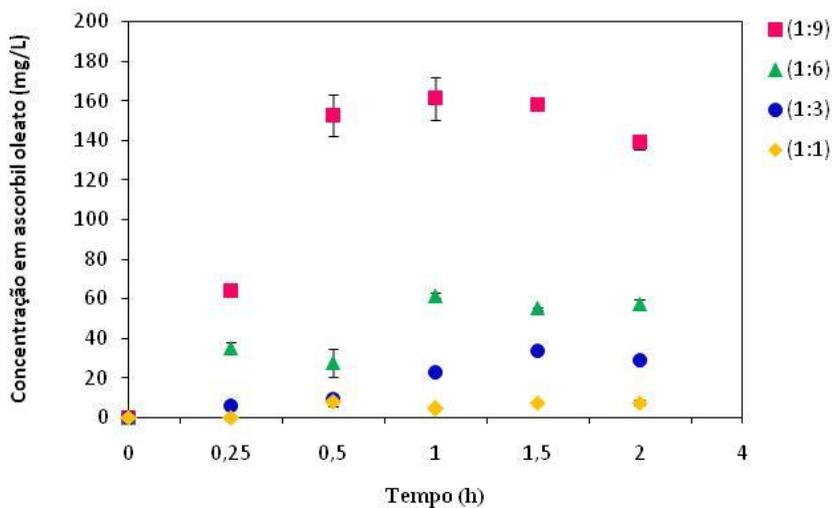
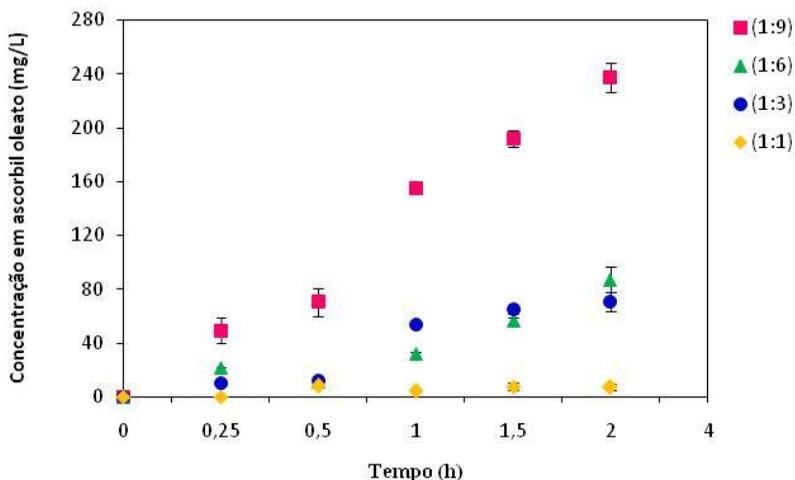


Figura 22 - Cinéticas da síntese enzimática de ascorbil oleato em micro-ondas realizadas na temperatura de 60 °C

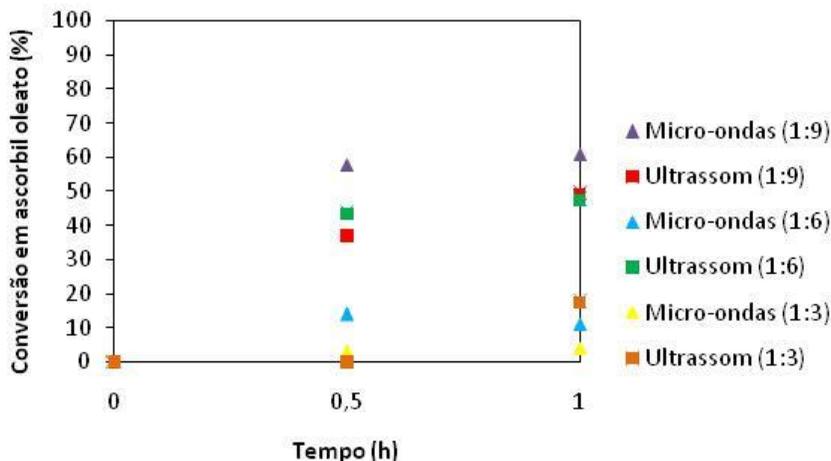


Comparando os resultados obtidos nas reações realizadas no micro-ondas e ultrassom nas mesmas condições experimentais (Figura 23), pode-se concluir que a utilização do micro-ondas mostrou ser mais eficiente do que o uso de ultrassom, resultando em maior conversão em éster na mesma razão molar, em menor temperatura e menor tempo de reação. Isto está relacionado com a eficiência do micro-ondas na irradiação ao meio reacional. Observa-se que com o aumento da concentração do ácido oleico aumenta-se a quantidade de produto formado para ambos os sistemas. As cinéticas de micro-ondas foram realizadas de forma destrutiva e as cinéticas no ultrassom de forma não destrutiva.

O estudo de Costa et al. (2014), os quais realizaram uma pesquisa para a produção de ascorbil palmitado utilizando micro-ondas (caseiro), 50 W de potência, 1 h de reação, razão molar 1:5 (ácido ascórbico: ácido palmítico), 3 mL de álcool terc-amílico, Novozym 435<sup>®</sup> e peneira molecular (3 Å) e obtiveram 71 % de conversão, relata que o micro-ondas é eficiente para a síntese e que a temperatura não tem efeito significativo.

Acredita-se que a composição de cada material e seu estado físico (líquido ou sólido) determinam o tipo de deslocamento das cargas assim como a sua capacidade em transformar a energia das micro-ondas em calor.

Figura 23 - Cinética comparativa da reação em ultrassom e em micro-ondas nas mesmas condições experimentais [70 °C; 5 % Novozym 435<sup>®</sup>; terc-butanol; ácido ascórbico:ácido oléico (1:9, 1:6 e 1:3)]



Um experimento de controle na ausência de enzima foi realizado e não apresentou qualquer conversão, mostrando que apenas a irradiação de micro-ondas sem presença do catalisador não foi capaz de conduzir a reação. Assim, mostra-se a existência de uma sinergia clara entre catálise enzimática e a irradiação por micro-ondas.

O micro-ondas é uma tecnologia emergente que proporciona uma energia alternativa para realizar reações enzimáticas. Em enzimas, em que os grupos polares, tais como OH e NH<sub>2</sub> estão presentes podem absorver a energia das micro-ondas. Por conseguinte, a atividade, seletividade e estabilidade da enzima pode ser modificada por aquecimento das micro-ondas. A energia das micro-ondas são transferidas diretamente entre o campo eletromagnético e o perfil estrutural polar, que poderia induzir mudança conformacional na enzima, resulta na alteração das propriedades enzimáticas. Além disso, a absorção direta da irradiação de micro-ondas pelos substratos polares pode conduzir a uma maior reatividade dos grupos funcionais envolvidos na reação enzimática. Assim, esta investigação revelou que a irradiação de micro-ondas mostra ser uma tecnologia promissora para aumentar a eficiência da biocatálise (ZIAULLAH et al., 2014).

A irradiação de micro-ondas está provando ser uma fonte de energia limpa, eficiente, conveniente e tem sido utilizada em algumas

reações catalisadas por enzimas (DA ROS et al., 2012; GAI et al., 2013). Este tipo de irradiação acelera a velocidade inicial das reações e mesmo a enantioselectividade das enzimas (CHEN et al., 2008; LEADBEATER et al., 2007).

Outros estudos têm investigado o efeito da irradiação de micro-ondas em sistemas reacionais catalisados por enzimas. Por exemplo, Shinde et al. (2014) estudaram o efeito sinérgico da irradiação de micro-ondas na catálise enzimática enantiosseletiva para resolução do analgésico Ceterolac<sup>®</sup>. Verificaram que a conversão foi mais rápida sob irradiação em comparação com aquecimento convencional. Os autores atribuíram os efeitos positivos do uso de micro-ondas não somente ao efeito térmico, mas também à absorção da radiação pelos substratos com alta constante dielétrica, causando ativação dos grupos funcionais na interface.

A enzima comportou-se de forma diferente e em menos tempo catalisou a reação, isso pode ser devido à mudança conformacional na enzima facilitando o substrato de se aproximar do local ativo da enzima com mais facilidade sob irradiação de micro-ondas que sob aquecimento convencional.

O aquecimento por micro-ondas envolve absorção de energia por grupos funcionais que levam condutividade iônica ou um efeito de rotação de dipolo e esta energia é então liberada na solução. Por outro lado, o ultrassom é um processo mecânico. Os efeitos químicos e físicos do ultrassom surgem de colapso por cavitação, o que produz condições extremas localmente e, portanto, induz à formação de espécies químicas não prontamente obtidas sob condições convencionais (RUFINO et al., 2010).

Fortuny (2008) diz que os materiais constituídos de moléculas polarizáveis, os dipolos se alinham na direção do campo elétrico quando este se encontra ativo e deslocam-se de forma aleatória quando o campo anula-se. Esse efeito é altamente dependente da frequência do campo elétrico e do tempo necessário para que os dipolos retornem ao seu estado de desordem inicial. Para baixas frequências de radiação o tempo em que o campo elétrico muda de sentido é superior ao tempo de resposta dos dipolos.

A indústria de oleoquímicos, em particular, tem um interesse permanente no controle das propriedades físicas, funcionais e organolépticas dos produtos e os seus derivados. O potencial da tecnologia enzimática para o desenvolvimento de novos produtos ou conhecidos a custos mais competitivos atende a necessidade desse segmento industrial em expandir suas metas. No entanto, as reações

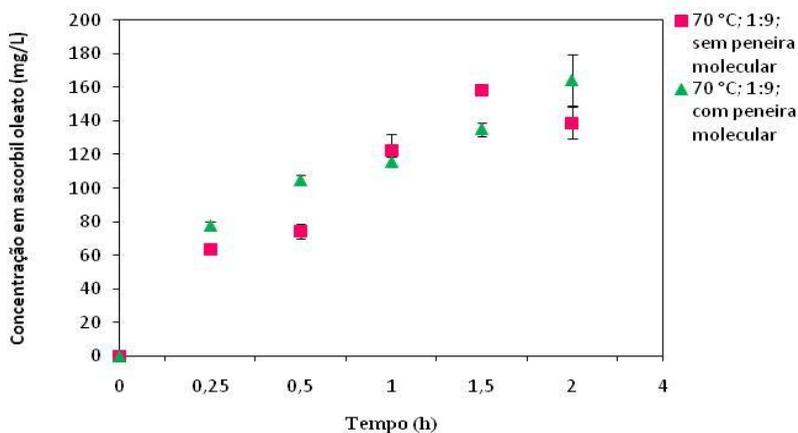
catalisadas por lipases são geralmente lentas. A aplicação de campos eletromagnéticos de alta frequência (micro-ondas) é uma das estratégias recomendadas para acelerar estas reações, a fim de obter rendimentos elevados em tempo mais curto

#### 4.2.2 Efeito da peneira molecular na síntese de ascorbil oleato em micro-ondas

Primeiramente, um experimento de controle na ausência de enzima foi realizado somente com peneira molecular (4 Å), os substratos (ácido ascórbico e ácido oleico) e solvente orgânico (terc-butanol) não se obtendo qualquer conversão. Como etapa precedente a execução das cinéticas de produção de ascorbil oleato sem a presença de peneira molecular, visando verificar o comportamento desta nas reações em micro-ondas.

A Figura 24 apresenta a comparação entre as cinéticas de reações conduzidas com a presença e sem a presença da peneira molecular. Pode-se observar que a reação com peneira molecular é mais estável, provavelmente devido à remoção de água do meio, como já comprovado nos experimentos com ultrassom.

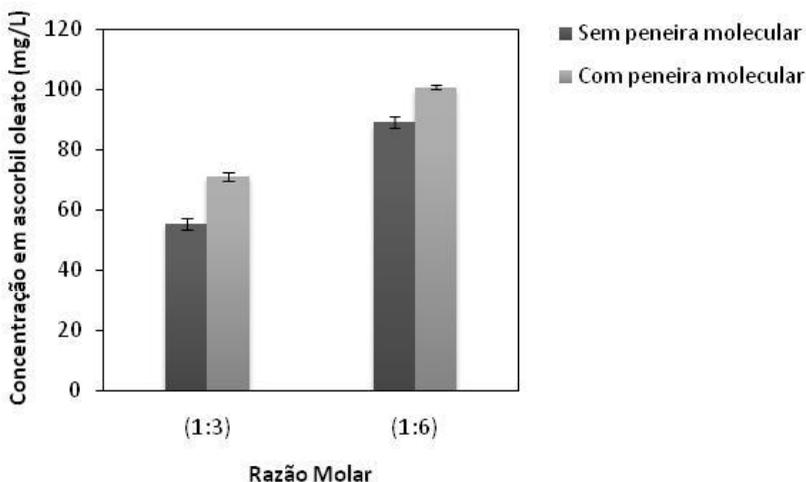
Figura 24 - Cinética comparativa da quantidade de ascorbil oleato produzido por meio do micro-ondas com peneira molecular e sem peneira molecular



Na Figura 25 está representada uma comparação entre duas reações de síntese de ascorbil éster, uma com razão molar 1:3 (com e

sem peneira molecular) e outra com razão molar 1:6 (com e sem peneira molecular). Pode-se observar que as reações que foram realizadas com peneira molecular resultaram em uma reação de síntese de ascorbil oleato com o comportamento mais estável, provando que a presença da peneira molecular é importante para a absorção da água formada no sistema. A estrutura da peneira molecular não foi afetada pela irradiação das micro-ondas.

Figura 25 - Comparação entre as reações de produção de ascorbil oleato com e sem peneira molecular (razão molar 1:3 e 1:6)



#### 4.2.3 Reuso da enzima utilizada na reação da síntese em micro-ondas

Uma vez que a grande vantagem do uso de catalisadores imobilizados é a facilidade de separação do meio reacional e reutilização em uma nova reação, decidiu-se investigar a possibilidade do reuso da enzima. Para tanto, reações foram testadas a 60 e 70 °C, razão molar 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico); 5 % de Novozym 435<sup>®</sup>; 2 mL de terc-butanol, 2 h com irradiação de micro-ondas. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Observa que, já no terceiro ciclo de uso a enzima diminuiu drasticamente o valor da conversão do ascorbil oleato.

Tabela 9 - Reutilização das enzimas nas reações de 60 e 70 °C

Ciclo	Concentração de ascorbil oleato (mg·L <sup>-1</sup> )	
	Reação a 60 °C	Reação 70 °C
1	89,9	75,4
2	67,81	62,11
3	18,71	14,87
4	16,89	11,48
5	5,85	0
6	0	0

O estudo de Loss (2015) pode ser comparado ao resultado do comportamento do reuso da enzima, pois quando utilizou a enzima Lipozyme TL IM<sup>®</sup> empregada como catalisador foi possível observar que no primeiro ciclo apresentou conversão de 94,32 %, no segundo ciclo a conversão caiu para 75,18 % e no terceiro ciclo para 53,17 %, assim diminuiu sucessivamente até o quinto ciclo. Além disso, o uso das enzimas imobilizadas como biocatalisadores é ainda dispendioso devido ao custo da enzima sendo assim um fator importante para a produção em nível industrial.

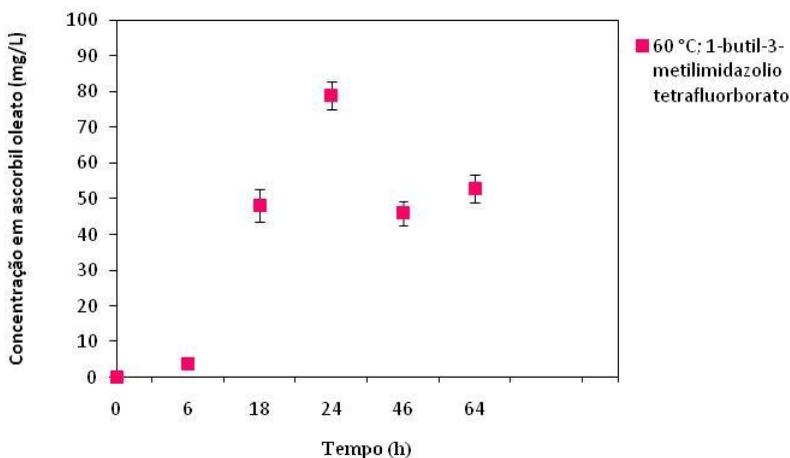
#### 4.2.4 Síntese enzimática com líquido iônico como solvente

O uso da combinação de micro-ondas e líquidos iônicos tem atraído a atenção da comunidade científica e esta combinação poderá abrir um novo campo para a síntese orgânica e biocatálise. Segundo Yu et al. (2012), a irradiação de micro-ondas (MW) e líquidos iônicos (ILS) são duas tecnologias em importante desenvolvimento da “química verde”, são considerados ambientalmente menos impactantes e têm sido empregados para acelerar a síntese orgânica e reação enzimáticas. A utilização combinada de MW e ILs nas reações enzimáticas é bastante limitada, embora possam dobrar as vantagens destas duas tecnologias. Em um estudo realizado por Yu et al. (2012) foi demonstrado o efeito sinérgico de MW e ILs em melhorar a atividade da enzima na produção de biodiesel em fase não aquosa.

A Figura 26 apresenta a cinética da reação realizada com líquido iônico a 60 °C a partir do estudo de Admaczak et al. (2009). A maior produção foi em 24 h de reação resultando em 30 % de conversão do ascorbil oleato, nas condições de ácido ascórbico:ácido oleico (0,1 mmol:0,12 mmol), 20 mg de enzima, 150 mg de peneira molecular e 0,5 mL de líquido iônico. Como tentativa de redução do tempo reacional, testou-se o uso de irradiação de micro-ondas no sistema em líquido

iônico. Contudo, o resultado obtido não foi satisfatório, não sendo possível a conversão do ascorbil oleato, pois foi adicionada a peneira molecular para auxiliar na absorção da água formada no sistema. Acredita-se que ocorreu um aumento de água no sistema devido ao uso do líquido iônico. Para solucionar este problema foi adicionada uma quantidade de sal (NaI) na reação para absorção da água, mas da mesma forma, não foi possível a produção do éster.

Figura 26 - Cinética de produção de ascorbil oleato utilizando líquido iônico como solvente nas condições de 60 °C; ácido ascórbico:ácido oleico (0,1 mmol:0,12 mmol), 20 mg de enzima, 150 mg de peneira molecular e 0,5 mL de líquido iônico



A viscosidade do líquido iônico, em alguns casos, pode influenciar as taxas de reação enzimática, mas não é o fator principal de controle da estabilização das enzimas. Lee et al. (2006) relataram que a atividade da enzima Novozym 435<sup>®</sup> em líquido iônico [BMiM] [Tf<sub>2</sub>N] diminui causando 5 % de redução na atividade da enzima. No entanto, outra lipase foi testada (*Rhizomucor miehei*), mas da mesma forma sua atividade diminui 2 %. A maioria dos líquidos iônicos possui constantes dielétricas moderadamente elevadas (normalmente 10 a 15), que são próximas a constante dielétrica do terc-butanol (12,5) demonstrando que seu comportamento pode ser parecido com o que ocorreu nos sistemas com solvente orgânico.

Vários autores relataram o comportamento interessante quando os solventes (diclorometano ou [BMIM] [Tf<sub>2</sub>N]) e substratos foram secos, as velocidades de reação tornaram-se mais elevadas sob micro-ondas do que aquelas em banho-maria. No entanto, quando a enzima também foi seca (sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) as velocidades de reação tornaram-se menores. Esse comportamento ocorre, pois a enzima encontra-se rodeada por, pelo menos, uma camada de água. Este fenômeno pode ser explicado pelo superaquecimento da camada de água perto da enzima, em vez de um verdadeiro efeito não-térmico. A enzima imobilizada (suportada em resina acrílica) tem um valor  $\epsilon$  de 2,7 a 4,5. Portanto, sob irradiação de micro-ondas, a superfície da enzima é susceptível a temperatura mais elevada do que o solvente, devido ao superaquecimento da camada de água. Isto pode explicar a maior velocidade de reação observada sob micro-ondas quando a enzima não foi seca, mas o solvente e substratos foram secos. Se a enzima é também intensivamente seca, é esperado que esta camada de água desapareça (ZHAO et al., 2009).

Rantwijk e Sheldon (2003) afirmam que a alta viscosidade dos líquidos iônicos desacelera as mudanças de conformação das proteínas, permitindo as enzimas de manter suas estruturas e a sua atividade, portanto a viscosidade do solvente pode afetar a velocidade da reação em termos de transferência de massa principalmente quando a reação for rápida e o líquido iônico relativamente viscoso. A Tabela 10 apresenta as propriedades dos solventes caracterizados a partir da reação por micro-ondas.

Tabela 10 - Propriedades dos solventes caracterizadas a partir da reação realizada por irradiação em micro-ondas

Solvente	Constante dielétrica	Viscosidade (cP)
t-BuOH	12,47	4,312
1-BuOH	17,84	2,39
[EMIM][Tf <sub>2</sub> N]	12,3	-
[BMIM][Tf <sub>2</sub> N]	11,7	1,05
[BMIM][Pf <sub>6</sub> ]	11,4	1,14
[EMIM][Bf <sub>4</sub> ]	12,8	1,28
[BMIM][Bf <sub>4</sub> ]	11,7	1,66

Fonte: Adaptada de Zhao et al. (2009)

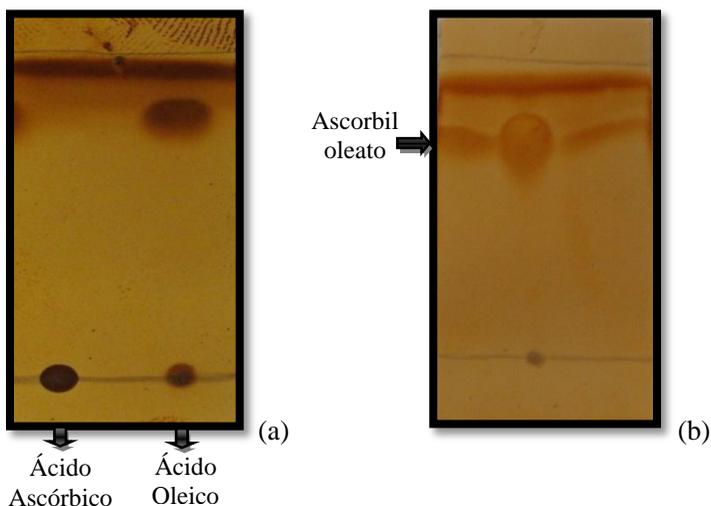
Segundo Zhao et al. (2009), os líquidos iônicos são ideais para as reações em sistemas de micro-ondas porque possuem elevado ponto de ebulição, baixa pressão de vapor e elevada estabilidade térmica. Afirmam

que as enzimas são mais estáveis em solventes com  $\log P$  maior que 3, isso pode ser uma das explicações para justificar tal comportamento obtido neste estudo, pois o  $\log P$  do líquido iônico [BMIM][Bf<sub>4</sub>] é menor que 3.

#### 4.3 CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA DO PRODUTO POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Nesta seção serão apresentados os resultados referente a identificação do produto obtido na esterificação enzimática do ácido oléico, realizado na UNIFE - Itália. Pode ser observado na Figura 27 onde está representada a placa de sílica com iodo do produto purificado.

Figura 27 - Placa de sílica com iodo comprovando a presença do produto. Antes da purificação (substratos) (a) e produto purificado (b)



O resultado obtido pela técnica de RMN está de acordo com dados encontrados na literatura e comprovam que o produto obtido é o ascorbil oleato (VIKLUND et al., 2003). O RMN de <sup>1</sup>H mostrou os seguintes deslocamentos (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm:  $\delta$  5,40 a 5,26 (m, 2H), 4,78 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz), 4,25 (dd, 1H,  $J = 11,0$  e 7,5 Hz), 4,17 (dd, 1H,  $J = 11,0$  e 6,0 Hz), 4,08 (ddd, 1H,  $J = 7,5$ , 6,0 e 2,0 Hz), 2,28 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz), 2,10 a 1,92 (m, 3H), 1,68 a 1,56 (m, 2H), 2,40 a 2,20 (m,

23 H), 0,90 (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz). A Figura 28 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ascorbil oleato em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (metanol deuterado).

Figura 28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ascorbil oleato em  $\text{CD}_3\text{OD}$

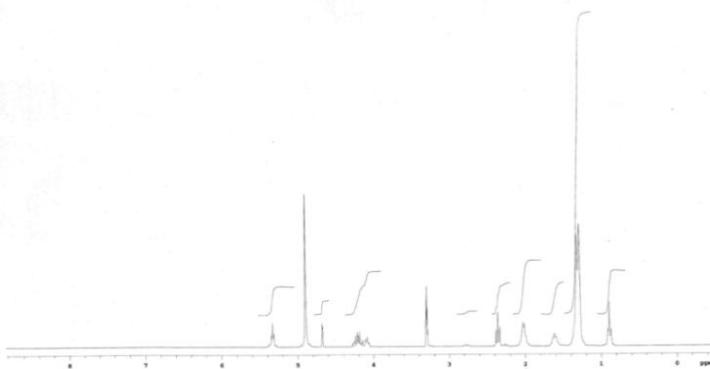
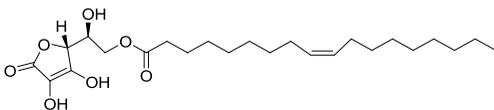
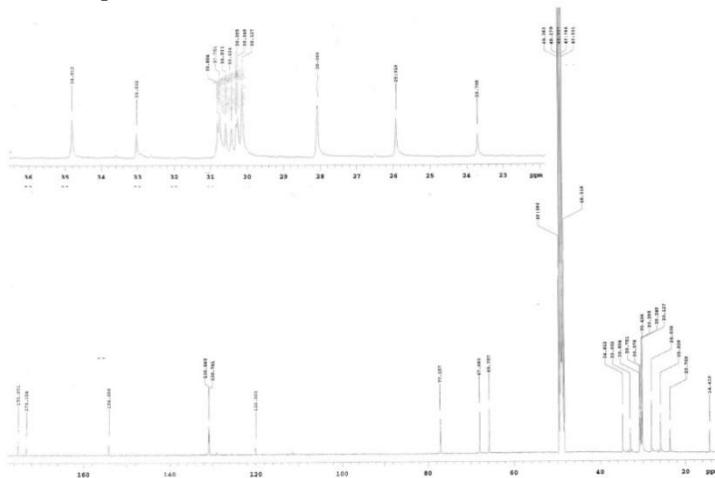


Figura 29 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ascorbil oleato em  $\text{CDCl}_3$



A Figura 29 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ascorbil oleato em  $\text{CDCl}_3$  (clorofórmio deuterado) e está de acordo com a estrutura química do composto e também com estudo anterior de Adamczack e Bornscheuer (2009). Segue espectro detalhado: RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ :  $\delta$  172 a 170 (d, C-1 e C1'), 151 (m, C-3'), 129 (d, C-10), 118 (m, C-2'), 75 (m, C-4'), 65 (m, C-5'), 64 (m, C-6'), 33 (m, C-2), 31 (m, C-16), 29 (d, 2C), 28 (t, 2C), 26 (d, C-8 e C-11), 24 (m, C-3), 22 (m, C-17) e 13 (m, C-18).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela 11 estão expressos os resultados da atividade antimicrobiana dos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico) utilizados na síntese e do produto ascorbil oleato (amostra purificada) sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella oxytoca*; *Listeria grayi*; *Micrococcus luteus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Proteus vulgaris*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Sreptomyces mutans*) realizado pelo método de difusão em ágar.

Tabela 11 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) expressa em diâmetro (mm)

Substância	EC	EF	KO	LG	ML	PA	PV	SA	SE	SMU
<b>ácido</b>	4	2	2	0	0	3	2	0	1	1
<b>ascórbico</b>										
ácido	0	0	1	0	0	0	2	1	0	3
oleico										
<b>ascorbil</b>	0	6	1	0	1	0	4	0	2	2
<b>oleato</b>										
CIF	3	12	10	9	0	4	0	8	14	14
<b>DMSO</b>	0	0	0	0	8	0	5	0	0	0

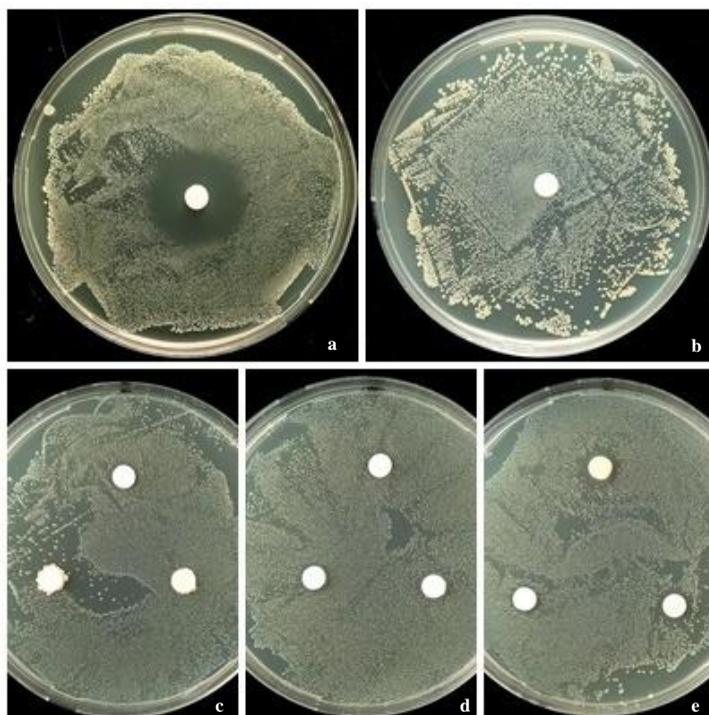
**Bactérias:** EC = *Escherichia coli*; EF = *Enterococcus faecalis*; KO = *Klebsiella oxytoca*; LG = *Listeria grayi*; ML = *Micrococcus luteus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; PV = *Proteus vulgaris*; SA = *Staphylococcus aureus*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; SMU = *Sreptomyces mutans*.

Pode-se observar pela Tabela 11 que o ascorbil oleato obtido a partir da síntese enzimática foi capaz de inibir o crescimento das

bactérias *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*, sendo que a bactéria que apresenta maior halo de inibição é a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. Para algumas bactérias, o ácido ascórbico em comparação ao ascorbil oleato comportou-se de forma diferente do que o caso das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, onde apresentaram maior halo de inibição se comparado com o controle (CIF).

Na Figura 30 está representada a fotografia de uma das análises realizadas no método da difusão em ágar.

Figura 30 - Imagens ilustrativas da análise de difusão em ágar realizadas para a *Enterococcus faecali*. a – controle com cloranfenicol; b – DMSO; c – ácido ascórbico; d – ácido oleico; e – ascorbil oleato



Fonte: Autor (2015)

Não foi encontrado nenhum estudo que discorra sobre o potencial antimicrobiano do ascorbil oleato. Apenas é possível encontrar na

literatura estudos avaliando o potencial antimicrobiano de óleos essenciais, acetato de eugenila, entre outros. Pode-se citar o estudo de Loos (2015) que avaliou a atividade antimicrobiana de acetato de eugenila, obtendo como resultado a inibição do crescimento de todas as bactérias que avaliou sendo essas *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesius*, *Pseudomonas aeruginosa*. Também pode ser citado o estudo realizado por Hector et al. (2004) que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo, o qual inibiu o crescimento de fungos, leveduras e bactérias.

O teste de microdiluição é mais vantajoso em relação ao de difusão em discos devido à economia de espaço e de reagentes; reprodutibilidade dos resultados devido à possibilidade de preparação de grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições de antimicrobianos; geração de um resultado quantitativo; conveniência de poder utilizar placas pré-fabricadas e sistemas automatizados. A desvantagem é a inflexibilidade na escolha dos antimicrobianos a serem testados, quando se utilizam as placas pré-fabricadas; alto custo e dificuldade em discernir o crescimento bacteriano da amostra inoculada daquele causado por bactérias contaminantes.

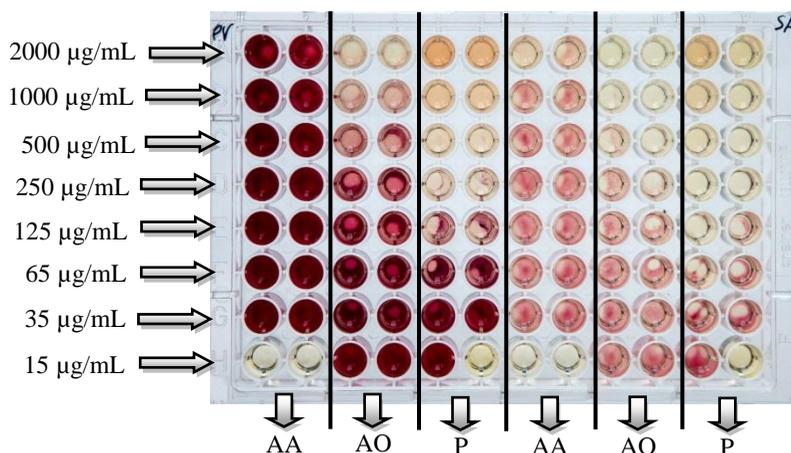
Por tanto, o ensaio de microdiluição foi realizado para os substratos (ácido ascórbico e ácido oleico) utilizados na síntese e para o produto purificado (ascorbil oleato), as bactérias testadas Gram-positivas e Gram-negativas foram *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella oxytoca*; *Listeria grayi*; *Micrococcus luteus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Proteus vulgaris*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Sreptomycetes mutans*. Os resultados estão expressos na Tabela 12 e um exemplo na imagem da Figura 31 de uma das bactérias testadas.

Tabela 12 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ascorbil oleato expressas em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Substância	EC	EF	KO	LG	ML	PA	PV	SA	SE	SMU
ácido ascórbico	1000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	>2000
ácido oléico	250	1000	2000	>2000	2000	>2000	1000	500	>2000	1000
ascorbil oleato	250	125	500	500	500	>2000	250	250	>2000	>2000

**Bactérias:** EC = *Escherichia coli*; EF = *Enterococcus faecalis*; KO = *Klebsiella oxytoca*; LG = *Listeria grayi*; ML = *Micrococcus luteus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; PV = *Proteus vulgaris*; SA = *Staphylococcus aureus*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; SMU = *Sreptomycetes mutans*

Figura 31 - Imagem da placa de microdiluição com as bactérias *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*



Fonte: Autor (2015)

Segundo os resultados apresentados na Tabela 12, o ascorbil oleato inibiu o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria grayi*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*, demonstrando ter potencial inibitório para a maioria das bactérias testadas, entre elas Gram-positivas e Gram-negativas. O critério utilizado para identificação da inibição das bactérias é conforme a coloração dos poços, a cor vermelha indica o crescimento das bactérias, quanto mais claro maior a inibição.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada tendo a mais baixa concentração de ascorbil oleato capaz de inibir completamente o crescimento da bactéria, o que corresponde aos poços que permaneceram incolores. Os resultados foram satisfatórios mostrando que o ascorbil oleato tem potencial antimicrobiano para algumas bactérias. Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura a respeito da atividade antimicrobiana em ascorbil oleato que possam ser comparados a este estudo.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Ao final das etapas de produção de ascorbil oleato por meio do ultrassom, micro-ondas, líquidos iônicos e solventes orgânicos foi escolhido o melhor resultado de conversão, custo e baixo impacto ambiental. A condição utilizada para a análise foi de 70 °C, 3 h de reação, 5 % Novozym 435<sup>®</sup>, terc-butanol, ácido ascórbico:ácido oleico (1:9), 20 % 4 Å. O produto foi purificado e realizada a avaliação em relação a sua atividade antioxidante baseado no estudo de Lo Nostro et al. (2000), que relataram a adição de uma cadeia de acil ao ácido L-ascórbico na 6<sup>o</sup> posição e fizeram a análise de antioxidante pelo método DPPH ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -difênil -  $\beta$ -picrilidrazil), a partir deste estudo utilizou-se este método para a análise antioxidante do ascorbil oleato. É interessante determinar a atividade antioxidante do ascorbil oleato antes de adicionar nos produtos alimentares para obter veracidade no seu potencial e para provar que há transformação de um ácido graxo em vitamina C.

Song et al. (2004) demonstraram que 6-O-ascorbil oleato teve um efeito protetor melhor em humanos do que outros derivados de ascorbila, isso por meio de testes realizados em células endoteliais da veia do cordão umbilical. O ensaio acelerado (Ranimat) foi aplicado para avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja em presença de ascorbil ésteres e de ácido graxos. Os resultados indicaram que tanto ascorbil oleato quanto o ascorbil palmitato estabilizaram 20 % do produto para a formação de peróxido.

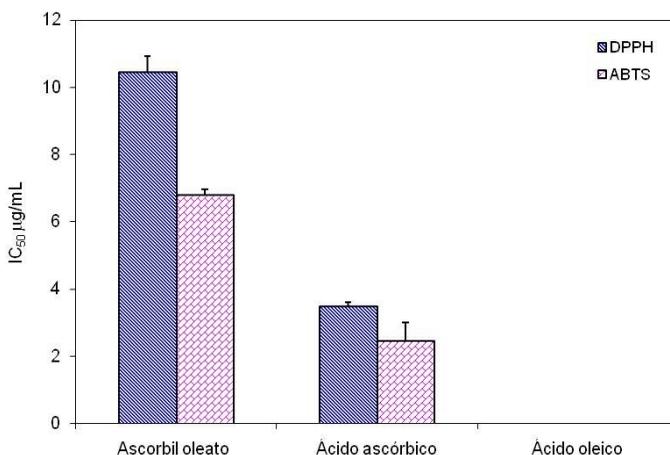
Na Tabela 13 e na Figura 32 estão apresentados os resultados da análise antioxidante do ascorbil oleato (purificado). Contudo, observa-se que o ascorbil oleato tem poder antioxidante superior tanto para o método DPPH quanto para o método ABTS se comparado ao ácido ascórbico puro, sendo possível sua aplicação tanto para alimentos quanto para cosméticos, pois se mostrou eficiente.

Tabela 13 - Resultados da atividade antioxidante analisada pelos métodos DPPH e ABTS do ascorbil oleato

Amostras	DPPH	ABTS
	IC <sub>50</sub> mg·mL <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> mg·mL <sup>-1</sup>
ascorbil oleato 1	12,94	6,98
ascorbil oleato 2	10,46	6,63

OBS: ascorbil oleato 1 e ascorbil oleato 2 foi realizada duplicata da análise

Figura 32 - Comparação da atividade antioxidante do ascorbil oleato em relação aos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico)



A partir da Figura 32 pode-se notar que o ascorbil oleato apresentou maior atividade antioxidante para as duas análises comparadas aos seus substratos puros, no caso, ácido ascórbico e ácido oleico. O ácido oleico não possui atividade antioxidante, mostrando-se importante a adição do ascorbil oleato em diversas aplicações.

Segundo Alves et al. (2007) quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é a sua atividade antioxidante. Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior o consumo de DPPH.

No estudo realizado por Reys-Duarte et al. (2011) foram analisadas as atividades antioxidantes dos derivados sintetizados utilizando o ensaio da capacidade antioxidante equivalente do Trolox (padrão), apresentando como resultados dos experimentos eficiência de 84 % de 6-O-ascorbilo palmitato e 71 % de 6-O-ascorbilo oleato em comparação com o ácido L-ascórbico. Viklund et al. (2003) realizaram uma comparação para retardar o desenvolvimento de peróxido entre o ascorbil oleato e o ascorbil palmitato e comprovou-se que o oleato é mais eficaz num período de 18 semanas.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 CONCLUSÕES

Na presente pesquisa foram estudadas alternativas para a síntese enzimática de ascorbil oleato entre elas o uso de solventes orgânicos, líquidos iônicos, ultrassom e micro-ondas. A consecução do mesmo permitiu, de forma geral, concluir que:

- ✓ O solvente orgânico terc-butanol mostrou-se apropriado e com melhor comportamento para a síntese enzimática de ascorbil oleato;
- ✓ Resinas catiônicas não atuam como catalisador para a reação de esterificação enzimática de ascorbil oleato;
- ✓ O método colorimétrico de identificação dos ácidos graxos não foi eficiente para a quantificação do produto de interesse;
- ✓ O método analítico desenvolvido por HPLC mostrou-se eficaz na quantificação de ascorbil oleato;
- ✓ O ultrassom mostrou ser uma tecnologia eficaz para a reação de síntese enzimática de ascorbil oleato a partir de ácido L-áscorbido e ácido oleico. A melhor conversão obtida foi nas condições: 70 °C, 1:9, 5 % Novozym 435® e 20 mL terc-butanol, obtendo 66,4 % em 3 h;
- ✓ O uso da peneira molecular permitiu a obtenção de maiores conversões e comportamento cinético mais estável principalmente com a adição de 20 % desta, atingindo 86 % de conversão em ascorbil oleato em 3 h em ultrassom.
- ✓ A irradiação com micro-ondas mostrou ser uma tecnologia eficiente, rápida, viável e “química verde” para a síntese de ascorbil oleato com o uso de solvente. A melhor conversão obtida foi em 2 h de reação a 60 °C, 90 % de conversão em ascorbil oleato.
- ✓ Este trabalho mostra claramente as dificuldades em encontrar uma regra simples para prever o comportamento do líquido iônico na reação;
- ✓ O ascorbil oleato possui um nível substancial de atividade antioxidante, que facilita a sua utilização em alimentos e também como um veículo para solubilizar e estabilizar fármacos hidrófobos e outras substâncias, pois tem atividade antioxidante com potencial similar ao ácido ascórbico;

- ✓ O ascorbil oleato apresentou atividade antimicrobiana para alguns microrganismos (Gram-positivos e Gram-negativos) isso não observado até o momento por nenhum outro estudo;
- ✓ A análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu confirmar a estrutura do ascorbil oleato produzido por via enzimática.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos durante a execução deste projeto, algumas sugestões são apresentadas para a realização em trabalhos futuros:

- Uso de fluidos supercríticos em substituição ao solvente orgânico e ao líquido iônico;
- Avaliação da atividade enzimática para os sistemas com ultrassom e com micro-ondas;
- Testar outros ácidos graxos para a realização da síntese como, por exemplo, ácido esteárico e ácido linoleico;
- Sintetizar o éster de ácido L-ascórbico via esterificação enzimática de modo contínuo;
- Realizar o encapsulamento do ascorbil oleato produzido via síntese enzimática, para análise da liberação controlada;
- Determinar a eficiência de encapsulamento do éster de ácido L-ascórbico encapsulado em PHBV;
- Verificar o comportamento de liberação *in vitro* das partículas de éster de ácido L-ascórbico encapsuladas;
- Comprovar o encapsulamento do éster de ácido L-ascórbico por análise de microscopia confocal.

## 6 PUBLICAÇÕES ADVINDAS DO DESENVOLVIMENTO DA TESE

A seguir são descritas as publicações relacionadas ao desenvolvimento desta tese, incluindo artigos completos publicados em periódicos, bem como resumos publicados em congressos envolvendo parte do assunto da tese.

### ➤ **Colaboração na orientação de Trabalho de Conclusão de Curso**

Gabriela Rotta Gomes. Síntese enzimática de ascorbil linoleato em sistema assistido por ultrassom. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

### ➤ **Artigos completos publicados em periódicos**

LERIN, LINDOMAR A.; LOSS, RAQUEL A.; REMONATTO, DANIELA; ZENEVICZ, MARA CRISTINA; BALEN, MANUELA; NETTO, VENDELINO OENNING; NINOW, JORGE L.; TRENTIN, CLÁUDIA M.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; DE OLIVEIRA, DÉBORA. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 2381-2394, 2014.

BALEN, MANUELA; SILVEIRA, CAMILA; KRATZ M. JADEL; SIMÕES M.O. CLÁUDIA; VALÉRIO ALEXSANDRA; NINOW, JORGE L.; NANDI G. LEANDRO; DI LUCCIO MARCO; DE OLIVEIRA, DÉBORA. Novozym 435<sup>®</sup> – catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 514-520, 2015.

### ➤ **Artigos submetidos para periódicos**

BALEN, MANUELA; GOMES ROTTA GABRIELA; KRATZ M. JADEL; SIMÕES M.O. CLÁUDIA; VALÉRIO ALEXSANDRA; DE OLIVEIRA, DÉBORA. Kinetics of ultrasound-assisted enzyme-catalyzed synthesis of ascorbyl ester derived from linoleic acid. **Química Nova**.

➤ **Resumos completos e expandidos publicados em congressos**

MANUELA BALEN; CAMILA SILVEIRA; LINDOMAR A. LERIN; JORGE LUIZ NINOW; MARCO DI LUCCIO; DÉBORA DE OLIVEIRA. Solubilidade do sistema reacional contendo ácido ascórbico/ácido oleico em diferentes solventes orgânicos. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis – SC.

MARIA J. A. SILVA; RAQUEL A. LOSS; MANUELA BALEN; LINDOMAR A. LERIN; GABRIELA N. PEREIRA; JORGE L. NINOW; HAIKO HENSE; JOSÉ V. OLIVEIRA; DÉBORA DE OLIVEIRA. Seleção de biocatalisadores para a síntese enzimática de acetato de eugenila em sistema livre de solvente orgânico. In: XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2014, Rio de Janeiro – RJ.

CAMILA SILVEIRA; MANUELA BALEN; JADEL MÜLLER KRATZ; CLÁUDIA MARIA OLIVEIRA SIMÕES; JORGE LUIZ NINOW; DÉBORA DE OLIVEIRA; MARCO DI LUCCIO. Avaliação do efeito do uso de peneira molecular na síntese enzimática de ascorbil oleato em banho de ultrassom. In: XX Simposio Nacional de Bioprocessos e XI Simposio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza – CE.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMALEK, E.; SAUPI, H.S.M.S.; TEJO, B.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; RAHMAN, M.B.A. **Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.76, p.37-43, 2012.

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

ADAMCZAK, M. e BORNSCHEUER, U.T. **Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates.** Process Biochemistry, v. 44, p. 257-261, 2009.

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, L.S. **Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides.** Dialogos e Ciencia – Revista da rede ensino FTC, v. 5, p.7-8, 2007.

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

AYRES-BARROS, M.R. **Biocatálise em solventes orgânicos.** Boletim de Biotecnologia, Lisboa, v.72, p. 2-13, 2002.

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.

BACHU, P.; GIBSON, J.S.; SPERRY, J.; BRIMBLE, M.A. **The influence of microwave irradiation on lipase-catalyzed kinetic resolution of rancemic secondary alcohols.** Tetrahedron: Asymmetry, v.18, p. 1618-1624, 2007.

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

BASSYOUNI, F.A.; ABU-BAKR, S.M.; REHIM, M.A. **Evolution of microwave irradiation and its application in green chemistry and**

**biosciences.** Research on Chemical Intermediates, v. 38, p. 283–322, 2012.

BATISTELLA, L.; LERIN, L.A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A.J.; TRENTIN, C.M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; DE OLIVEIRA, D. **Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system.** Ultrasonics Sonochemistry, v.19, p. 452–458, 2012.

BEZBRADICA, D.; STOJANOVIĆ, M.; VELIČKOVIĆ, D.; DIMITRIJEVIĆ, A.; CAREVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, M.; MILOSAVIĆ, 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.

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

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.

BRUCE, P.Y. **Organic chemistry.** Stereochemistry, 2<sup>o</sup> ed. New Jersey. Prentice Hall, p. 176-189, 1998.

BUKHARI, A.; IDRIS, A.; ATTA, M.; LOONG, T.C. **Covalent immobilization of Candida Antarctica lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification.** Chinese journal of catalysis. v.35, p.1555-1564, 2014.

BURHAM, H.; RASHEED, R.A.G.A.; NOOR, N.M.; BADRUDDIN, S.; SIDER, H. **Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters.** Journal of molecular catalysis B: enzymatic, v.58, p. 153-157, 2009.

CAMPOS-SALES, H.; SOUZA, P.R.; PEGHINI, B.C.; DA SILVA, J.S.; CARDOSO, C.R. **An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease.** Mini Rev Med Chem, v.13, p. 201–210, 2013.

CARVALHO, P.O.; CALAFATI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. **Potencial de biocatálise**

**enantiosseletiva de lípases microbianas.** Química Nova. v. 28, 4, p. 614-621, 2005.

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

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.

CHANG, S-W.; YANG, C-J.; CHEN, F-Y.; AKOH, C.C.; SHIEH, C.-J. **Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozym 435.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 56, p. 7-12, 2009.

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.

CORBU, A.; GAURON, G.; CASTRO, J.M.; CASTRO, J.M. DAKIR, M.; ARSENIYADIS, S. **Microwave-assisted domino reactions: function-compatibility, modulation, and greening efforts.** Tetrahedron: Asymmetry. v.19, p.1730–1743, 2008.

CORMA, A.; GARCIA, H. **Lewis acids: from conventional homogeneous to green homogeneous and heterogeneous catalysis.** Chemical Review, v. 103, p. 4307-4365, 2003.

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.

DA RÓS, P.C.M.; Heizir, F.; Castro, A; CARVALHO, K.F.; SOARES, C.M.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 39, p. 529–536, 2012.

DADHANIA, A.N.; PATEL, V.K.; RAVAL, D.K. **Ionic liquid promoted facile and green synthesis of 1,8 - dioxo-octahydroxanthene derivatives under microwave irradiation.** Journal of Saudi Chemical Society. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2013.12.003, 2014.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, 1, p. 146-156, 2004.

DESHMANE, V.G.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. **Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate.** Ultrasom. Sonochem., v.16, p. 345-350, 2009.

DUPONT, J.; SPENCER, J. **On the noninnocent nature of 1,3-dialkylimidazolium ionic liquids.** Angew. Chem., v.43, p. 5296-5297, 2004.

EARLE, M.J.; SEDDON, K.R. **Ionic liquids. Green solvents for the future.** Pure Appl. Chem., v.72, p.1391–1398, 2000.

EISENMENGER, M.J.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. **Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure.** J Mol Catal B: Enzym, v. 67, p. 36 – 40, 2010.

FAN, X.; NIEHUS, X.; SANDOVAL, G. **Lipases as biocatalyst for biodiesel production.** v. 861, p. 471-483, 2012.

GAI, Q.-Y.; JIAO, J.; MU, P.-S.; WANG, W.; LUO, M.; LI, C.-Y.; ZU, Y.-G.; WEI, F.-Y.; FU, Y.-J. **Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities.** Industrial Crops and Products. v. 45, p. 303–311, 2013.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. **Potential of Different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance.** Advanced Synthesis e Catalysis. v. 353, p. 2885-2904, 2011.

GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. *Tetrahedron Lett*, v.27, p. 279, 1986.

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.

GRAEBIN, N.G.; MARTINS, A.B.; LORENZONI, A.S.G.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. **Immobilization of lipase B from *Candida Antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis**. *Biotechnol. Prog.*, v. 28, p. 406-412, 2012.

GUISNET, M.; RIBEIRO, F. R. **Zeólitos: Um Nanomundo a Serviço da Catálise**. 1ª ed., Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 2004.

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. 73-38, 2013.

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.

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

HECTOR, J.R.; SIMON, J.E.; RAMBOATIANA, M.M.R.; BEHRA, O.; GARVEY, A.S.; RASKIN, I. **Malagasy aromatic plants: essential oils, antioxidant and antimicrobial activities**. *Proc. XXVI IHC - Future for Medicinal and Aromatic Plants*, p.77-81, 2004.

HIELSCHER, T. **Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions**. *Dans European Nano Systems Workshop - ENS*, Paris-France, 2005.

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 Antartica lipase.** Biotechnonology 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.

HORCHANI, H.; CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. **Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology.** Carbohydrate Polymers, v.79, p.466–474, 2010.

HORE, P.J. **Nuclear Magnetic Ressonance.** New York: Oxford University Press. Oxford Chemistry Primers. v.32, 1995.

IRIMESCU, R.; SATTO, 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.

IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; HASSAN, A.; MBODJI, K.; COLLASSE, E.; COËFFIER, M. **Dietary  $\alpha$ -linolenic acid-rich formula reduces adhesion molecules in rats with experimental colitis.** Nutrition, v.28, p. 799–802, 2012.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2<sup>a</sup>. ed.[S.l.]: International Union of Pure and Applied Chemistry, 1997. ISBN 0-521-51150-X. Visitado em 27 de outubro de 2014.

JIANG, X.-J.; HU, Y.; JIANG, L.; ZOU, B.; SONG, P.; HUANG, H. **Optimization of enzymatic synthesis of L-ascorbyl palmitate by solvent engineering and statistical experimental designs.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 18, p. 350-357, 2013.

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

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

KELLER, K.L.; FENSKE, N.A. **Uses of vitamin A, C and E and related compounds in dermatology: a review.** Journal of the American Academy of Dermatology, v. 39, p. 611-625, 1998.

KINDWAI, M.; MOTHSRA, P.; GUPTA, N.; KUMAR, S.S.; GUPTA, R. **Green enzymatic synthesis of L-ascorbyl fatty acid ester: an antioxidant.** Synthetic Communications, v. 39, p.1143-1151, 2009.

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

KRISTENSEN, J.B.; XU, X.; MU, H. **Diacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis: Screening of Commercially Available Lipases.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 82, p.329-334, 2005.

KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J. **Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide.** Ind. Eng. Chem. Res. 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.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 62, p. 197-212, 2010.

LAROQUE, D. A.; LOSS, RAQUEL A.; SILVA, M. J. A.; LERIN, L. A.; PEREIRA, G.N.; OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J.L.; HENSE, H.; DE OLIVEIRA, D. **Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent-Free Acetylation: Process Optimization and Kinetic Evaluation.** Journal of Chemical Engineering & Process Technology, v.9, p.247, 2015.

LEADBEATER, N.E.; TORENIUS, H.M.; TYE, H. **High throughput screen**. *Comb. Chem.*, v. 7, p. 511, 2004.

LEADBEATER, N.E.; STECEL, L.M.; WOOD, E.C. *Org. Biomol. Chem.*, v.5, p. 1052, 2007.

LEADBEATER, N.E. **Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry**. CRC Press, Florida, US, 2010.

LE NGOC, T.; CHAU, N.D.-K.; LE NGOC, H.-T.; NGUYEN, T. P. **A rapid way to synthesize Bronsted acidic ionic liquid and its application as an efficient catalyst for esterification**. *Green Chemistry Letters and Reviews*, v. 7, p. 167-173, 2014.

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.

LEE, S.H.; HA, S.H.; LEE S.B.; KOO Y.-M. **Adverse effect of chloride impurities on lipase-catalyzed transesterifications in ionic liquids**. *Biotechnol Lett*, v.28, p.1335–1339, 2006.

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.; RICETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A. **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.; RICETTI, A.; DALLAGO, R.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.; OLIVEIRA, J.V.; ANTUNES, O.A.C.; OESTREICHER, E.G.; DE OLIVEIRA, D. **Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation**. *Food and Bioprocess Technol*, v.5, p. 1068-1076, 2012.

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 Biosyst Eng.*, v.37, p. 2381-2394, 2014.

LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. **Microwave assisted organic synthesis - a review**. *Tetrahedron*, v. 57, p. 9225–9283, 2001.

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, 1996.

LIU, Y.; WANG, J.; YAN, Y.; LI, J. **Biocatalytic synthesis and antioxidant capacities of ascorbyl esters by Novozym 435 in tert-butanol system using different acyl donors**. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 17282-17290, 2011.

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.

LO NOSTRO, P.; CAPUZZI, G.; ROMANI, A.; MULINACCI, N. **Self-Assembly and Antioxidant Properties of Octanoyl-6-O-ascorbic Acid**. *Langmuir*, v.16, p. 1744-1750, 2000.

LOSS, R.A. **Síntese e encapsulamento de acetato de eugenila obtido via esterificação enzimática e catálise química heterogênea em sistema livre de solvente orgânico**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

LOZANO, P.; GARCÍA-VERDUGO, E.; PIAMTONGKAM, R.; KARBASS, N.; DIEGO, T.; BURGUETE, M.I.; SANTIAGO, V.L.; IBORRA, J.L. **Bioreactors Based on Monolith-Supported Ionic Liquid Phase for Enzyme Catalysis in Supercritical Carbon Dioxide**. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 349, p. 1077–1084, 2007.

LOZANO, P.; BERNAL, J.M.; NAVARRO, A. **A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases.** *Green Chem*, v.14, p. 3026-3033, 2012.

LUNA, F.J.; SCHUCHARDT, U. **Modificação de zeólitas para uso em catálise.** *Química Nova*, v. 24, p. 885-892, 2001.

MAIA, A.A.B.; ANGÉLICA, R.S.; NEVES, R.F. **Estabilidade térmica da zeólita A sintetizada a partir de um rejeito de caulim da Amazônia.** *Cerâmica*, v. 54, p. 345-350, 2008.

MASON, T.J. **Sonochemistry and the environment – Providing a “green” link between chemistry, physics and engineering.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, p.476–483, 2007.

MARSH, K.N.; BOXALL, J.A.; LICHTENTHALER, R. **Room temperature ionic liquids and their mixtures-a review.** *Fluid Phase Equilibria*. v. 219, p. 93–98, 2004.

MARTINS, A.B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI, A.S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. **Rapid and high yield of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology.** *Process Biochem*, v. 46, p. 2311-2316, 2011.

MARTINS, A.B.; SCHEIN, M.F.; FRIEDRICH, J.L.R.; FERNANDEZ – LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.S.; RODRIGUES, R.C. **Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads.** *Ultrason. Sonochem.*, v.20, p. 1155-1160, 2013.

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

MATOS, L.M.C.; LEAL, I.C.R, SOUZA, R.O.M.A. **Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continous flow conditions.** *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, v.72, p.36-39, 2011.

MAZUMDER, S.; LASKAR, D.D.; PRAJAPATI, D.; ROY, M.K. *Chem Biodiversity*, v. 1, p. 9925, 2004.

MEIER, W.M. **Molecular Sieves**. Londres: Soc. Chem. Ind., p. 10, 1968.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates**. *Clin Sci (Lond)*, v.84, p.407-12, 1993.

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.

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

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.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. **Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability**. *Bioresour Technol*. v. 100 p. 5146-5154, 2009.

PALUDO, N.; ALVES, J.S.; ALTMANN, C.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. **The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 89-94, 2015.

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

PARK, S.; VIKLUND, F.; HULT, K.; KAZLAUSKAS, R.J. **Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant.** *Green Chemistry*, v. 5, p. 715-719, 2003.

PAUWELS, E.K.. **The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk.** *Med Princ Pract*, v.20, p. 103–111, 2011.

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.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries.** *Bras. Arch. Biol. Technol.* v.52 p. 201-219, 2009.

RANTWIJK, V.F.; LAU, R.M.; SHELDON, R.A. **Biocatalytic transformations in ionic liquids.** *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 131- 138, 2003.

RAO, C.V.; RIVENSON, A.; KELLOFF, G.J.; REDDY, B.S. **Chemoprevention of azoxymethane-induced colon cancer by ascorbyl palmitate, carbenoxolone, dimethylfumurate 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.

REICHARDT, C. **Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators.** *Chem. Rev.*, v. 94, p. 2319–2358, 1994.

REYES-DUARTE, D.; LOPEZ-CORTES, N.; TORRES, P.; COMELLES, F.; PARRA, J.L.; PEÑA, S.; UGIDOS, A.V.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J. **Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors.** *J. Am Oil Chem Soc.* v.88, p.57-64, 2011.

**RICHETTI, A. Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

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

**RÓS, P.C.M.; SILVA, W.C.; GRABAUSKAS, D.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation.** Industrial crops and products, v.52, p. 313-320, 2014.

**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.

**ROUGHTON, B.C.; CHRISTIAN, B.; WHITE, J.; CAMARDA, J.V.; GANI, R. Simultaneous desing of ionic liquid entrainers and energy efficient azeotropic separation processes.** Computers and Chemical Engineering, v. 42, p. 248-262, 2012.

**RUFINO, A.R.; BIAGGIO, F.C.; SANTOS, J.C.; 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.

**SANSEVERINO, A.M. Microondas em síntese orgânica.** Química Nova, v. 25, p. 660-667, 2002

**SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) (Asteraceae)*.** Dissertação de mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

**SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially.** Food Antioxidants. Elsevier, p. 113–127, 1990.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. **Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances.** Trends Biotechnol, v. 23, p. 193-198, 2005.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P. **Phenolic antioxidants.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 32, p.67-102, 1992.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHINDE, S.D.; YADAV, G.D. **Microwave Irradiated Immobilized Lipase Catalyzed Synthesis of Alkyl Benzoate Esters by Transesterification: Mechanism and Kinetic Modeling.** Ind. Eng. Chem. Res. v.53, p. 8706–8713, 2014.

SHINDE, S.D.; YADAV, G.D. **Process intensification of immobilized lipase catalysis by microwave irradiation in the synthesis of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) esters.** Biochemical engineering journal, v. 90, p. 96-102, 2014.

SHINDE, S.D.; YADAV, G.D. **Insight into microwave assisted immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolution of RS-(±)-ketorolac.** Process Biochemistry, v. 50, p. 230-236, 2015.

SHU, C.; CAI, J.; HUANG, L.; ZHU, X.; XU, Z. **Biocatalytic Production of ethyl butyrate to butyric acid from *Candida rugosa* lipase immobilized on cotton fabric.** J. Mol. Catal. B Enzym, v.72, p. 139-144, 2011.

SINISTERRA, J.V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview.** Ultrasonics, v. 30, p. 180-185, 1992.

SOLOMONS, T.W.G.; MACEDO, H. **Química Orgânica 2.** Editora Livros Técnicos e Científicos, 1996.

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.; WEI, D.-Z.; ZHOU, W.-Y.; XU, W.-Q.; YANG, S.-L. **Enzymatic synthesis and antioxidant properties of L-ascorbyl oleate and L-ascorbyl linoleate.** *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 1777–1780, 2004.

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.

STOJANOVIC, M.; VELIČKOVIĆ, D.; DIMITRIJEVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; KNEZEVIC-JUCOVIĆ, Z.; BEZBRADICA, D. **Lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate in acetone: Optimization of reaction conditions and lipase reusability.** *Biochemical Journal Engenharia*, v.71, p. 89-96, 2013.

TAN, H.S.G.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S.Q. **Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream.** *Food Chem.*, v. 124, p. 80-84, 2010.

TORRES, S.; BAIGORI, M.D.; SWATHY, S.L.; PANDEY, A.; CASTRO, G.R. **Enzymatic synthesis of banana flavor (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase.** *Food Res Int*, v. 42, p. 454 – 460, 2009.

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.

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

WAGHMARE, G. V.; VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from**

**glycerol and dimethyl carbonate.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 311-316, 2015.

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-naphthylloxy)-2-propanol.** *Molecules*, v. 17, p. 1–1, 2012.

WANG, X.; CHI, Y.; MU, T. **A review on the transport properties of ionic liquids.** *Journal of Molecular Liquids*, v. 193, p. 262-266, 2014.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. **Ionic liquids in synthesis.** Wiley – VCH Weinheim, 2003.

WATANABE, Y.; SAWAHARA, Y.; NOSAKA, H.; YAMANAKA, K.; ADACHI, S. **Enzymatic synthesis of conjugated linoleoyl ascorbate in acetone.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 368-372, 2008.

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, 2001.

WEI, D.; GU, C.; SONG, Q.; SU, W. **Enzymatic esterification for glycoside lactate synthesis in organic solvent.** *Enzyme Microb. Technol.*, v. 33, p. 508-512, 2003.

YADAV, G.D.; LATHI, P.S. **Microwave Irradiated Immobilized Lipase Catalyzed Synthesis of Alkyl Benzoate Esters by Transesterification: Mechanism and Kinetic Modeling.** *J. Mol. Catal. A: Chem.*, v. 223, p. 51–58, 2004

YADAV, G.D.; LATHI, P.S. **Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 814–820, 2006.

YADAV, G.D.; YADAV, A.R. **Insight into esterification of eugenol to eugenol benzoate using a solid super acidic modified zirconia**

**catalyst UDCaT-5.** Chemical Engineering Journal, v. 192, p. 146-155, 2012.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, E.A.; MOO-YOUNG, M. **Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions.** Enzyme Microb. Technol, v.23 p. 438 – 450, 1998.

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

YU, D.; WANG, Z.; CHEN, P.; JIN, L.; CHENG, Y.; ZHOU, J.; CAO, S. **Microwave-assisted resolution of (R,S)-2-octanol by enzymatic transesterification.** Journal of molecular catalysis. v.48, p. 51-57, 2007.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. **Irradiação ultra-sônica com vibração para a produção de biodiesel a partir de óleo de soja por Novozym 435.** Processo Biochem., v.45, p. 519-525, 2010.

YU, Y.; WU, D.; LIU, C.; ZHAO, Z.; YANG, Y.; LI, Q. **Lipase/esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via polycondensation: A review.** Process Biochemistry, v. 47, p. 1027-1036, 2012.

YUAN, Y.; BAI, S.; SUN, Y. **Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ ) – menthol in ionic liquids and organic solvents.** Food Chemistry, v. 97, p. 324-330, 2006.

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.

ZHANG, D.-H.; BAI, S.; REN, M.-Y.; SUN, Y. **Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquid.** Food Chemistry, v.109, p. 72-80, 2008.

ZHANG, D.O.; LI, Y.Q.; LI, C.; LV, Y.Q.; LI, Y. **Kinetics of Enzymatic synthesis of L-ascorbyl acetate by Lipozyme TL IM and Novozym 435.** Biotechnology and Bioprocesss Engineering, v. 17, p.60-66, 2012.

ZHANG, D.O.; LI, C.; ZHI, G.-Y. **Kinetic and thermodynamic investigation of enzymatic L-ascorbyl acetate synthesis.** Journal of Biotechnology, v.168, p.416-420, 2013.

ZHANG, D.O.; LI, C.; XIE, L.L.; YUWEN, L.X. **Enzymatic synthesis of L-ascorbyl laureate in DMSO – acetone mixed solvent..** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 52, p.11875-11879, 2013.

ZHAO, H.; BAKER, G.A.; SONG, Z.; OLUBAJO, O.; ZANDERS, L.; CAMPBELL, S.M. **Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.57, p. 149-157, 2009.

ZHENG, M.M.; WANG, L.; HUANG, F.H.; DONG, L.; GUO, P.M.; DENG, Q.C.; LI, W.L.; ZHENG, C. **Ultrasonic pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of phytosterol esters with different acyl donors.** Ultrason. Sonochem., 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.** J. Mol. Catal. B Enzym., v. 95, p. 82-88, 2013.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANG, P.; GUO, K. **Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems,** v.90, p. 114-117, 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.** Frontiers of Chemical Engineering in China, v. 4, p. 367–371, 2010.

ZIAULLAH, H.P.; RUPASINGHE, V. **An efficient microwave-assisted enzyme-catalyzed regioselective synthesis of long chain acylated derivatives of flavonoid glycosides.** Tetrahedron letters. v.54, p.1933-1937, 2013.

## APÊNDICE A

### Curvas padrão do ácido ascórbico e ascorbil oleato

Para a quantificação do produto por HPLC com detector de UV foi construída curvas padrão de ascorbil oleato e ácido ascórbico, pois o ácido oleico não é detectado em UV. As Tabelas abaixo e Figuras abaixo apresentam as equações obtidas na curva de calibração para ácido ascórbico e para o ascorbil oleato e seus respectivos coeficientes de correlação.

$$y = 0,88 \cdot x \quad (5)$$

$$R^2 = 0,990$$

onde:

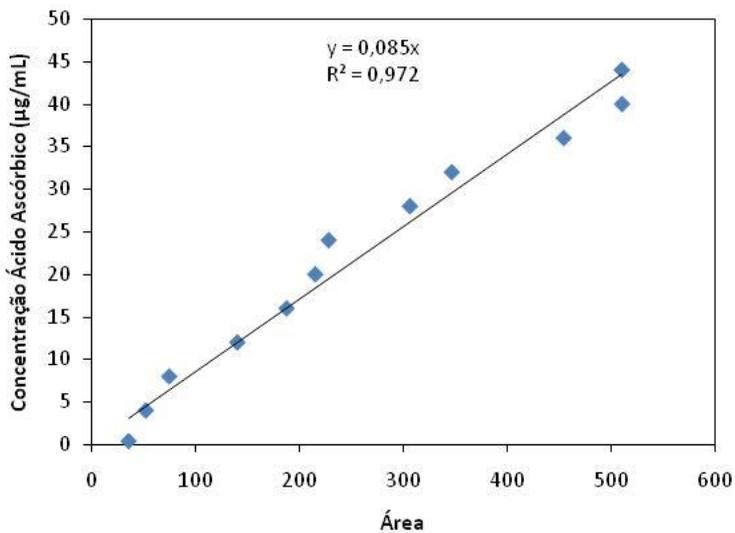
y = concentração de ácido ascórbico, em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

x = área do pico referente ao ácido ascórbico.

Tabela 14 - Dados relacionados à curva padrão do ácido ascórbico

<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Média área ascorbil oleato (mV.min)</b>
<b>44</b>	510,309
<b>32</b>	346,654
<b>28</b>	306,468
<b>20</b>	215,423
<b>16</b>	187,841
<b>12</b>	140,365
<b>8</b>	74,874
<b>4</b>	52,38
<b>0,4</b>	35,885

Figura 33 - Curva de calibração para o ácido ascórbico



$$y = 0,863 \cdot x \quad (6)$$

$$R^2 = 0,982$$

sendo:

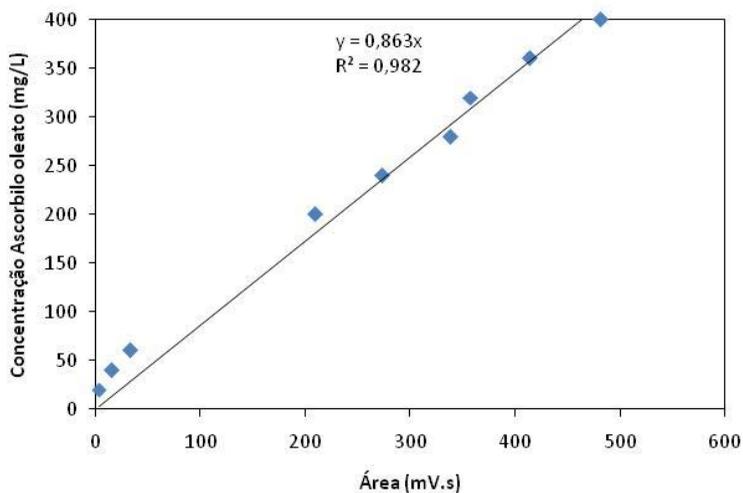
y = concentração de ascorbil oleato, em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

x = área referente ao pico de ascorbil oleato.

Tabela 15 - Dados relacionados à curva padrão do ascorbil oleato

Concentração (mg/L)	Média área ascorbil oleato (mV.min)
400	481,646
360	414,497
320	356,970
280	338,712
240	273,616
200	209,059
60	33,315
40	15,388
20	3,028

Figura 34 - Representando a curva de calibração para o ascorbil oleato



As curvas de calibração foram utilizadas para a realização dos cálculos da conversão do ascorbil oleato.

## APÊNDICE B

Tabela 16 - Valores da conversão em ascorbil oleato e do desvio padrão em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão (%) com desvio padrão
<b>70</b>	0	0
	0,5	43,46 ± 2,88
	1	47,46 ± 0,55
	3	41,55 ± 0,54
	6	38,81 ± 5,09
	9	35,75 ± 1,45
	12	23,92 ± 2,68
<b>60</b>	0	0
	0,5	16,16 ± 0,77
	1	27,42 ± 1,22
	3	28,63 ± 0,85
	6	35,36 ± 0,49
	9	22,03 ± 0,06
	12	10,17 ± 0,25
<b>50</b>	0	0
	0,5	22,18 ± 1,02
	1	35,85 ± 0,3
	3	28,41 ± 0,64
	6	28,14 ± 1,76
	9	41,44 ± 0,2
	12	33,31 ± 0,52

Tabela 17 - Valores da produção de ascorbil oleato com peneira molecular e o desvio padrão

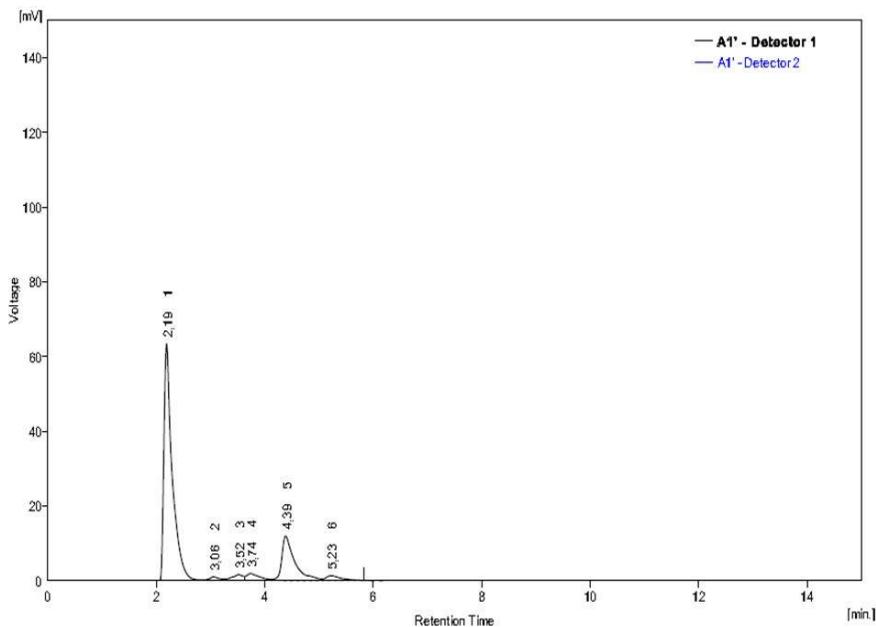
Quantidade de peneira molecular (%)	Tempo (h)	Conversão da peneira molecular (%) com desvio padrão
<b>20</b>	0	0 ± 0
	0,5	73,32 ± 0,02
	1	73,49 ± 0,34
	3	85,67 ± 0,06
	6	82,57 ± 0,16
	9	85,91 ± 0,05
	12	87,08 ± 3,82
<b>10</b>	0	0 ± 0
	0,5	0 ± 0
	1	45,16 ± 12,15
	3	42,79 ± 0,08
	6	31,78 ± 2,4
	9	34,05 ± 0,38
	12	15,73 ± 0,14
<b>5</b>	0	0 ± 0
	0,5	12,46 ± 0,02
	1	34,38 ± 1,08
	3	56,04 ± 0,84
	6	47,70 ± 0,07
	9	43,54 ± 0,07
	12	37,49 ± 2,55
<b>2,5</b>	0	0 ± 0
	0,5	44,88 ± 0,01
	1	51,77 ± 0,01
	3	45,57 ± 1,37
	6	63,87 ± 0,06
	9	41,61 ± 0,67
	12	44,26 ± 0,2

Tabela 18 - Valores expressos da cinética da esterificação enzimática de ascorbil oleato com peneira molecular e sem peneira molecular.

<b>Tempo</b>	<b>Conversão com enzima + peneira molecular</b>	<b>Conversão com enzima</b>
<b>0</b>	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
<b>0,5</b>	$73,32 \pm 0,02$	$37,0 \pm 1,13$
<b>1</b>	$73,49 \pm 0,34$	$49,15 \pm 0,46$
<b>3</b>	$85,67 \pm 0,06$	$66,42 \pm 1,3$
<b>6</b>	$82,57 \pm 0,16$	$8,02 \pm 0,73$
<b>9</b>	$85,91 \pm 0,05$	$25,68 \pm 3,17$
<b>12</b>	$87,08 \pm 3,82$	$5,12 \pm 0,47$

## APÊNDICE C

Figura 35 - Cromatograma da reação



OBS: No tempo de 2,5 min está apresentado o pico de ácido L-ascórbico e no tempo de 4,3 min o do ascorbil oleato (produto de interesse). O ácido oléico não é observado no cromatograma, pois não é possível detectar este composto devido à forma de detecção.

## APÊNDICE D

### Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio dos compostos puros de ácido ascórbico e ácido oléico

Figura 36 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido ascórbico em  $\text{CD}_3\text{OD}$

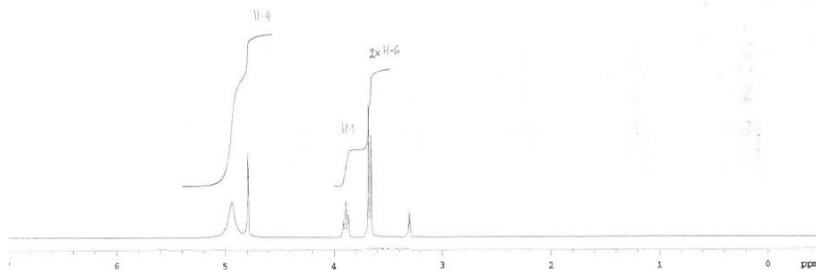


Figura 37 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido oleico em  $\text{CDCl}_3$

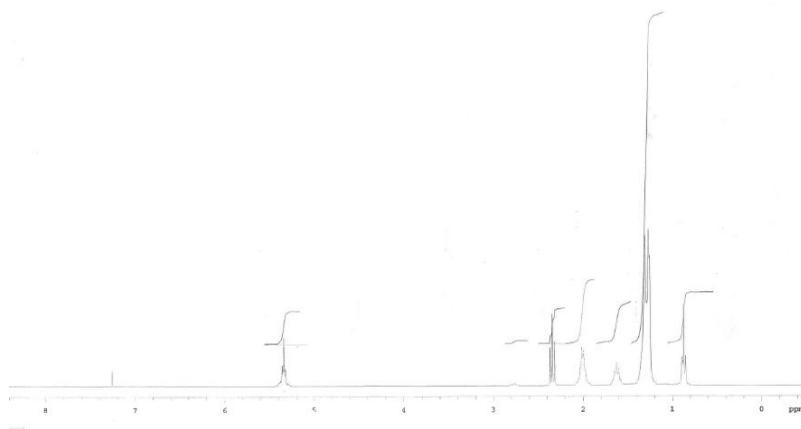


Figura 38 - Espectro IR-FT do poder rotatório do ascorbil oleato

